

Utvrdjivanje nivoa rezistentnosti *Myzus persicae* (Sulzer) biohemijskim metodama

Anda Vučetić¹, Olivera Petrović-Obradović¹, John Margaritopoulos² i
Panagiotis Skouras²

¹Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija (avucetic@agrifaculty.bg.ac.yu)

²Laboratory of Entomology and Agricultural Zoology, Department of Crop Production and
Agricultural Environment, University of Thessaly, Volos, Greece

REZIME

Kod *Myzus persicae* (Sulzer) do sada su utvrđena tri tipa rezistentnosti: povećana produkcija karboksilesteraza E4 i FE4, stvaranje modifikovane acetilholinesteraze i „knock-down“ rezistentnost. Biohemijskim metodama moguće je izmeriti količinu karboksilesteraza, kao i aktivnosti modifikovane acetilholinesteraze i na osnovu dobijenih vrednosti, vaši svrstati u neku od kategorija rezistentnosti. Korišćena su dva testa, test totalne esterazne aktivnosti i test za proveru aktivnosti modifikovane acetilholinesteraze (MACE). Testirane su *Myzus persicae persicae* sa breskve i *Myzus persicae nicotianae* sa duvana. Test totalne esterazne aktivnosti pokazao je da 65% testiranih jedinki pripada kategoriji umereno rezistentnih vaši-ju, dok je 35% veoma rezistentno. Rezistentnost koja se zasniva na stvaranju modifikovane acetilholinesteraze manje je zastupljena, jer je čak 80% testiranih vašiju osetljivo na dejstvo pirimikarba, koji je korišćen u testu. Takođe, oba testa su pokazala da su vaši sa duvana osetljivije na dejstvo insekticida od vašiju sa breskve.

Ključne reči: *Myzus persicae*; rezistentnost; karboksilesteraze E4 i FE4; MACE

UVOD

Zelena breskvina vaš *Myzus persicae* (Sulzer) je zbog izražene polifagnosti, velikog broja generacija godišnje, partenogeneze, postojanja beskrilnih i krilatih formi značajnih kao vektora biljnih virusa, izložena često primeni insekticida u svim područjima sveta gde ova vaš predstavlja problem u poljoprivrednoj proizvodnji. Stalni pritisak insekticidima doveo je do razvoja rezistentnosti prema brojnim jedinjenjima. U Evropi je poslednjih godina utvrđeno postojanje dve podvrste *M. persicae*,

Myzus persicae persicae (Sulzer) čiji je primarni domaćin breskva i *Myzus persicae nicotianae* (Blackman) koja je adaptirana na duvan (Eastop and Blackman, 2005), ali su mehanizmi rezistentnosti kod obe podvrste isti.

Kod *M. persicae* su najčešće prisutna dva načina nastanka rezistentnosti: povećana detoksikacija insekticida i promena osetljivosti mesta delovanja, zbog čega rezistentnost može biti razvijena prema velikom broju insekticida sa različitim mehanizmima delovanja.

Do povećane detoksikacije insekticida dolazi usled povećanja sinteze dva srodna enzima, karboksilesteraze

nazvane E4 i FE4, kako se označavaju i geni koji kodiraju njihovu produkciju, tako da se u zavisnosti od količine karboksilesteraza u vašima utvrđenim laboratorijskim analizama, jedinke *M. persicae* svrstavaju u četiri kategorije: S – osetljive, R1 – umereno rezistentne, R2 – veoma rezistentne i R3 – ekstremno rezistentne (Field i sar., 1989).

Dugo je jedini poznat mehanizam rezistentnosti kod *M. persicae* bio povećana produkcija karboksilesteraza koje imaju sposobnost detoksikacije insekticida. Karboksilesteraze E4 i FE4 zauzimaju više od jednog procenta od ukupnih proteina u telu vaši i vrše hidrolizu estara insekticida, odnosno njihovu inaktivaciju pre nego što dođu do ciljnog mesta u nervnom sistemu. Povećana aktivnost karboksilesteraza je posledica amplifikacije njihovih strukturalnih gena (Devonshire i Sawicki 1979., cit. Devonshire i sar., 1998). Time je omogućena izraženija rezistentnost prema organofosfatima i piretroidima i nešto niža prema karbamatima (Foster i sar., 2000).

Promena osetljivosti mesta delovanja se odnosi na druga dva tipa rezistentnosti, kao posledica tačkastih mutacija gena koje prouzrokuju aminokiseline supstitucije pri sintezi proteina. Prvi je modifikovana acetilholinesteraza (MACE) do koje dolazi supstitucijom serina fenilalaninom u blizini katalitičkog dela enzima (Moore i sar., 1994a), a drugi „knock-down” rezistentnost (*kdr*) do koje dolazi usled zamene leucina fenilalaninom što kao posledicu ima mutacije u Na-kanalima u nervnoj sinapsi (Martinez-Torres i sar., 1999).

Acetilholinesteraza pripada grupi serin hidrolaza enzima, i odgovorna je za hidrolizu neurotransmitera, acetilholina (ACh) u nervnim sinapsama. Organofosfati i karbamati deluju tako što inhibiraju acetilholinesterazu, što uzrokuje repetitivna pražnjenja na postsinaptičkim nervima i dovodi do neosetljivosti nervnog sistema i mogućeg uginuća organizma (Javed i sar., 2003). Kod *M. persicae* je rezistentnost, zasnovana na modifikovanoj, neosetljivoj acetilholinesterazi (AChE), kao ciljnom mestu delovanja insekticida organofosfata i karbamata, prvi put detektovana 1990. godine (Moore i sar., 1994a, 1994b).

Činjenica da je neosetljiva acetilholinesteraza pronađena samo u zajednici sa esteraznim mehanizmom sugerise da se ona razvila nakon amplifikacije esteraza, a da se isti AChE gen nalazi pored oba tipa esteraza. Modifikovana AChE omogućava izraženu rezistentnost prema karbamatu pirimikarbu i triazolol triazamatu (Dewar i sar., 1994).

Poslednje otkrivena rezistentnost lisnih vašiju prema insekticidima je „knock-down” rezistentnost koja

omogućava nastanak promenjene osetljivosti insekata prema piretroidima i DDT-ju. Ovaj vid rezistentnosti je tako nazvan jer odražava trenutni paralizirajući efekat piretroida i DDT-ja u telu insekata. Odnosi se na promenu u strukturi proteinskog omotača natrijumovih kanala u nervnoj membrani. Kada su u pitanju piretroidi, rezistentnost koja se zasniva na povećanoj produkciji esteraza je od sekundarnog značaja u odnosu na *kdr*. Analizom klonova *M. persicae* koji su godinama gajeni u laboratoriji dokazano je da ovaj tip rezistentnosti postoji odavno, ali je bliže objašnjen tek kada su molekularne metode postale dostupnije (Martinez-Torres i sar., 1999).

Cilj istraživanja bio je da se utvrdi nivo rezistentnosti *M. persicae* prema najčešće korišćenim grupama insekticida i tako dobiju prvi podaci o stanju rezistentnosti ove vrste vaši u Srbiji i Crnoj Gori.

MATERIJAL I METODE

Istraživanja su obavljena tokom 2005. godine. Uzorci su uzeti sa više lokaliteta na teritoriji Srbije i Crne Gore, sa breskve i duvana. Uzorkovanjem su obuhvaćeni zasađeni breskve, pojedinačna stabala iz okućnica i pored puteva, kao i polja sa duvanom. Lišće napadnuto lisnim vašima donošeno je u laboratoriju gde su vaši determinisane. Po jedna ženka iz svakog uzorka ostavljena je u fitotron radi gajenja u kontrolisanim uslovima, a veći broj ženki ostavljan je u zamrzivač.

Testovi su vršeni u Laboratoriji za entomologiju i poljoprivrednu zoologiju, Departman za biljnu proizvodnju Univerziteta u Solunu, Volos, Grčka.

Testom totalne esterazne aktivnosti testirane su vaši iz 20 uzoraka, a radi verodostojnosti podataka iz svakog uzorka su testirane po tri (ili dve) jedinke.

Test aktivnosti modifikovane acetilholinesteraze (MACE) je uključio vaši iz 25 uzoraka, a iz svakog testiranog uzorka testirane su po četiri jedinke. Za svaku vaš pojedinačno dobijen je rezultat, ali radi bolje slike stanja kao validan rezultat uzimana je srednja vrednost svih testiranih vašiju iz jednog uzorka.

Testovima je utvrđivana aktivnost karboksilesteraza E4 i FE4, kao i aktivnost acetilholinesteraze u telu vašiju.

Test totalne esterazne aktivnosti

Pomoću ovog testa utvrđuje se nivo esteraza E4 i FE4 u telu insekata i na osnovu njihove količine vaši se svr-

stavaju u jednu od četiri kategorije (Devonshire i sar., 1992). Ovaj test najbolje je izvesti sa živim vašima, ali moguće ga je izvesti i sa zamrznutim vašima.

Za izvođenje ovog testa neophodni su sledeći rastvori:

1. Koji se mogu čuvati:

a. Pufer (0.02 M, pH 7.0 0.1% triton): 3.58 g Na_2HPO_4 (reagens 1), 1.36 g KH_2PO_4 (reagens 2), 1.05 ml (=1050 μl) triton X- 100 (reagens 3) rastvoreni u 1000 ml H_2O ;

b. Rastvor 1-naftil-acetat (30 mM): 558.6 mg 1-naftil-acetata (reagens 4) rastvoren u 100 ml acetona;

c. Rastvor dodecilsulfat natrijumova so (5%): 50 g $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ (reagens 5) u 1000 ml H_2O ;

2. Koji se prave neposredno pred korišćenje:

d. 1-naftil-acetat (0.3 mM=300 μM): 0.2 ml (=200 μl) iz rastvora **b** u 20 ml rastvora **a**;

e. Rastvor DBLS: 75 mg Fast Blue B Salt (reagens 6) u 7.5 ml H_2O . Kada se rastvor izbistri dodati 17.5 ml rastvora **c**. Ovaj rastvor se može čuvati u mraku jedan sat.

Tehnika izvođenja testa

1. U elisa-posudu (posuda A) multipipetom stavimo po 50 μl pufera (rastvor a). Izostavimo samo komorice iz prve kolone jer one služe kao kontrola.

2. Po jednu beskrilnu ženku stavimo u svaku komoricu, osim u prvu kolonu. Kako elisa-posuda ima 96 komorica (12 x 8), maksimalan broj jedinki koje se mogu testirati je 88.

3. Vaši se homogenizuju pomoću multihomogenizatora (Burkard Scientific, Uxbridge, UK).

4. Nakon homogenizacije dodamo po 50 μl pufera (izostavljamo prvu kolonu).

5. Ostavimo da stoji 15 minuta na sobnoj temperaturi.

6. Za to vreme u drugu elisa-posudu (posuda B) multipipetom u svaku kolonu dodajemo po 25 μl rastvora **a**, osim u prvu u koju dodajemo 50 μl .

7. Posle 15 minuta multipipetom iz posude A prebacimo po 25 μl tečnosti u odgovarajuće kolone posude B. Nakon svakog pipetiranja isperemo pipetu destilovanom vodom.

8. Napravimo rastvor **d**. U svaku kolonu, uključujući i prvu, dodamo po 150 μl ovog rastvora. Isperemo multipipetu u destilovanoj vodi.

9. Napravimo rastvor **e**, i nakon 5 minuta od koraka 8. u svaku komoricu dodamo po 25 μl .

10. Elisa-posudu držimo u mraku 20 minuta.

11. Posudu stavimo u elisa-čitač (tip Anthos 2010) koristeći filter 620 nm.

12. Dobijene vrednosti absorpcije klasifikujemo prema skalama koje su dali Devonshire i sar. (1992) i Foster i sar. (2002).

Provera aktivnosti modifikovane acetilholinesteraze (MACE)

Ovaj biohemijski metod se koristi za utvrđivanje aktivnosti acetilholinesteraze kod vašiju bez prisustva insekticida i u prisustvu insekticida. Za ovaj test neophodne su žive vaši. Čitač na svakih 10 sekundi meri aktivnost enzima i po završenom procesu u trajanju od 10 minuta, dobijaju se broježane vrednosti i grafikoni za svaku testiranu vaš. Poredeći te vrednosti sa vrednostima iz skale utvrđuje se pripadnost određenim kategorijama rezistentnosti (Moore i sar., 1994a).

Protokol za proveru osjetljivosti acetilholinesteraze:

Neophodni rastvori:

a. PBS/Tween Pufer pH 7.5: 8 g NaCl, 0.2 g KH_2PO_4 , 2.9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KCl.

Dopuniti do 900 ml destilovanom vodom. Količinu od 0.55 g Tween 20 (Sigma P1379) razmutiti u 10 ml destilovane vode. Pomešati i dopuniti do 1000 ml destilovanom vodom.

b. 0.1% Triton Pufer: 3.58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.36 g KH_2PO_4 , 1 g triton X-100 (Boehringer 789704). Dopuniti do 1000 ml destilovanom vodom da bi se dobio 0.1M pH 7.0 pufer.

c. ATChI (MW:289): 24 mg acetilholinjodida pomešati sa 50 ml 0.1% triton pufera (1.66 mM).

d. DNTB (MW:396): 15 mg ditiobis nitrobenzoic kiseline pomešati sa 25 ml 0.1% triton pufera (1.52 mM). Nakon toga razblažiti ga uzimajući 2,5 ml i dopuniti do 50 ml 0.1% triton puferom (76 μM).

e. ATChI + Pirimicarb (MW: 238): 2.38 mg pirimikarba pomešati sa 25 ml ATChI.

Tehnika izvođenja testa

1. Čitač (El x 808, BIOTEK čitač)

Podesiti Molecular Devices microplate reader za Kinetik, 405 nm, trajanje 10 min u intervalima od po 10 sekundi, redukcija 0.150.

2. Homogenizacija vašii

U svaku komoricu stavi se po jedna vaš i homogenizuje multihomogenizatorom u 50 μ l PBS/Tween. U svaku komoricu dodati po 200 μ l 0.1% triton-pufera i nastaviti homogenizaciju pomerajući homogenizator u jednom smeru. Iz svakog uzorka testiraju se po četiri vaši, radi boljeg poređenja. Maksimalan broj uzoraka pri jednom ciklusu je 8.

3. Pipetiranje dobijenog rastvora

Iz svake kolone pipetirati multipipetom dva puta po 80 μ l dobijenog rastvora u odvojene kolone u drugu posudu (iz kolone 1 u kolone 5 i 9, iz kolone 2 u kolone 6 i 10, iz kolone 3 u kolone 7 i 11, iz kolone 4 u kolone 8 i 12). Nakon svakog pipetiranja isprati multipipetu destilovanom vodom.

4. DNTB/ATChI/pirimikarb

Pipetirati po 100 μ l DNTB u svaku kolonu. Pipetirati po 100 μ l ATChI u jednu od dve kolone sa istim sadržajem (pogledati korak 8). Pipetirati po 100 μ l ATChI/PIR u drugu od dve kolone sa istim sadržajem (korak 8). Odmah posudu staviti u već pripremljen čitač (korak 6).

Dobijene vrednosti sa pesticidom i bez pesticida poredimo (vrednost sa pesticidom/vrednost bez pesticida $\times 100 = \%$) i na osnovu dobijenih procentualnih vrednosti i uz pomoć skale koju su dali Moores i sar. (1994a) svrstavamo ih u određene kategorije.

REZULTATI

Totalna esterazna aktivnost

Rezultati prikazani u tabeli 1 pokazuju da su sve testirane vaši dostigle određeni nivo rezistentnosti, ali da nijedna testirana vaš ne pripada kategoriji R3, tj. nije ekstremno rezistentna. U kategoriju R1 svrstano je 13 uzoraka, a u kategoriju R2 sedam uzoraka.

Primetan je niži stepen rezistentnosti kod uzoraka vašiju sa duvana u odnosu na uzorke sa breskve. Samo su dva uzorka sa duvana (Male Pijace 6 i Mali Pesak) svrstana u grupu R2. Samo dva uzorka vašiju sa breskve (Galenika i Brestovik 2) su bila u grupi R1. Oba su uzeta sa pojedinačnih stabala, na kojima nisu primenjivani insekticidi.

Procentualno učešće pojedinih kategorija rezistentnosti je prikazano u tabeli 2, iz koje se vidi da je 65% vaši umereno rezistentno, tj. pripada kategoriji R1, a 35% veoma rezistentno, tj. pripada kategoriji R2.

Aktivnost modifikovane acetilholinesteraze (MACE)

Rezultati prikazani u tabeli 3 pokazuju da je kod tri od svih testiranih uzoraka vašiju (Vinča 1, Vinča 2, Bela

Tabela 1. Rezultati testa totalne esterazne aktivnosti iz jedinki *M. persicae*
Table 1. Total esterase activity test on *M. persicae*

Lokalitet – Locality	Biljka domaćin - Host plant	Kategorije – Category	
Senta3	duvan/tobacco	R1R2	R1
Senta5	duvan/tobacco	R1R1R1	R1
Kanjiža2	duvan/tobacco	R1R1R1	R1
Kanjiža – Mali Pesak	duvan/tobacco	R2R1R2	R2
Kanjiža – M. Pijace	duvan/tobacco	R1R2R1	R1
Kanjiža – M. Pijace 2	duvan/tobacco	R1R1R1	R1
Kanjiža – M. Pijace 4	duvan/tobacco	R1R1R2	R1
Kanjiža – M. Pijace 5	duvan/tobacco	R1R2R1	R1
Kanjiža – M. Pijace 6	duvan/tobacco	R2R2	R2
Beška	duvan/tobacco	R1R2R1	R1
Futog	duvan/tobacco	R1R1R1	R1
Šid – Vasica	duvan/tobacco	R1R1R1	R1
Beograd – Galenika	breskva/peach	R1R1R1	R1
Topola	breskva/peach	R2R1R2	R2
Beograd – Brestovik 2	breskva/peach	R1R1R1	R1
Beograd – Vinča 1	breskva/peach	R2R2R2	R2
Beograd – Vinča 2	breskva/peach	R2R2R2	R2
Smederevo	breskva/peach	R2R2R2	R2
Bela Crkva	breskva/peach	R1R2R2	R2
Podgorica – Sukuruć	duvan/tobacco	R1R1R1	R1

Tabela 2. Procentualno učešće pojedinih kategorija rezistentnosti dobijenih na osnovu testa totalne esterazne aktivnosti**Table 2.** Percentage of resistance categories based on the total esterase activity test

Kategorije – Categories	%
S – osetljive/susceptible	0
R1 – umereno rezistentne/moderately resistant	65
R2 – veoma rezistentne/highly resistant	35
R3 – ekstremno rezistentne/extremely resistant	0

Crkva) utvrđen RR nivo rezistentnosti i skoro 100% aktivnost enzima u prisustvu insekticida. Sva tri uzorka su iz zasada breskve. Dva uzorka pokazuju RS nivo rezistentnosti, jedan iz zasada breskve (Smederevo), a drugi sa duvana (Sukuruć). Svi ostali uzorci su osetljivi, tj. kod njih se ovaj tip rezistentnosti nije razvio.

Procentualno učešće pojedinih kategorija rezistentnosti prikazano je u tabeli 4 iz koje se vidi da je 80% vaši osetljivo, pripada SS kategoriji, 8% umereno rezi-

Tabela 4. Procentualno učešće pojedinih kategorija rezistentnosti dobijenih na osnovu MACE testa**Table 4.** Percentage of resistance categories based on the MACE test

Kategorije – Categories	%
SS – osetljive/susceptible	80
RS – umereno rezistentne/moderately resistant	8
RR – ekstremno rezistentne/extremely resistant	12

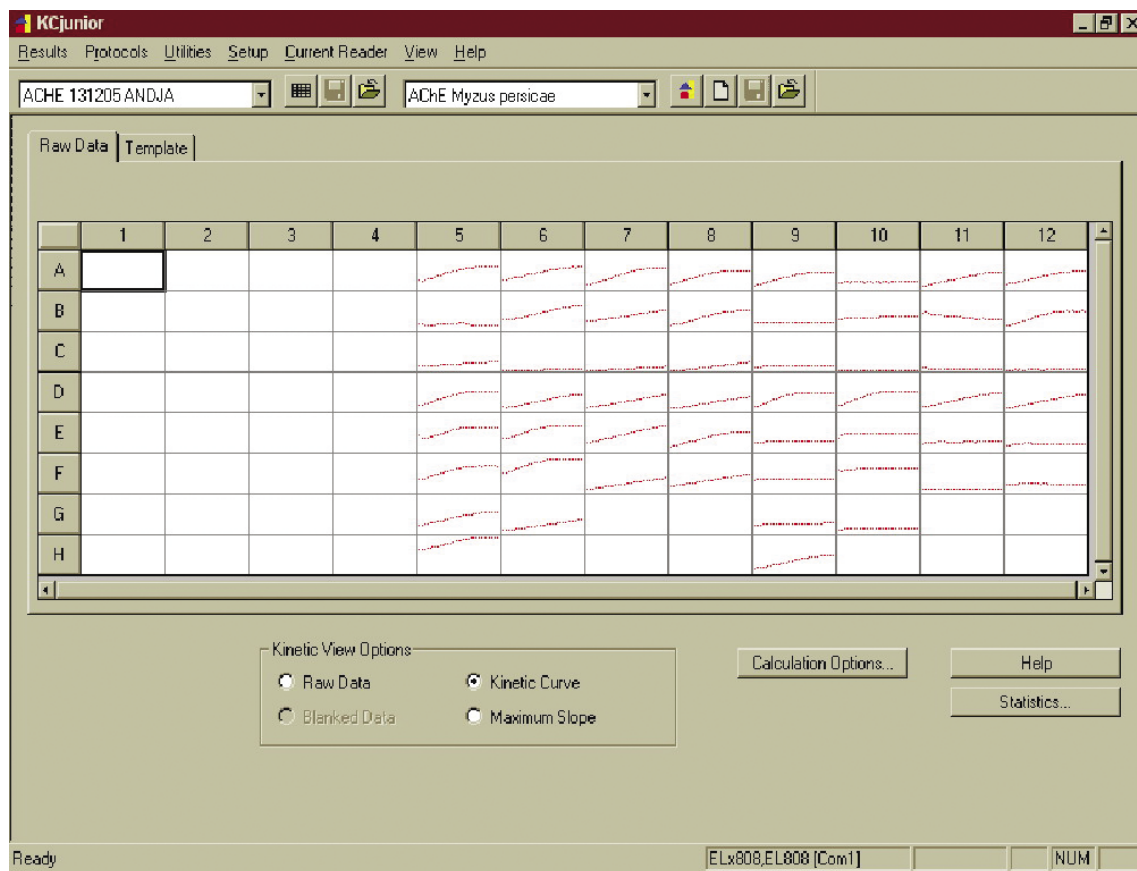
stentno, pripada RS kategoriji, a 12% ekstremno rezistentno, pripada RR kategoriji.

Aktivnost MACE je moguće prikazati i pomoću čitača (slika 1).

U kolonama 5, 6, 7 i 8 su prikazani podaci o aktivnosti AChE kod vašiju bez prisustva insekticida, a u kolonama 9, 10, 11 i 12 su dati podaci o aktivnosti AChE kod istih vašiju, ali uz prisustvo insekticida. Kod vašiju bez prisustva insekticida enzimska aktivnost raste. Slučaj kada su paralelne linije kod vaši bez prisustva insekticida i iste vaši, ali sa prisustvom insekticida ukazuje da je u pitanju re-

Tabela 3. Aktivnost modifikovane acetilholinesteraze (MACE) u jedinkama *M. persicae***Table 3.** Activity of modified acetylcholinesterase (MACE) in *M. persicae*

Lokalitet Locality	Biljka domaćin Host plant	1	1	2	2	3	3	4	4	%	
Galenika	breskva/peach	0.03533		0.018083		-0.11868		0.081589	SS	0.045001	4.5
Vinča 1	breskva/peach	0.971045	RR	0.974512	RR	1.121009	RR	1.166756	RR RR	0.986389	98.63
Male Pijace 5	duvan/tobacco	0.048092		0.13904		0.062283		-0.00631	SS	0.083138	8.31
Mali Pesak	duvan/tobacco	0.08839		0.124572		0.065371		-0.0195	SS	0.092778	9.28
Senta 2	duvan/tobacco	0.099517		0.07035		0.050367		0.016304	SS	0.059135	5.91
Vinča 2	breskva/peach	0.932611	RR	0.935596	RR	0.859177	RS	0.885733	RR RR	0.91798	91.80
Kanjiža 1	duvan/tobacco	0.006272		0.025954		0.011293		0.012048	SS	0.013892	1.4
Ritopek	breskva/peach	0.018665		-0.01193		0.050205		-0.10193	SS	0.017218	1.72
Senta 3	duvan/tobacco	0.017591		0.037084		0		-0.55785	SS	0.013669	1.36
Mali Pesak 6	duvan/tobacco	0		-0.05274		0		0	SS	0	0
Senta 4	duvan/tobacco	0.017451		0.004322		-0.02513		-0.03009	SS	0.005443	0
Male Pijace 4	duvan/tobacco	0		0.029045		0.016158		0.102912	SS	0.037029	3.7
Senta 5	duvan/tobacco	0.020235		0.084464		0.065508		-0.42151	SS	0.042552	4.2
Kanjiža 2	duvan/tobacco	0.066662		0.062352		0.155595		0.154989	SS	0.1099	10.99
Male Pijace 2	duvan/tobacco	-0.00917		0.033375		0.162315		0.063937	SS	0.064907	6.5
Brestovik 2	breskva/peach	0.067322		0.136234		0.084692		0.153615	SS	0.110466	11.05
Smederevo	breskva/peach	0.528141	RS	0.702107	RS	0.804415	RS	0.652557	RS RS	0.671805	67.18
Bela Crkva	breskva/peach	1.045963	RR	0.680705	RS	1.135324	RR	1.367895	RR RR	1	100
Vasica	duvan/tobacco	0.077477		0.067887		0.057485		0.037481	SS	0.060083	6
Male Pijace	duvan/tobacco	0.069078		0.037948		0.051394		0.07017	SS	0.057148	5.71
Topola	breskva/peach	0.990044		0		-0.01669		-0.02384	SS	0.243339	24.33
Male Pijace 5	duvan/tobacco	0		0.034131		-0.00805		-0.0412	SS	0.008533	0
Sukuruć	duvan/tobacco	0.699786	RS	0.737979	RS	0.882943	RR	0.836186	RS RS	0.789223	78.92
Beška	duvan/tobacco	0.050689		0.040948		0.063122		0.017843	SS	0.043151	4.31
Futog	duvan/tobacco	0.043191		0.100423		0.072471		0.194869	SS	0.102739	10.27



Slika 1. Grafički prikaz rezultata MACE testa sa jedinkama *M. persicae*
Figure 1. MACE chart with *M. persicae*

zistentna vaš jer insekticid nije stopirao aktivnost. Kada grafikon pokazuje opadanje enzimske aktivnosti kod vaši sa insekticidom, u zavisnosti od ugla opadanja, on ukazuje na manje rezistentnu ili osetljivu vaš.

Odnos utvrđene rezistentnosti vašiju sa breskve i sa duvana

Iako su utvrđene razlike u rezistentnosti između vašiju sa breskve i sa duvana male, može se reći da su vašii sa duvana osetljivije na dejstvo insekticida (Tabela 5).

Kada je u pitanju rezistentnost zasnovana na povećanoj produkciji karboksilesteraza, samo dva uzorka vašiju sa duvana (Mali Pesak i Male Pijace 6) svrstana su u kategoriju R2. Kada se ocenjuje esterazna aktivnost, svi ostali uzorci sa duvana svrstani su u R1 kategoriju. Takođe, samo dva uzorka sa breskve (Brestovik 2 i Galenika) su u kategoriji R1, dok su svi ostali u kategoriji R2. Test za merenje aktivnosti modifikovane

acetilholinesteraze je potvrdio da tri uzorka vašiju sa breskve (Vinča 1, Vinča 2 i Bela Crkva) imaju RR, a jedan (Smederevo) RS rezistentnost, dok samo jedan uzorak sa duvana (Podgorica – Sukuruć) ima RS rezistentnost. Kod svih drugih uzoraka ovaj vid rezistentnosti nije razvijen.

DISKUSIJA

Nijedna od ispitanih vašiju nije imala dovoljnu količinu karboksilesteraza da bi bila svrstana u kategoriju ekstremno rezistentnih insekata, ali nijedna nije bila osetljiva. Njih 65% je u R1 kategoriji, dok je preostalih 35% u kategoriji R2. To ukazuje na značajno drugačiju situaciju kod nas u odnosu na stanje utvrđeno u nekim drugim područjima u svetu (Španija, Potrugalija, Italija, Grčka, Argentina), gde je najveći broj testiranih vašiju svrstavan u kategorije R2 i R3 (Wege, 1994).

Tabela 5. Uporedni prikaz rezultata biohemijskih analiza vašiju sa breskve i duvana
Table 5. Results of biochemical analysis of aphids from peach and tobacco

Lokalitet – Locality	Biljka domaćin – Host plant	Esteraza – Esterase	MACE
Senta 3	duvan/tobacco	R1	SS
Senta 5	duvan/tobacco	R1	SS
Kanjiža 2	duvan/tobacco	R1	SS
Kanjiža – Mali Pesak	duvan/tobacco	R2	SS
Kanjiža – M. Pijace	duvan/tobacco	R1	SS
Kanjiža – Male Pijace 2	duvan/tobacco	R1	SS
Kanjiža - Male Pijace 4	duvan/tobacco	R1	SS
Kanjiža – Male Pijace 5	duvan/tobacco	R1	SS
Šid – Vasica	duvan/tobacco	R1	SS
Futog	duvan/tobacco	R1	SS
Beška	duvan/tobacco	R1	SS
Topola	breskva/peach	R2	SS
Beograd – Brestovik 2	breskva/peach	R1	SS
Smederevo	breskva/peach	R2	RS
Beograd – Vinča 1	breskva/peach	R2	RR
Beograd – Vinča2	breskva/peach	R2	RR
Beograd – Galenika	breskva/peach	R1	SS
Bela Crkva	breskva/peach	R2	RR
Podgorica – Sukuruć	duvan/tobacco	R1	RS

MACE test je pokazao da je većina vašiju osetljiva, tj. da kod njih rezistentnost koja se zasniva na modifikovanoj acetilholinesterazi nije razvijena. Tri ispitana uzorka pokazala su RR rezistentnost, što predstavlja 12% od ukupnog broja uzoraka, i sva tri su sa breskve. Dva su bila RS (8%), od kojih jedan sa breskve, a drugi sa duvana. Preostalih 80% vaši su u SS kategoriji, jer se istraživanjima gde je praćena rezistentnost duži niz godina MACE pokazao kao najnestabilniji vid rezistentnosti. To što je u našim istraživanjima utvrđeno tokom 2005. godine ne znači da je svake sezone situacija takva. Na primer, u desetogodišnjim istraživanjima Foster i sar. (2002) pokazano je da je 1996. godine 68% ispitivanih uzoraka imalo ovaj vid rezistentosti, a da je već u 1997. godini bilo samo 7% takvih vašiju. Šta je uzrok tome ne zna se, ali istraživanja pokazuju da je on blisko vezan sa povećanom produkcijom karboksilesteraza, i da se najčešće javlja kod R2 i R3 vašiju (Anstead i sar., 2004). Kako kod nas nije nađena nijedna vaš sa R3 nivoom rezistentnosti, možda je i razumljivo zašto ovaj vid rezistentnosti nije rasprostranjen među populacijama. Kod većine populacija sa breskve koje su imale R2 rezistentnost, biohemijskim putem je utvrđena i MACE rezistentnost.

Vaši sa duvana osetljivije su na dejstvo insekticida od vašiju sa breskve. Iako se radi o dve podvrste *M. persicae persicae* i *M. persicae nicotianae* (Eastop and Blackman, 2005) to nije razlog različite osetljivosti prema insekticidima. Intenzivnije mere zaštite koje se sprovode u voćnjacima mogući su uzrok smanjene osetljivosti podvrste *Myzus persicae persicae*. Tome u prilog ide i činjenica da su vaši sa pojedinačnih stabala breskve na kojima nisu primenjivane intenzivne mere zaštite osetljivije na dejstvo insekticida u odnosu na vaši iz velikih zasada. U Grčkoj, gdje se duži niz godina prati stanje rezistentnosti *M. persicae*, takođe je uočena razlika u osetljivosti, tj. vaši sa duvana su osetljivije na dejstvo insekticida u odnosu na vaši sa breskve. Međutim, za razliku od naših rezultata koji su pokazali da testirane vaši pripadaju uglavnom kategoriji R1, većina vašiju iz Grčke pripada kategorijama R2 i R3 (Cox i sar., 2001).

Biohemijske metode utvrđivanja rezistentnosti pokazale su nam da je evidentna smanjena osetljivost obe podvrste zelene breskvine vaši prema najčešće korišćenim grupama insekticida, tj. da je rezistentnost u određenom stepenu razvijena, ali da ispitivane populacije *M. persicae* u Srbiji još uvek ne pripadaju kategoriji ekstremno rezistentnih vašiju.

ZAHVALNICA

Ova istraživanja podržalo je Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije (Projekat: 143006B).

LITERATURA

Anstead, J.A., Williamson, M.S., Eleftherianos, I. and Denholm, I.: High-throughput detection of knockdown resistance in *Myzus persicae* using allelic discriminating quantitative PCR. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 871-877, 2004.

Cox, D., Denholm, I. and Devonshire, A.: Monitoring of insecticide resistance in *Myzus persicae* from Greece. Abstract Volume of the Sixth International Symposium on aphids – Aphids in a New Millennium, Renne, France, 2001, pp. 275-280.

Devonshire, A.L., Devine, G.J. and Moores, G.D.: Comparison of microplate esterase assays and immunoassay for identifying insecticide resistant variants of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, 82, 459-463, 1992.

Devonshire, A.L., Field, L.M., Foster, S.P., Moores, G.D., Williamson, M.S. and Blackman, R.L.: The evolution of insecticide resistance in the peach – potato aphid, *Myzus persicae*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B 353, 1998, pp. 1677-1684.

Dewar, A.M., Haylock, I.A., Chapman, J., Devine, G.J., Harling, Z. and Devonshire, A.L.: Effect of triazamate on resistant *Myzus persicae* on sugar beet under field cages. *Proc. Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases*, Brighton, BCPC Publications, 1, 1994, pp. 407-412.

Eastop, V.F. and Blackman, R.L.: Some new synonyms in Aphididae (Hemiptera: Sternorrhyncha). *Zootaxa*, 1089: 1-36, 2005.

Field, L.M., Devonshire, A.L., French-Constant, R.H. and Forde, B.G.: Changes in DNA methylation are associ-

ated with loss of insecticide resistance in the peach – potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, 243: 323-327, 1989.

Foster, S.P., Denholm, I. and Devonshire, A.L.: The ups and downs of insecticide resistance in peach – potato aphids (*Myzus persicae*) in the UK. *Crop Protection*, 19: 873-879, 2000.

Foster, S.P., Harrington, R., Dewar, A.M., Denholm, I. and Devonshire, A.L.: Temporal and spatial dynamics of insecticide resistance in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science*, 58: 895-907, 2002.

Javed, N., Viner, R., Williamson, M.S., Field, L.M., Devonshire, A.L. and Moores, G.D.: Characterization of acetylcholinesterases, and their genes, from the hemipteran species *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* (Glover), *Bemisia tabaci* (gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). *Insect Molecular Biology*, 12: 613-620, 2003.

Martinez-Torres, D., Foster, S.P., Field, L.M., Devonshire, A.L. and Williamson, M.S.: A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach – potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology*, 8: 339-346, 1999.

Moores, G.D., Devine, G.J. and Devonshire, A.L.: Insecticide – Insensitive Acetylcholinesterase Can Enhance Esterase – Based resistance in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 49: 114-120, 1994a.

Moores, G.D., Devine, G.J. and Devonshire, A.L.: Insecticide resistance due to insensitive acetylcholinesterase in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. *Proc. Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases*, Brighton, BCPC Publications, 1, 1994b, pp. 413-418.

Wege, P.J.: Challenges in producing resistance management strategies for *Myzus persicae*. *Proc. Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases*, Brighton, BCPC Publications, 1, 1994, pp. 419-425.

Determination of Resistance Levels of *Myzus persicae* (Sulzer) by Biochemical Methods

SUMMARY

Peach/potato aphid *Myzus persicae* (Sulzer) has developed three mechanisms of resistance: overproduction of one or two closely related carboxylesterases (E4 and FE4), production of modified acetylcholinesterase (MACE and knockdown resistance). Biochemical diagnostic methods can be used to identify levels of carboxylesterase production and sensitivity of modified acetylcholinesterase and, based on the values acquired we can classify aphids into one of the resistance categories. We used two tests: the total esterase activity test and test for checking sensitivity of acetylcholinesterase (MACE). *Myzus persicae persicae* from peach and *Myzus persicae nicotianae* from tobacco were tested. The total esterase activity test showed that 65% of the aphids tested were moderately resistant and 35% were highly resistant. Resistance based on the production of modified acetylcholinesterase is less represented because 80% of the aphids tested were susceptible to pirimicarb, which was used in the experiment. Also, both tests showed that aphids from tobacco were more susceptible than aphids from peach.

Keywords: *Myzus persicae*; Resistance; Carboxylesterases E4 and FE4; MACE