

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

EGE BÖLGESİ'NDEN ÖRNEKLENEN *Culex*
pipiens KOMPLEKSİ SİVRİSİNEK
POPULASYONLARINDA *ace-1*
GENİNDEKİ Gly119Ser VE Phe290Val
MUTASYONLARININ SAPTANMASI VE BU
POPULASYONLARIN RAPD BELİRTEÇLERİYLE
KARAKTERİZASYONLARI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERCAN KILIÇ

HAZİRAN 2015
MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

EGE BÖLGESİ'NDEN ÖRNEKLENEN *Culex*
***pipiens* KOMPLEKSİ SİVRİSİNEK**
POPULASYONLARINDA *ace-1*
GENİNDEKİ Gly119Ser VE Phe290Val
MUTASYONLARININ SAPTANMASI VE BU
POPULASYONLARIN RAPD BELİRTEÇLERİYLE
KARAKTERİZASYONLARI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERCAN KILIÇ

HAZİRAN 2015
MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

SERCAN KILIÇ tarafından hazırlanan EGE BÖLGESİ'NDEN
ÖRNEKLENEN *Culex pipiens* KOMPLEKSİ SIVRISI NEK
POPULASYONLARINDA *ace-1* GENİNDEKİ Gly119Ser VE Phe290Val
MUTASYONLARININ SAPTANMASI VE BU POPULASYONLARIN RAPD
BELİRTEÇLERİYLE KARAKTERİZASYONLARI başlıklı tezinin, 03/06/2015
tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi
için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. İrfan KANDEMİR (Jüri başkanı)
Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Ankara Üniversitesi, Ankara

İmza:



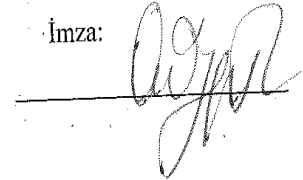
Doç. Dr. Belgin GÖÇMEN TAŞKIN (Danışman)
Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Okan ÖZGÜL
Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Ula Ali Koçman MYO,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

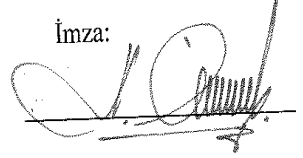
İmza:



ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

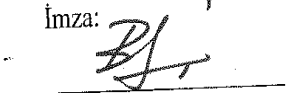
Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK
Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Doç. Dr. Belgin GÖÇMEN TAŞKIN
Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 03/06/2015

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

SERCAN KILIÇ

03/06/2015

ÖZET

EGE BÖLGESİ'NDEN ÖRNEKLENEN *Culex pipiens* KOMPLEKSİ SİVRİSİNEK POPULASYONLARINDA *ace-1* GENİNDEKİ Gly119Ser VE Phe290Val MUTASYONLARININ SAPTANMASI VE BU POPULASYONLARIN RAPD BELİRTEÇLERİYLE KARAKTERİZASYONLARI

Sercan KILIÇ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Belgin GÖÇMEN TAŞKIN

HAZİRAN 2015, 88 sayfa

Sivrisinekler, günümüzde zararlılara karşı yapılan kimyasal savaşta insektisitlere en fazla maruz bırakılan, ölümle sonuçlanabilen pek çok hastalığın taşınmasından sorumlu vektörler arasındadır. Ülkemiz, 8 cinse ait toplam 50 sivrisinek türünün üremesi ve yaşaması için gerekli iklimsel ve diğer ekolojik özelliklere sahiptir ve bunlar arasında *Culex pipiens* kompleksi en baskınlarıdır.

Sivrisineklerle mücadelede insektisitlerin kullanımı diğer pek çok böcek türü ile mücadelede olduğu gibi 1950'lerden bu yana devam etmektedir. Bu durum sivrisinek populasyonlarında hızla direnç gelişimine neden olmaktadır. Direnç gelişimi ile birlikte insektisitlere karşı daha güçlü hale gelen sivrisinek populasyonlarının kontrol çalışmalarında her geçen yıl birim alanda daha fazla kimyasal kullanımı sonucunda, hem kirlilik hem de insan sağlığı bakımından ortaya çıkan küresel risk durumu giderek artmaktadır. Mücadele gerektiren böcek türlerinin doğal populasyonlarındaki potansiyel direnç seviyelerinin belirlenmesi, bu türlerle mücadelede daha etkin ve kalıcı stratejilerin geliştirilmesindeki en temel unsurdur.

Bu çalışmada ülkemizdeki baskın sivrisinek türü olan *Culex pipiens*'in Ege Denizi'ne kıyısı olan ve Akdeniz İklimi'nin hüküm sürdüğü Muğla, Aydın, İzmir, Balıkesir, Çanakkale illerine ve bunların yanı sıra göreceli olarak daha karasal bir iklimin hüküm sürdüğü geçiş şeridinde bulunan illerden birisi olan Denizli İli'ne ait populasyonlar örneklenmiştir. Çalışılan populasyonlar üç farklı dönemde örneklenmiştir. Bu dönemlerin ilki; yıllık sivrisinek mücadele çalışmalarının hemen öncesindeki ilkbaharda, ikincisi; yaz boyunca yapılan ilaçlamaları takiben sonbaharda ve üçüncüsü ise bir sonraki yılın ilkbaharında olmuştur. Üç farklı dönemde örneklenen *C. pipiens* kompleksi populasyonlarında organofosfatlı (OP) ve karbamatlı (CB) insektisitlerin hedefi olan asetilkolinesteraz-1 (AChE-1) enzimini

kodlayan *ace-1* genindeki Gly119Ser direnç mutasyon frekansları PCR-RFLP yöntemi ile ve Phe290Val direnç mutasyon frekansları ise PASA (PCR Amplification of Specific Alleles) yöntemi ile saptanmıştır.

Gerçekleştirilen PCR'a dayalı bu moleküler analizler sonucunda, *ace-1* genindeki her iki direnç mutasyonunun da frekanslarının düşük olduğu ve belirgin dönemsel farklılıklar göstermedikleri görülmüştür.

Çalışılan populasyonlarda elde edilen direnç mutasyon frekans benzerlik ya da farklılıklarının popülasyona özgü insektisit seleksiyon baskısından mı kaynaklandığı yoksa populasyonlar arası göçün bir sonucu mu olduğu konusuna netlik kazandırabilmek amacıyla, 3 örnek toplama döneminden sadece ikinci toplama dönemine ait örnekler insektisit baskısı altında olmayan RAPD lokusları bakımından da taranarak karakterize edilmişlerdir.

Bu amaç doğrultusunda, oluşturulan alt popülasyonda taranan 80 RAPD primerinden 45 tanesinin RAPD bandı oluşturmadığı görülmüştür. Geriye kalan 35 primer, en az 3 polimorfik bant oluşturmuş olup, tüm bireylerde oluşturduğu tüm bantlar bakımından monomorfik olan bir primer saptanmamıştır.

Toplam 375 bireye uygulanan 20 primerin analizi sonucu toplam 252 lokus saptanmıştır. Bu lokuslardan sadece biri monomorfik olup, çalışılan *Culex pipiens* popülasyonlarındaki toplam polimorfik lokus oranı % 99.63'tür. Populasyonlar arası gen akış düzeyi $N_m=6.61$ olarak hesaplanırken, populasyonlar arası genetik farklılaşmanın ($G_{ST}=0.07$) oldukça düşük olduğu görülmüştür. Çalışılan *C. pipiens* kompleksi popülasyonlarındaki toplam genetik çeşitliliğin % 96.43'ünü popülasyon içi genetik çeşitlilik oluşturmaktadır.

Çalışma kapsamında elde edilen bulgular doğrultusunda uygulamaya yönelik öneriler sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Culex pipiens*, Direnç, *Ace*, PASA, RAPD

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE Gly119Ser AND Phe290Val MUTATIONS IN THE *ace-1* GENE OF *Culex pipiens* COMPLEX POPULATIONS SAMPLED FROM AEGEAN REGION AND CHARACTERIZATION THROUGH RAPD MARKERS OF THESE POPULATIONS

Sercan KILIÇ

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Belgin GÖÇMEN TAŞKIN

June 2015, 88 pages

Mosquitoes are one of the organisms subjected to frequent insecticide application due to their status as vectors which carry a wide range of life threatening diseases. Our country has climatic and other ecological features required for breeding and living of 50 species from 8 genera and the members of *Culex pipiens* complex is the dominant mosquitoes among these groups.

As in combat against many other insect species, the use of insecticide on mosquito control has been going on since the 1950s. This situation causes a rapid insecticide resistance in mosquito populations. However, capacity of these organisms to develop resistance against varying groups of insecticides renders the combat against them challenging. This situation creates a vicious circle that triggers the use of more chemicals per unit area each year which results in a global pollution threat and a great risk against human health.

The determination of the potential resistance level on natural populations of harmful species is the basic factor to develop more effective and permanent pest control strategies. In this study *Culex pipiens* dominant mosquito species of Turkey, populations were sampled from Muğla, Aydın, İzmir, Balıkesir and Çanakkale provinces that have a coastal site on Aegean Sea and have Mediterranean Climatic conditions, and also from Denizli province that has a relatively mild continental climate. Studied populations were sampled in three different periods. First of these periods was the spring preceding the insecticide application carried throughout

summer season, second period was the fall after the annual mosquito combat activities; and the third period was the spring of the following year.

Gly119Ser and Phe290Val mutation frequencies in genes coding Acetylcholinesterase-1 (AChE-1) enzyme which is the target of the organophosphate and carbamate insecticides were detected through PCR-RFLP method and PASA (PCR Amplification of Specific Alleles) respectively.

As results of the molecular analysis performed through the PCR method the frequency of the two resistance mutations in *ace-1* gene were determined as low and significant seasonal differences were not found.

In order to clarify whether the similarities or differences of resistance mutation frequencies of studied populations are resulting from the insecticide selection pressure peculiar to the population or from migrations between populations, levels of gene flow between populations were detected by screening the samples belonging to the 2. specimen handling periods in terms of RAPD loci which are not subject to insecticide pressure.

For this purpose, 80 RAPD primers were screened on the subpopulations and 45 of them did not created any RAPD band. 35 primers were observed to be producing at least 3 polymorphic bands. 252 loci were detected as a result of 20 primer applications to the 375 sample. Only one of these loci was polymorphic and total polymorphic loci rate is % 99.63. The level of gene flow between populations were evaluated as $Nm = 6.61$ and genetic differentiation between populations ($G_{ST} = 0.07$) was found to be very low. % 96.43 of total genetic variation of studied *Culex pipiens* complex populations come from the genetic diversity within populations. Recommendations for implementation in line with the findings obtained under the study are presented.

Keywords: *Culex pipiens*, Resistance, Ace, PASA, RAPD

ÖNSÖZ

Öncelikle bu tez çalışması konusunun belirlenmesinde ve çalışmalar sırasında bana her konuda yardımcı olan danışmanım sayın Doç. Dr. Belgin GÖÇMEN TAŞKIN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında desteklerini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Vatan TAŞKIN'a ve laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen sayın Yrd. Doç. Dr. Ersin DOĞAÇ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan arkadaşım, hocam sayın Arş. Gör. Taylan DOĞAROĞLU'na teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışmanın bir kısmı TÜBİTAK-KBAG 111T387 no'lu proje tarafından bir kısmı da Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında MUBAP-2011/32 ve 2012/71 no'lu projeleri tarafından desteklenmiştir.

Beni her anlamda koşulsuz destekleyen aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Sivrisineklerin Sistematığı	1
1.2. Sivrisinek Biyolojisi	3
1.2.1. Larva evresi	5
1.2.2. Pupa evresi	6
1.2.3. Ergin dönem.....	7
1.3. Sivrisineklerin Morfolojisi	7
1.4. Sivrisinek Mücadelesi	8
1.4.1. Entegre mücadele	9
1.4.2. Mekanik mücadele	9
1.4.3. Biyolojik mücadele.....	10
1.4.4. Kimyasal mücadele.....	11
1.4.4.1. Kimyasal mücadelede kullanılan insektisitler.....	11
1.5. Direnç Gelişimi	14
1.5.1. Direnç tipleri	15
1.5.1.1. <i>Vigor tolerans</i>	15
1.5.1.2. <i>Davranış direnci</i>	15
1.5.1.3. <i>Fizyolojik direnç</i>	15
1.6. Genetik Belirteçler	18
1.6.1. PCR'a dayalı DNA belirteçleri.....	18

1.7. Çalışmanın Amacı.....	21
2. MALZEME VE YÖNTEM	22
2.1. <i>Culex pipiens</i> Örneklerinin Toplanması	22
2.2. <i>Culex pipiens</i> Örneklerinin Teşhis Edilmesi	28
2.3. Genomik DNA İzolasyonu.....	29
2.4. <i>ace-1</i> Genindeki Gly119Ser ve Phe290Val Mutasyonlarının Saptanması	30
2.4.1. <i>ace-1</i> geninde Gly119Ser mutasyonunun saptanması	30
2.4.2. <i>ace-1</i> geninde Phe290Val mutasyonunun saptanması	33
2.5. Populasyonların RAPD Belirteçleriyle Karakterizasyonları	35
2.5.1. RAPD analizlerinde izlenen strateji.....	35
2.5.2. RAPD primerleri	35
2.5.3. PCR koşulları	36
2.5.4. Verilerin analizi	36
2.5.4.1. <i>Allel sayısı</i>	37
2.5.4.2. <i>Etkili allel sayısı</i>	37
2.5.4.3. <i>Polimorfik lokus oranı</i>	37
2.5.4.4. <i>Heterozigotluk</i>	38
2.5.4.5. <i>G- İstatistiği</i>	38
2.5.4.6. <i>Gen akışı (Nm)</i>	39
2.5.4.7. <i>Genetik uzaklık</i>	39
3. BULGULAR ve TARTIŞMA	41
3.1. <i>ace-1</i> Genindeki Gly119Ser ve Phe290Val Mutasyonlarının Saptanmasına İlişkin Bulgular	41
3.1.1. <i>ace-1</i> geninde Gly119Ser mutasyonunun belirlenmesine ilişkin bulgular	41
3.1.1.1. <i>Birinci toplama dönemine ilişkin bulgular</i>	41
3.1.1.2. <i>İkinci toplama dönemine ilişkin bulgular</i>	44
3.1.1.3. <i>Üçüncü toplama dönemine ilişkin bulgular</i>	48
3.1.2. <i>ace-1</i> geninde Phe290Val mutasyonunun belirlenmesine ilişkin bulgular	52
3.1.2.1. <i>Birinci toplama dönemine ilişkin bulgular</i>	52
3.1.2.2. <i>İkinci toplama dönemine ilişkin bulgular</i>	56
3.1.2.3. <i>Üçüncü toplama dönemine ilişkin bulgular</i>	59
3.1.3. <i>ace-1</i> genindeki direnç mutasyonlarının birlikte değerlendirilmesi	63
3.2. Populasyonların RAPD Belirteçleriyle Karakterizasyonlarına İlişkin Bulgular	66

3.2.1. Seksen RAPD primerinin alt popülasyonda taranmasına ilişkin bulgular	66
3.2.2. RAPD lokuslarına göre popülasyonların genetik yapıları	69
3.2.3. RAPD lokuslarına göre popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik çeşitliliğe ilişkin bulgular	73
3.2.3.1. <i>Polimorfik lokus oranı</i>	73
3.2.3.2. <i>Allel sayısı</i>	73
3.2.3.3. <i>Nei'nin genetik çeşitliliği (Heterozigotluk)</i>	73
3.2.3.4. <i>G-istatistiği</i>	74
3.2.3.5. <i>Gen akış düzeyi (Nm)</i>	74
3.2.3.6. <i>Popülasyonlar arasındaki genetik uzaklık (D_N)</i>	75
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çalışma kapsamında örnekleme yapılan 6 ile ait 25 lokasyon ve bu lokasyonlara verilen popülasyon kodları.....	23
Çizelge 2.2. Tez kapsamında örnekleme yapılan 6 ile ait 25 lokasyonun koordinatları ve yükseklikleri.	24
Çizelge 2.2. (Devam)	25
Çizelge 2.2. (Devam)	26
Çizelge 3.1. Gly119Ser mutasyon frekanslarının her bir dönemdeki il ortalamaları.....	52
Çizelge 3.2. Phe290Val mutasyon frekanslarının her bir dönemdeki il ortalamaları.	63
Çizelge 3.3. Dört bireylik alt popülasyonda taranan 80 OPERON RAPD primeri, baz dizileri, ürettikleri toplam bant sayıları, ürettikleri bantların bant uzunluk aralıkları ve ürettikleri polimorfik bant sayıları.	66
Çizelge 3.3. (Devam)	67
Çizelge 3.3. (Devam)	68
Çizelge 3.4. Primerler tarafından üretilen toplam bant ve toplam polimorfik bant sayıları.	69
Çizelge 3.5. RAPD lokuslarına göre, çalışılan popülasyonlardaki popülasyon içi ve popülasyonlar arası çeşitliliğe ilişkin genetik parametreler.	74
Çizelge 3.6. Tüm RAPD lokuslarına ait ortalama örnek sayısı, gözlenen ortalama allel sayısı (N_a), ortalama etkili allel sayısı (N_e), Nei'nin genetik çeşitliliği (h).....	74
Çizelge 3.7. RAPD belirteçleriyle hesaplanan gen çeşitliliği, genetik farklılaşma ve gen akış değerleri.	75
Çizelge 3.8. RAPD lokuslarına göre çalışılan popülasyonlar arasındaki genetik uzaklık (D_N) değerleri (Nei 1978).....	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye’deki sivrisinekler (Aldemir, 1997).	2
Şekil 1.2. Sivrisineklerin yaşam döngüsü (Anonim, 1996).	4
Şekil 1.3. <i>Culex pipiens</i> ’e ait yumurta görüntüleri (Anonim, 2001). a, b ve d <i>Culex pipiens</i> yumurta paketlerini, c ise bir yumurta paketinin bırakılış anını göstermektedir.	5
Şekil 1.4. <i>Culex pipiens</i> ’e ait larva görüntüsü (Anonim, 2008). a: <i>Culex pipiens</i> larvasının vücut kısımları; b: <i>Culex pipiens</i> larvasının sudaki duruş pozisyonu.	6
Şekil 1.5. <i>Culex pipiens</i> ’e ait pupa görüntüsü (Krebs, 2010).	7
Şekil 1.6. Sivrisineğin morfolojik yapısı (Anonim, 2011).	8
Şekil 1.7. Mekanik mücadele yöntemlerinden biri (Anonim, 2010).	10
Şekil 1.8. Sivrisinek mücadelesinde kullanılan tür olan <i>Gambusia affinis</i> (Anonim, 2006).	11
Şekil 1.9. Sivrisinek mücadelesinde kullanılan organofosfat grubu bazı insektisitlerin kimyasal formülleri (Anonim, 2010).	12
Şekil 1.10. Sivrisinek mücadelesinde kullanılan karbamat grubu bazı insektisitlerin kimyasal formülleri (Anonim, 2010).	12
Şekil 1.11. Sivrisinek mücadelesinde kullanılan organoklorin grubu bazı insektisitlerin kimyasal formülleri (Anonim, 2010).	13
Şekil 1.12. Sivrisinek mücadelesinde kullanılan piretroid grubu bazı insektisitlerin kimyasal formülleri (Anonim, 2010).	13
Şekil 1.13. Genetik belirteçlerin sınıflandırılması.	18
Şekil 1.14. RAPD tekniğinin şematik gösterimi (Ben Hui Lui, 1998).	20
Şekil 2.1. Örneklemeye yapılan lokasyonlar.	23
Şekil 2.2. Larva yakalama kepçesiyle gerçekleştirilen toplama işlemine ilişkin görüntü.	27
Şekil 2.3. <i>Culex pipiens</i> larvalarının mikroskop altında seçiminde kullanılan vücut kısımları (Anonim, 2009).	28
Şekil 2.4. <i>Culex</i> ergin bireylerinin mikroskop altında seçiminde kullanılan vücut kısımları (Anonim, 2009).	29
Şekil 2.5. Pop-21’in üçüncü dönem örneklerinin <i>ace-1</i> genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre direnç durumları.	31
Şekil 2.6. <i>ace-1</i> genine ait baz dizisinin FinchTV programında açılarak görsel olarak kontrol edilmesi.	32
Şekil 2.7. <i>ace-1</i> geninde mutasyon bölgesinin FinchTV programında açılarak görsel olarak kontrol edilmesi.	33

Şekil 2.8. <i>ace-1</i> genine ait dizilerin MEGA programında hizalanması ve mutasyon bölgesinin incelenmesi.....	33
Şekil 2.9. <i>ace-1</i> genine ait dizilerin MEGA programı kullanılarak aminoasit dizine çevrilmesi ve mutasyon bölgesinin incelenmesi.	33
Şekil 2.10. PASA yöntemi kullanılarak yapılan çalışmanın sonucunu gösteren örnek jel görüntüsü.	34
Şekil 3.1. <i>ace-1</i> geninde Gly119Ser mutasyonu için birinci dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumları.	43
Şekil 3.2. <i>ace-1</i> genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre illerin birinci dönem populasyonları için direnç durumları.	44
Şekil 3.4. <i>ace-1</i> geninde Gly119Ser mutasyonu için ikinci dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumları.	47
Şekil 3.5. <i>ace-1</i> genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre illerin ikinci dönem populasyonları için direnç durumları.	47
Şekil 3.6. İkinci toplama dönemi için <i>ace-1</i> genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları.....	48
Şekil 3.7. <i>ace-1</i> geninde Gly119Ser mutasyonu için üçüncü dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumları.	50
Şekil 3.8. <i>ace-1</i> genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre illerin üçüncü dönem populasyonları için direnç durumları.	51
Şekil 3.9. Üçüncü toplama dönemi için <i>ace-1</i> genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları.....	51
Şekil 3.10. Gly119Ser mutasyon frekanslarının her bir dönemdeki il ortalamalarının grafiksel gösterimi.	52
Şekil 3.11. <i>ace-1</i> geninde Phe290Val mutasyonu için birinci dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumları.	54
Şekil 3.12. <i>ace-1</i> genindeki Phe290Val mutasyonuna göre illerin birinci dönem populasyonları için direnç durumları.	55
Şekil 3.13. Birinci toplama dönemi için <i>ace-1</i> genindeki Phe290Val mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları.....	56
Şekil 3.14. <i>ace-1</i> geninde Phe290Val mutasyonu için ikinci dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumları.	58
Şekil 3.15. <i>ace-1</i> genindeki Phe290Val mutasyonuna göre illerin ikinci dönem populasyonları için direnç durumları.	59
Şekil 3.16. İkinci toplama dönemi için <i>ace-1</i> genindeki Phe290Val mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları.....	59
Şekil 3.17. <i>ace-1</i> geninde Phe290Val mutasyonu için üçüncü dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumları.	61
Şekil 3.18. <i>ace-1</i> genindeki Phe290Val mutasyonuna göre illerin üçüncü dönem populasyonları için direnç durumları.	62

Şekil 3.19. Üçüncü toplama dönemi için <i>ace-1</i> genindeki Phe290Val mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları.....	62
Şekil 3.20. Phe290Val mutasyon frekanslarının her bir dönemdeki il ortalamalarının grafiksel gösterimi.	63
Şekil 3.21. OPI-11, OPI-13, OPI-16, OPP-16 ve OPC-19 primerlerinin 4 bireylik alt popülasyonda taranması sonucu elde edilen jel görüntüsü.	69
Şekil 3.22. Pop-2 (Aydın-Söke Popülasyonu)’ye ait bireylerin çalışılan 10 primer ile sonuçları.	72
Şekil 3.23. RAPD lokuslarına göre çalışılan popülasyonlar arasında saptanmış olan genetik uzaklık (DN) değerleri ile UPGMA kullanılarak oluşturulan dendrogram.	76

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
mM	Milimolar
M	Molar
pmol	Pikomol
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
pH	Potansiyel hidrojen
Bç (bp)	Baz çifti
Kb	Kilo baz
DDT	Diklor difenil trikloretan
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA
RFLP	Kesilen parçaların uzuluk polimorfizmi
rpm	Dakikadaki devir sayısı
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
OP	Organofosfat
CB	Karbamat
OCL	Organoklorür
GABA	γ-aminobütirik asit
<i>ace</i>	Asetilkolinesteraz geni (acetylcholinesterase gene)
<i>rdl</i>	Dieldrin direnç geni (resistance to dieldrin gene)
<i>vssc</i>	Voltaja duyarlı sodyum kanal proteini geni (voltage sensitive sodium channel gene)
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
MgCl ₂	Magnezyum klorür
RNaz	Ribonükleaz
Gly	Glisin

Ser	Serin
Ala	Alanin
Leu	Lösin
Phe	Fenilalanin
Cys	Sistein
SS	Homozigot duyarlı
RS	Heterozigot dirençli
RR	Homozigot dirençli
Pop	Populasyon
<i>kdr</i>	Ani düşüş direnci mutasyonu (Knockdown resistance mutation)
V	Volt
<i>N_a</i>	Gözlenen allel sayısı
<i>N_e</i>	Etkili allel sayısı
<i>h</i>	Nei (1973)'nin genetik çeşitlilik değeri (Heterozigotluk)
<i>N_m</i>	Gen akışı
<i>D_N</i>	Genetik uzaklık
<i>D_{ST}</i>	Populasyonlar arası genetik çeşitlilik
<i>H_S</i>	Populasyon içi genetik çeşitlilik
<i>H_T</i>	Toplam genetik çeşitlilik
<i>G_{ST}</i>	Genetik farklılaşma katsayısı (Genetic differentiation coefficient)

1. GİRİŞ

Sivrisinekler, insan ve hayvanlardan kan emmelerinin yanı sıra malarya, sarıhumma, denk humması, filaryaz ve arboviral ensefalitler gibi önemli birçok enfeksiyonun vektörlüğünü yapmaları açısından önemlidir (Öter, 2007). Günümüzde bilinen 182 arbovirüs enfeksiyonundan 147'si sivrisinekler tarafından taşınır ve bulaştırılırlar (Ramsdale and Snow, 1995).

Ödem ve alerji durumları sivrisinek erginlerinin sokma aktivitesiyle insanlarda oluşturdukları etkilerin başında gelmektedir ve sokma işlemi sadece dişi sivrisinekler tarafından yapılır. Emilecek kanın pıhtılaşmasını önlemek amacıyla sokulan noktaya tükürük salgısı akıtılır ve böylece sokulan bölgede kaşıntı ve kızarıklık gerçekleşir (Alten ve Çağlar, 1998).

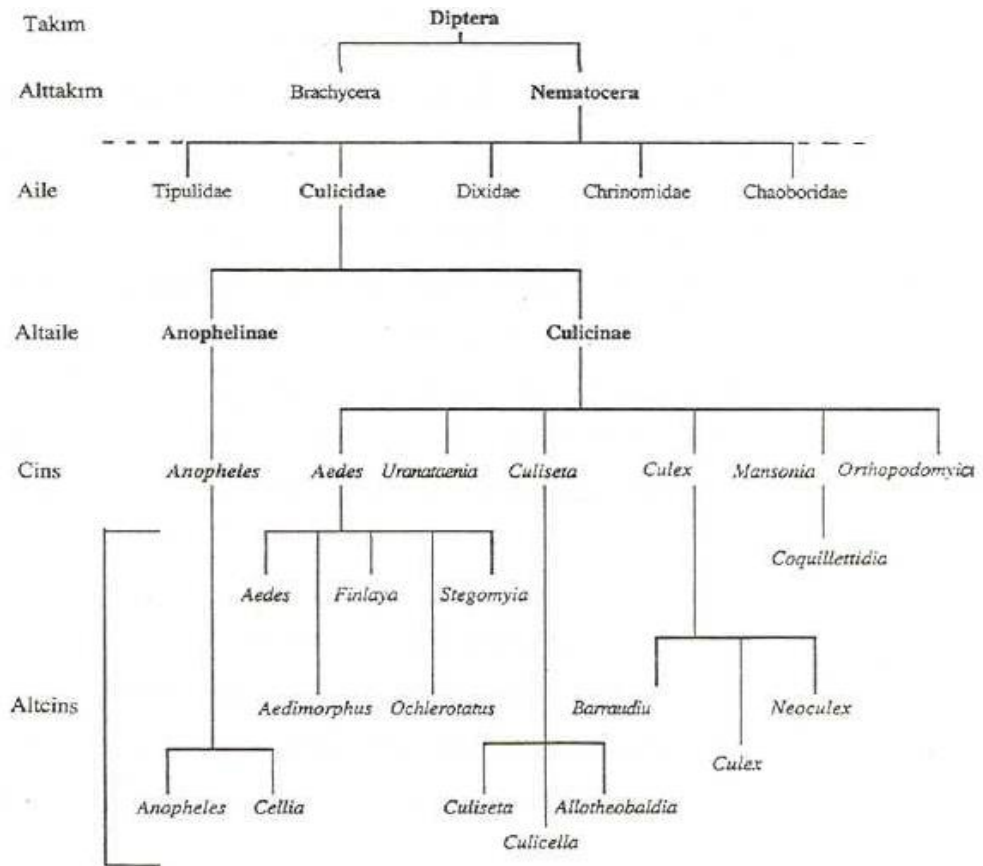
Türkiye'de günümüzde sivrisinekler tarafından bulaştırılan ve dünya üzerinde çok geniş bir bölümde etki eden diğer birçok tehlikeli hastalık açısından ciddi bir risk durumu söz konusu değildir. Ancak vektör-parazit-konak üçlüsünün bir araya gelmesi ve iklimsel faktörlerin de elverişli olması durumunda risk faktörünün artması olasıdır (Alten ve Çağlar, 1998). Kuzey Amerika'dan Avrupa kıtasına, oradan da Yunanistana kadar ulaşan *Aedes albopictus*'un Yunanistan'daki populasyonlarında 1996 yılından itibaren görülen artış bu tehlikenin boyutlarının anlaşılması açısından önemlidir (Çağlar ve Skavdis, 2008).

1.1. Sivrisineklerin Sistematigi

Arthropoda Şubesi, Insecta Sınıfı, Diptera Takımı, Nematocera Alt Takımı, Culicidae Familyası içerisinde incelenen sivrisinekler dünya üzerinde 3546 tür ve alt tür ile temsil edilmektedirler (Alten ve Çağlar, 1998). Culicinae alt familyası, *Culex*, *Aedes*, *Uranotaenia*, *Culiseta*, *Ochlerotatus*, *Orthopodomyia*, *Coquillettidea* gibi bazı

cinsleri kapsamaktadır (Merdivenci, 1984; Becker ve ark., 2003; Çağlar ve Skavdis, 2008).

Türkiye sahip olduğu iklimsel ve diğer ekolojik özellikleri nedeniyle 8 cinse ait toplam 50 sivrisinek türünün üremesi ve yaşaması için uygun ortamlara sahiptir. Bu türler, *Ochleratus* (15 tür), *Culex* (13 tür), *Anopheles* (10 tür), *Culiseta* (6 tür), *Aedes* (3 tür), *Coquillettidia* (1 tür), *Orthopodomyia* (1 tür), *Uranotaenia* (1 tür) cinslerinin altında bulunmaktadır (Ramsdale ve ark., 2001; Çağlar ve Skavdis, 2008). Bunlar arasında *Culex pipiens* gerek kırsal gerekse de kentsel alanlarda en yaygın olanıdır (Akıner ve ark., 2009). Ülkemizde bulunan sivrisinekler Şekil 1.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Türkiye'deki sivrisinekler (Aldemir, 1997).

Culex pipiens bir kompleks olup, Holarktik Bölge'de *C. pipiens pipiens*, *C. pipiens molestus*, *C. pipiens quinquefasciatus*, *C. pipiens pallens*, *C. pipiens resturans* ve *C. torrentium* olarak ayrılırlar. Avustralya'ya ait iki alt tür olan *C. pipiens australicus*

ve *C. pipiens golobocoxitus* da bu gruba dahil edilmektedir (Smith ve Fonseca, 2004; Çağlar ve Skavdis, 2008).

Culex pipiens kompleksinin üyeleri birbirlerinden önemli ölçüde farklılaşmış davranışsal ve fizyolojik özellik gösteren temel iki gruba ayrılmalarına karşın (Huang ve ark. 2008), bu kompleksin üyelerinin morfolojik yöntemlerle ayrımı uzun süren ve en önemlisi de çoğunlukla sadece ergin erkek bireylere uygulanabilir yöntemlere dayanmaktadır (Brownie ve ark., 1997). Bu nedenle, genel olarak bu kompleksin üyelerinin morfolojik ayrımlarının imkansız olduğu kabul edilmekte olup (Huang ve ark. 2008), asetilkolinesteraz-2 (*ace-2*) lokusunun 2. intron bölgesindeki polimorfizmler kullanılarak geliştirilmiş olan PCR'a dayalı bir seri hızlı testle bu kompleksin üyelerinin moleküler olarak ayrımları yapılabilmektedir (Smith ve Fonseca, 2004).

Tropikal, subtropikal ve ılıman iklim kuşaklarında yaygın olan sivrisineklerde endemizm görülmemektedir (Alten ve Çağlar, 1998). Sivrisineklerin doğadaki yayılışında büyük denizler, yüksek dağlar ve geniş çöller gibi coğrafik engeller sınırlayıcı faktörlerdir (Alten, 1991). Otostopçu türler olarak bilinen sivrisinekler uluslararası hava alanları arasında bile taşınabildikleri için bu engellere rağmen çok uzak bölgelere ulaşabilirler (Highton ve Van Someren, 1970).

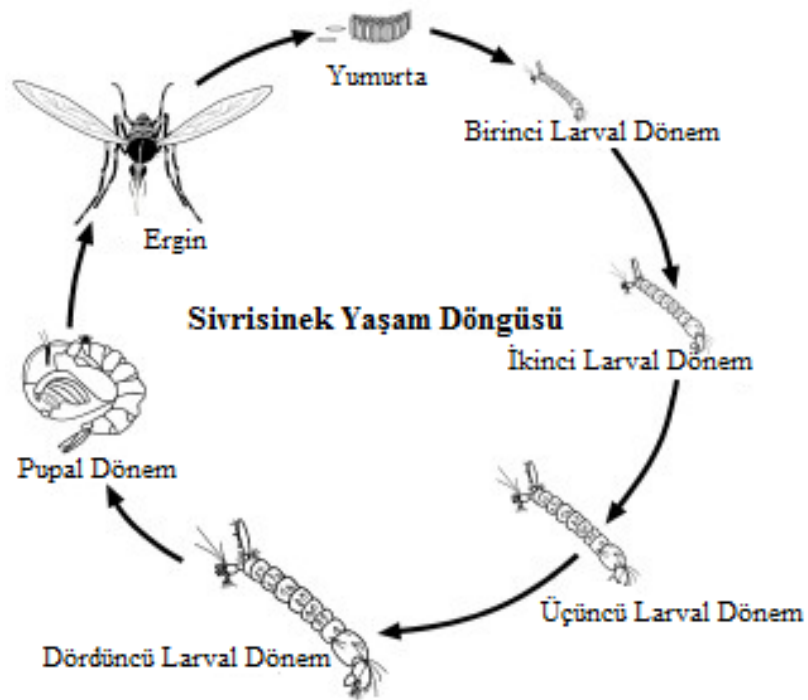
1.2. Sivrisinek Biyolojisi

Sivrisineklerin üreme alanları genellikle göl, bataklık, havuz, su kuyusu, çeşme yalıkları, hayvan ayak izleri, terkedilmiş araç lastikleri gibi yumurtaların bırakılmasına ve larvaların gelişmesine uygun olan sulak veya nemli alanlardır. Hemen hemen her çeşit durgun su ortamı ve 40 cm/sn'den daha düşük bir hızla akan sular uygun üreme alanlarıdır (Merdivenci, 1984).

Yumurtaların olgunlaşabilmesi için gerekli olan proteinin sağlanabilmesi amacı ile kan emen dişli sivrisinekler aynı zamanda nektar ile de beslenebilirlerken erkek sivrisinekler kan emmezler. Hayvancıl (zoophile) türler sadece hayvanlardan, insancıl (anthrophile) türler daha çok insandan, hayvancıl-insancıl (zoo-anthrophile)

sivrisinek türleri ise her iki gruptanda kan emerler. Ayrıca kuşlardan kan emenlere ornitofil, kurbağa ya da sürüngenlerden kan emenlere ise batrokofil denir (Alten ve Çağlar, 1998).

Sivrisinekler holometabol böceklerdir. Yani tam başkalaşım gösterirler. Şekil 1.2.'de gösterildiği gibi hayat döngülerinde dört dönem bulunmaktadır: Yumurta, larva, pupa, ergin. Larvalar yumurtadan çıktıktan sonra dört larval evre geçirirler. Ardından pupa evresi gelir. Bu dönemde ergine ait olan organlar ve vücut kısımlar ortaya çıkar. Sivrisineklerde yumurtadan ergine kadar olan süre yaklaşık olarak 10-20 gündür (Alten ve Çağlar, 1998).

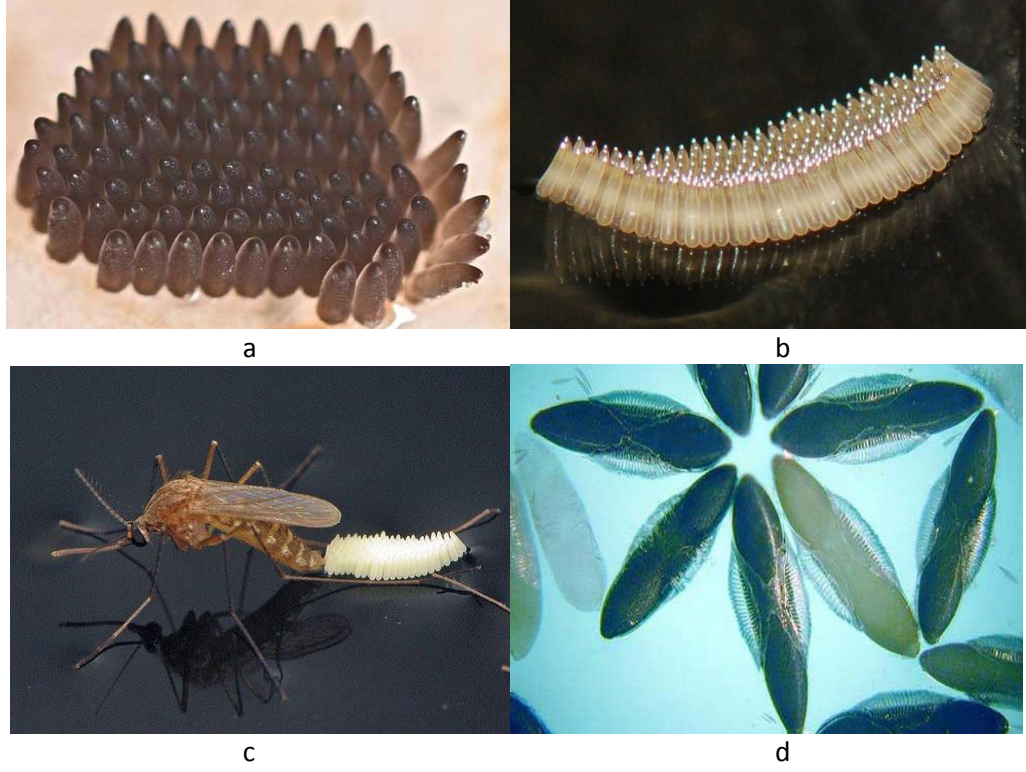


Şekil 1.2. Sivrisineklerin yaşam döngüsü (Anonim, 1996).

1.2.1. Yumurta evresi

0.6-1 mm boyunda olan sivrisinek yumurtaları bir ucu sivri, diğer ucu daha küt olan iğ şeklinde yapılardır. Yumurtalarının farklı olmasından dolayı cinsler ve türler birbirlerinden ayrılabilirler. Sivrisineklerin tek tek ya da paket olmak üzere genel olarak iki tip yumurta bırakma şekilleri vardır. *Anopheles* yumurtaları iki yanda yumurtanın su yüzeyinde yüzmesini sağlayan zarımsı yüzgeçlere sahiptir (Alten ve

Çağlar, 1998). *Culex* türlerinin yumurtaları paket halinde su yüzeyinde sal gibi yüzerler. Yumurtaların açılma süresi türlere, iklimsel koşullara, sınırlayıcı faktörlere, suyun fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre farklılık gösterir (Alten, 1993; Şimşek, 1997). *Culex* türleri bir seferde 100-200 arası yumurta bırakabilirler (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. *Culex. pipiens*'e ait yumurta görüntüleri (Anonim, 2001). a, b ve d; *Culex pipiens* yumurta paketlerini, c ise bir yumurta paketinin bırakılış anını göstermektedir.

1.2.1. Larva evresi

Birinci evre larvalar ortalama 0.5-1 mm olup dördüncü evrede 5-15 mm boyuna ulaşırlar. Larvalar üzerinde simetrik olarak dizilmiş kıl veya kıl demetleri bulunmaktadır. Bu kılların şekilleri ve dizilimleri tür tayininde önemli rol oynar (Marshall, 1938). Ayrıca larvalarda bulunan sifon kıl demetleri, anten kıl demetleri gibi yapılar sivrisinek tür tayin çalışmalarında kullanılırlar.

Larvalar genel olarak baş, gövde ve karın olmak üzere üç ana kısımda incelenirler. Sivrisinek larvalarının temel besinleri sudaki mikroorganizma ve organik partiküllerdir. Larvalar nefes almak için sık sık su yüzeyine çıkmak zorundadırlar.

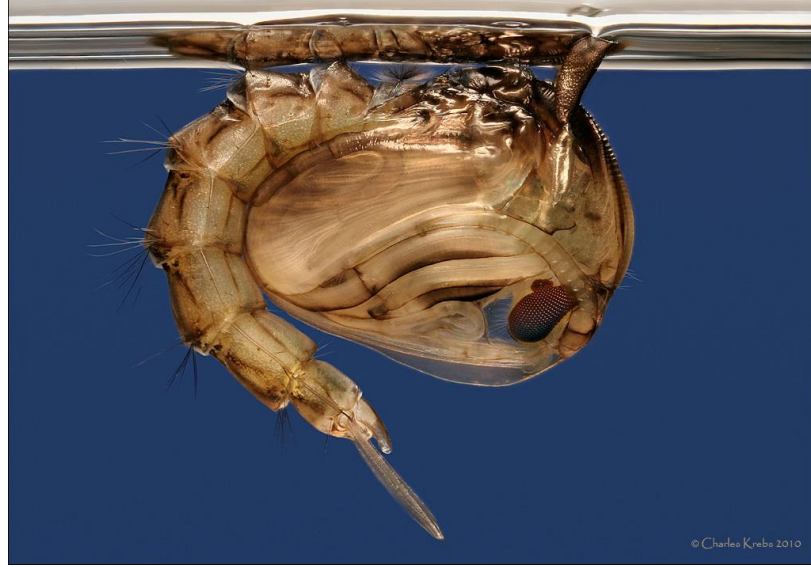
Anophelinae üyeleri suyun yüzeyinde yatay durumda nefes alırken, Culicinae üyeleri nefes alırken vücutlarını suyun yüzeyine eğik pozisyonda tutarlar (Merdivenci, 1984). Sivrisinek larvası ortamdaki besin miktarına, suyun sıcaklığına ve türe bağlı olarak ortalama 7-16 günde pupa evresine geçer (Alten ve Çağlar, 1998). *Culex pipiens* larvasının vücut kısımları Şekil 1.4.'te verilmiştir.



Şekil 1.4. *Culex pipiens*'e ait larva görüntüsü (Anonim, 2008). a: *Culex pipiens* larvasının vücut kısımları; b: *Culex pipiens* larvasının sudaki duruş pozisyonu.

1.2.2. Pupa evresi

Her dipter gibi sivrisinekler de pupa evresinde beslenmez ancak diğer Diptera üyelerinden farklı olarak sivrisinek pupaları inaktif değildir ve çok hızlı tepkiler verebilirler (Şekil 1.5.). Pupal evrede metamorfoz şekillenmektedir. Pupalar genelde 3-5 gün içinde ergin hale geçerler (Marshall, 1938).



Şekil 1.5. *Culex pipiens*'e ait pupa görüntüsü (Krebs, 2010).

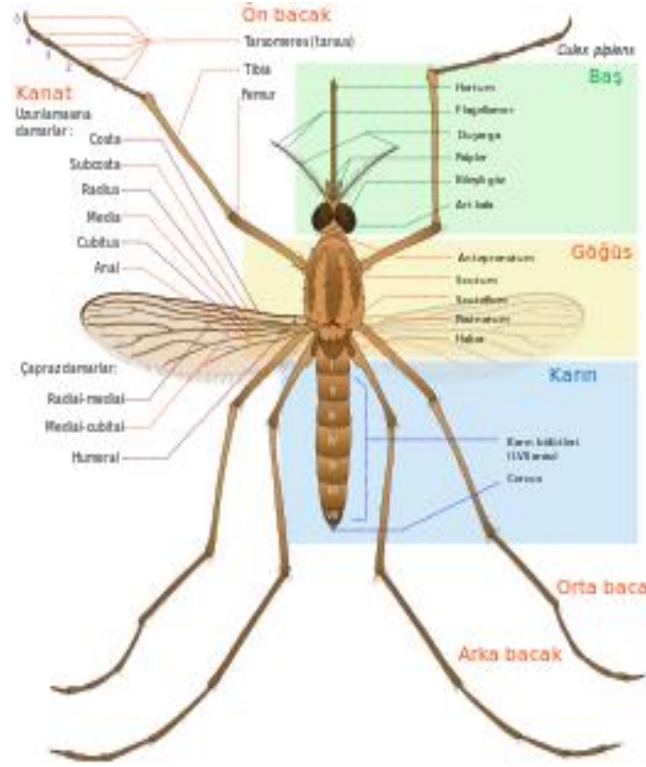
1.2.3. Ergin dönem

Pupadan çıkan ergin, birkaç dakika içinde beslenme arayışına girer. Dişi bireyler yumurta oluşumunda gerekli olan protein ihtiyacını karşılamak için kan emerler (Marshall, 1938; Merdivenci, 1984). Erkek sivrisinekler ise genelde çiçek nektarlarıyla beslenirler ve kan emmezler. Diyapoz sadece dişi erginlerde görülür (Marshall, 1938).

1.3. Sivrisineklerin Morfolojisi

Sivrisineklerin vücutları baş, torax ve abdomen olmak üzere üç bölüme ayrılmıştır (Şekil 1.6.). Boyları 3-8 mm kadardır. Başın iki yanında antenleri vardır. Baş yuvarlaktır ve boyunla toraxa bağlanmıştır. Bir çift bileşik göz vardır. Ağız yapısı 6 iğneli sokucu-emici tarzdadır. Erkeğin antenleri çok tüylü olması özelliği ile dişilerden ayrılır. Toraxtaki pul ve kılların rengi ve dizilişi türler arasında farklılık gösterir. Kanatları torax kısmında ince ve şeffaftır (Şekil 1.7.). Sivrisinekler abdomenlerinde, onlara kendi ağırlıklarından fazla kan emme şansı tanıyacak biçimde esnek bir deriye sahiptir. Böylece şişerler ama patlamazlar. Kan emerek beslenen sivrisinek çok mükemmel bir pompalama mekanizması kullanır. Başının

içi, tümüyle kaslarla kaplı boşluklar şeklinde dizayn edilmiştir. Buradaki kaslar kasılıp gevşediklerinde sineğin kan emme borusunun iki ucu arasında 1–2 atmosferlik basınç farkı oluşur ve kan saniyede 5 metrelik bir hızla yükselmeye başlar (Silver, 2008).



Şekil 1.6. Sivrisineğin morfolojik yapısı (Anonim, 2011).

1.4. Sivrisinek Mücadelesi

İnsanlara hastalık taşıyan vektörlerle mücadele, dünyanın her yerinde ülkelerin ve yönetimlerin ekonomilerinin elverdiği ölçülerde ve zaman zaman uluslararası kuruluşların desteği sağlanarak yürütülmektedir (Alten ve Çağlar, 1998).

Vektör kontrol yöntemleri kuşkusuz ki zararlıların türüne göre değişim göstermektedir. Günümüzde uygulanan vektörlerle mücadele yöntemleri; mekanik (fiziksel), biyolojik, kimyasal ve bunların tümünü içeren entegre mücadele olarak dört başlık halinde incelenir (Alten ve Çağlar, 1998).

1.4.1. Entegre mücadele

Sivrisinek mücadelesi asla kısa vadeli düşünülmemelidir. Biyolojik potansiyeli yüksek bir vektör ile mücadele, ancak iyi planlanmış, bilimsel esaslara dayanan, temkinli ve geniş boyutlu entegre mücadele programlarıyla gerçekleştirilebilir. Mücadelenin yapılacağı bölgenin özelliklerine göre değişmekle birlikte, entegrasyonun genelde altı ana başlık altında toplandığı görülür. Bunlar;

1. Çalışma bölgesinin tespiti
2. Topografik, vejetasyon ve hidrojeolojik yönden farklı pilot alanların seçimi
3. Populasyon yoğunluğunun belirlenmesi
4. Entegre Mücadele yöntemlerinin uygulanması
 - Mekanik Mücadele
 - Biyolojik Mücadele
 - Kimyasal Mücadele
5. Uygulamalardan elde edilen verilerin değerlendirilmesi
6. Sonuç (Alten, 1997).

1.4.2. Mekanik mücadele

Mekanik mücadelede temel amaç, fiziksel altyapının düzeltilmesi yoluyla vektör canlıının üreme ve beslenme habitatlarını ortadan kaldırılmasıdır. Sivrisinek üreme habitatlarını oluşturan toplama ve drenaj kanalları, kuyular, foseptikler, havuzlar, taşkın sahaları gibi alanlarda ıslah çalışmaları yapmak, buraları sivrisineğin üremesine uygun olmaktan çıkarmak ve bu düzenlemelerde kalıcılığı sağlamak, mekanik mücadelenin temelini oluşturmaktadır (Alten ve Çağlar, 1998). Işık kullanılarak oluşturulan bir tuzak Şekil 1.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Mekanik mücadele yöntemlerinden biri (Anonim, 2010).

1.4.3. Biyolojik mücadele

Biyolojik kontrol, çevreye çok az ya da hiç zarar vermeyen sürdürülebilir bir kontrol yöntemidir. Günümüzde belli başlı birkaç grup organizmadan biyolojik kontrol ajanı olarak faydalanılmaktadır. Bunlar: Bakteriler, Funguslar, Protozoalar, Virüsler, Nematodlar ve Predatör organizmalardır. Örneğin; *Bacillus thuringiensis* bakterisi sivrisinek, karasinek ve kelebek larvalarına etkilidir. *Zygomycetes entomoptera* gibi pek çok değişik mantar türü sivrisinek mücadelesinde etkilidir. Bir prortozoon olan *Monomorphia microsporidia* anofel larva ve erginlerinde enfeksiyon yaratarak ölmelerine ya da hastalık taşıma yeteneklerinin kaybolmasına sebep olur. Biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan virüsler ise larva epitelinden girerek 48 saat içinde sivrisineklerin ölümüne neden olurlar. *Gambusia* cinsi balıklar ise sivrisinekler larvalarını yerler (Alten ve Çağlar, 1998). Biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan *Gambusia affinis* (sivrisinek balığı) türü balık Şekil 1.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Sivrisinek mücadelesinde kullanılan tür olan *Gambusia affinis* (Anonim, 2006).

1.4.4. Kimyasal mücadele

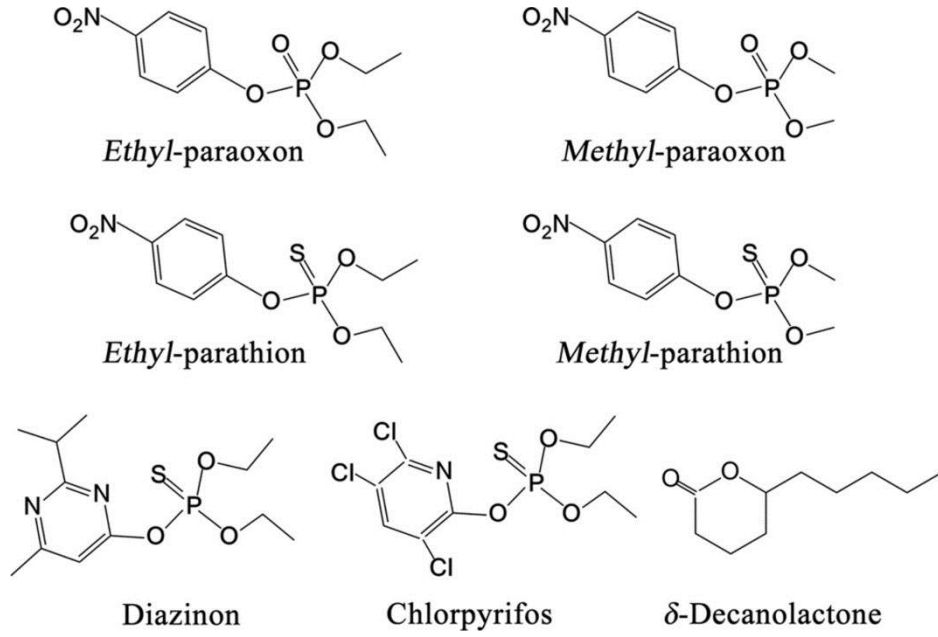
En kısa sürede ve en etkili biçimde sonuç sağlayan mücadele tipidir. Eski Yunan’da 3000 yıl önce sülfür, Çin’de ise 900 yıl önce tarım zararlılarına karşı arsenik kullanımıyla kayıtlara geçen kimyasal mücadele, 20.yüzyılın başlarından itibaren yeni kimyasalların geliştirilmeye başlanmasıyla hız kazanmıştır (Kuyucu, 2007).

Sivrisinek ve diğer önemli vektörlerle mücadelede ilk kez sentetik organik insektisitlerden dinitro-o-cresol’ün 1892’de kullanıldığı bilinmektedir (İmamzade, 2008). 1939’da keşfedilen dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) ise o zaman için eşsiz bir mücadele unsuru olarak görülmüş ve bu alanda büyük bir devrim sayılmıştır. 1950 ve 1960’lı yılların başlarında pek çok ülkede geniş ölçekli DDT uygulamalarına başlanmıştır. Ancak, hızlı direnç gelişimi kısa süre içinde yeni kimyasalların geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. 1960 ve 1970 yılları arasında fotostabil pyrethroidler geliştirilmiştir (İmamzade, 2008). Ülkemizde ise, 1970’lerde DDT ve OP grubu insektisitlerden olan malathion yaygın olarak kullanılmış, DDT’nin kullanımı 1980’lerin, malathionun kullanımı ise 1990’ların başlarında sonlandırılmıştır (Kuyucu, 2007).

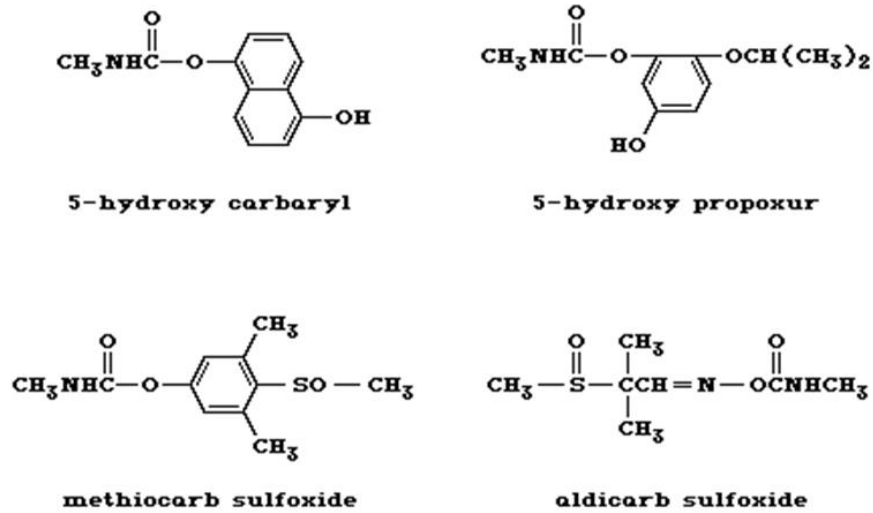
1.4.4.1. Kimyasal mücadelede kullanılan insektisitler

Günümüzde kullanılan ve en yaygın olan sınıflandırma yöntemi, insektisitleri kimyasal yapılarına göre sınıflandırmadır. Bazı bileşik grupları aktif içerik yapısına göre isimlendirilir. Buna göre başlıca; organofosfatlar (OP), karbamatlar (CB),

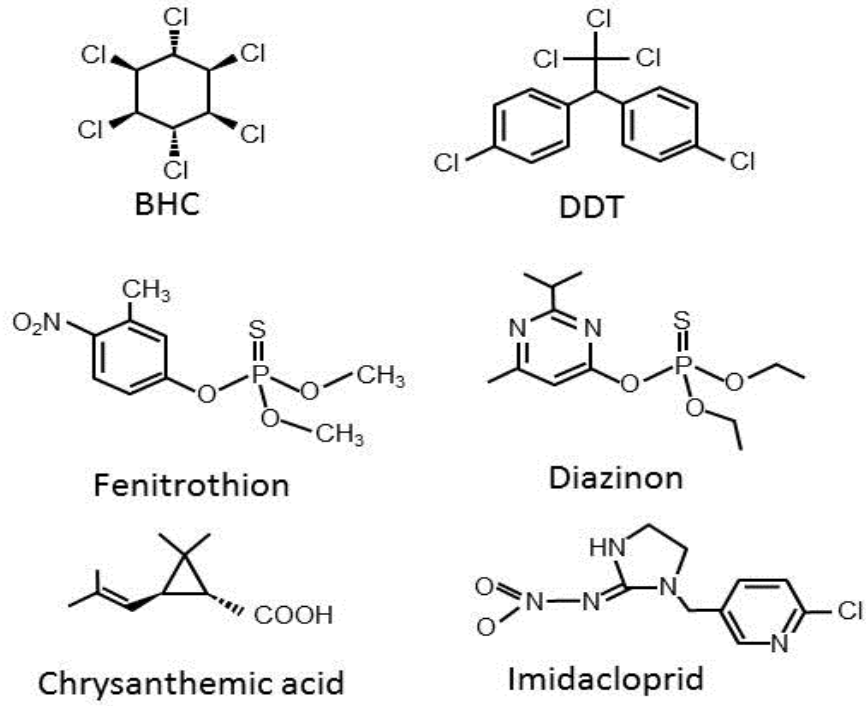
organoklorinler (OCL) ve pyrethroidler olmak üzere dört grup insektisit bulunmaktadır. Bunlara ek olarak gelişim düzenleyiciler (juvenil hormon analogları) ve biyolojik preparatlar da iki ayrı grup insektisit olarak sınıflandırılabilir (Alten ve Çağlar, 1998; Matsumura, 1985; Pedigo, 1996). Sivrisinek mücadelesinde kullanılan organofosfat, karbamat, organoklorin ve pyrethroid grubu insektisitlerden bazılarının kimyasal yapıları sırasıyla Şekil 1.9., 1.10., 1.11. ve 1.12.'de sunulmuştur.



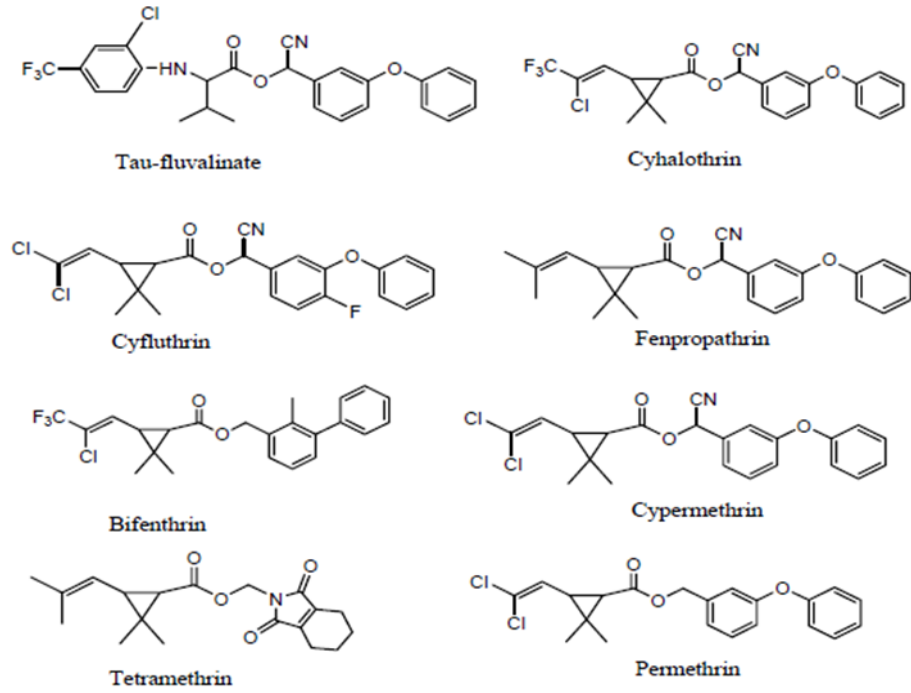
Şekil 1.9. Sivrisinek mücadelesinde kullanılan organofosfat grubu bazı insektisitlerin kimyasal formülleri (Anonim, 2010).



Şekil 1.10. Sivrisinek mücadelesinde kullanılan karbamat grubu bazı insektisitlerin kimyasal formülleri (Anonim, 2010).



Şekil 1.11. Sivrisinek mücadelesinde kullanılan organoklorin grubu bazı insektisitlerin kimyasal formülleri (Anonim, 2010).



Şekil 1.12. Sivrisinek mücadelesinde kullanılan piretroid grubu bazı insektisitlerin kimyasal formülleri (Anonim, 2010).

Kimyasal insektisitlerin hepsi nörotoksik olup, hedef organizmaların sinir sistemlerine etki ederler. Böceklerin merkezi sinir sistemleri (MSS) çok gelişmiş olup, memelilerinkine benzer. Aynı şekilde perifer sinir sistemleri (PSS) de memelilerle benzerlik gösterir. Bu nedenle insektisitlerin toksik etki mekanizmaları ve hedef aldıkları organlar bütün türlerde aynıdır (Kurt, 2013).

1.5. Direnç Gelişimi

Sivrisinekler insan sağlığı açısından önemli hastalık etmenlerinin taşınmasından sorumlu vektörler olmaları ve en azından çoğu insana verdikleri rahatsızlık nedeniyle insektisitlerle mücadeleye en fazla maruz bırakılan organizmalar arasındadır. Sivrisineklere karşı kimyasal pestisitlerin son derece yaygın ve yüksek oranda kullanımı, pestisitlerin çok yüksek bir seçim baskısı oluşturduğu ortamlarda evrimsel süreçlerin bir sonucu olarak, sivrisinek popülasyonlarında pestisitlere direnç gelişimini beraberinde getirmektedir. Dünyanın pek çok bölgesinde hem tarımsal üretim konusunda hem de vektörel kaynaklı hastalıkların kontrolünde önemli bir engel teşkil eden direnç, pestisit uygulanan canlılarda pestisite karşı cevap azalması olarak tanımlanabilir (Kuyucu, 2007). Direnç başka bir ifadeyle tanımlandığında, popülasyonlarda oluşan rastgele mutasyonlarla az miktarda bireyin kazandığı özellikler sonucu, normalde öldürücü olan dozlara karşı hayatta kalmayı sağlayan bir adaptasyondur (Kence, 1988).

İnsektisit direncine ilişkin ilk kayıt, Malender (1988) tarafından bildirilen San Jose kabuklu biti *Quadraspidiotus perniciosus* (Comstock, 1881) (Homoptera: Diaspididae)'da sülfür uygulamasına karşı geliştiği şeklindedir. Bu tarihten itibaren 11 Arthropod türünde de direnç geliştiği bildirilmesine karşın, dirençli tür sayısı özellikle, İkinci Dünya Savaşından sonra sentetik kimyasalların üretiminin hızlı artışına paralel olarak devamlı olarak artmıştır (Kence, 1988).

1.5.1. Direnç tipleri

Vektör canlılarda genel olarak üç tip dirençten bahsedilebilir. Bunlar sırasıyla; (1) Vigor tolerans, (2) Davranış direnci ve (3) Fizyolojik (metabolik) direnç olarak sayılabilir (Özer, 2001).

2.1.1.1. Vigor tolerans

Özel bir direnç genine sahip olmaksızın, kullanılan insektisit popülasyon üzerindeki baskısının artmasına bağlı olarak direncin artmasıdır. Bu durum büyük vücutluluk, kalın kutikula ve artan yağ oranı gibi mevsimsel varyasyonlar sonucu (morfo-fizyolojik karakterlerin varyasyonu) olabilir. İşlevsel olarak ana direnç tipinin varlığında canlıya daha fazla oranda direnç sağladığı düşünülür (Özer, 2001).

2.1.1.2. Davranış direnci

Canlının doğal davranışı ya da davranış modifikasyonları ile temas yüzeyinden sakınma veya kontak süresini azaltma şeklinde olan direnç tipidir. Davranış direncinde önemli olan, irritantlara karşı gösterilen iritabilitedir. Bu tip direnç vigor tolerans benzeri etkiye sahip değildir (Georghiou, 1986; Özer, 2001).

2.1.1.3. Fizyolojik direnç

Vektör canlılarda genetik, biyokimyasal ve fizyolojik direnç en önemli direnç mekanizmalarını içerir. Bakterilerde, funguslarda, bitkilerde, böceklerde ve omurgalılarda benzer direnç mekanizmaları gözlenmiştir. Bunlar hedef bölgelerdeki değişimleri, arttırılmış detoksifikasyon hızlarını, azaltılmış pestisit alımını ve daha etkin depolama mekanizmalarını içerir (Gressel, 1986; Knobler 2003). Böceklerde birincil direnç mekanizmaları: (1) Kutikuladan penetrasyonun azaltılması, (2) esteraazlar, monooksijenazlar ve glutatyon transferazlar gibi enzimlerle metabolik detoksifikasyonun arttırılması ve (3) hedef bölgelerde duyarlılığın azaltılması şeklinde oluşmaktadır (Gressel 1986; Knobler 2003).

Kutikuladan penetrasyonun azaltılması: Bu mekanizma, kullanılan insektisite yaygın oranda direnç görüldüğü zaman direnç oluşumunda en az etkili mekanizmadır ve genel olarak diğer direnç faktörlerini arttırıcı etki olarak rol oynar. Mekanizma insektisitlere karşı knock-down zamanını arttırıcı yönde etki ederken, uygulanan insektisit toksisitesi dirençli ve duyarlı soylarda aynıdır. *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) üzerinde yapılan genetik çalışmalar sonucunda, 3. kromozomda lokalize olan pen geninin bu direnç tipinden sorumlu olduğu bulunmuştur. Düşük orandaki insektisit penetrasyonu, detoksifikasyon genleriyle etkileşim halinde insektisit direncini arttırabilir (Hemingway ve Ranson 2000; Kence, 1988).

Metabolik detoksifikasyonun arttırılması: Gözlenen pek çok direnç durumunda insektisitlerin metabolizasyon hızları arttırılarak, daha az toksik olan öncü bileşiklere dönüştürülmesi gözlenir. İnsektisit metabolizasyonunun arttırılması; ya farklı enzim formlarının bulunuşu ya da duyarlı bireylerde az bulunan enzim miktarının arttırılışı şeklinde olur (Hemingway ve Ranson 2000). Genel olarak enzimler substratları üzerinde doğal bir temele bağlı olarak Faz 1 ve Faz 2 reaksiyonları halinde ksenobiyotik mekanizmaya sahiptirler. Toksik etkinin azaltılması, bu enzimlerin aktivitelerinin birleştirilmesi ve ikincil olarak sudaki çözünürlüklerinin artışı ile sağlanır. Faz 1 reaksiyonlarının ürünleri ana bileşikten daha toksik olabilir. İnsektisit direncine katkıda bulunduğu bilinen detoksifikasyon mekanizması, Faz 1 enzimleriyle sınırlıdır ve bunlar mikrozomal monooksijenazlar, hidrolazlar ve glutatyon-S-transferazlar (GSTH) olarak ayrılabilir (Kence, 1988).

Hedef bölge duyarsızlaşması: Bu direnç mekanizması, insektisitlerin canlıdaki ana hedef bölgelerinde bu bileşiklere karşı ilginin düşürülmesi durumunu içine alan sinir sistemindeki düzenlemelerle sağlanır. Sinirsel hedef bölge modifikasyonuna bağlı direnç, üç farklı insektisit grubuna karşı tanımlanmış olan üç ana hedef bölgeyi kapsar.

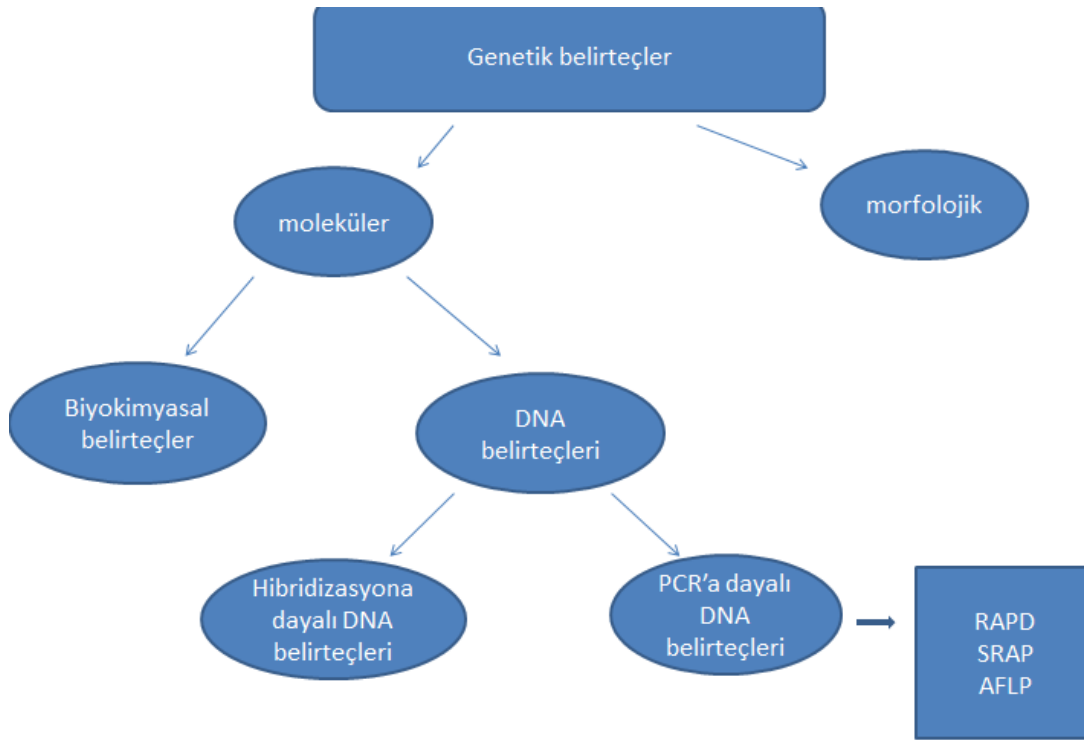
1. Asetilkolinesterazın değiştirilmesi
2. DDT ve pyrethroidlere karşı nöron duyarlılığının azaltılması
3. Klorlanmış siklodienlere karşı nöron duyarlılığının azaltılması

Asetilkolinesteraz (AChE) enzim duyarsızlaşması: Bu mekanizma, OP ve CB grubu insektisitlerin hedefi olan AChE enziminin, bu enzimi kodlayan *ace* geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu, bu grup insektisitlere karşı duyarsızlaşmasıdır. AChE enzimi kolinerjik sistemde nörotransmitter madde olan asetilkolin seviyesini düzenleyen ve asetilkolini hidrolize ederek sinir impulslarının sonlanmasını sağlayan anahtar bir enzimdir. OP ve CB grubu insektisitler bu enzimin aktif bölgesinde bulunan serin aminoasidini fosforlayarak veya karbamatlayarak enzimin geri dönüşümsüz olarak (veya çok düşük bir oranda geri dönüşümlü olarak) inhibe olmasına neden olur. Bu durum da asetilkolinin sinapslarda birikimine ve asetilkolin reseptörlerinin kalıcı olarak açık kalmasına sebep olur ve böceğin ölümü gerçekleşir (Mutero ve ark., 1994; Chen, 2001; Menozzi ve ark., 2004).

Russell ve ark. (2004) tarafından “Yüksek Diptera” olarak tanımlanan *Musca domestica* (Walsh ve ark., 2001, Kozaki ve ark., 2001), *Lucilia cuprina* (Chen ve ark., 2001), *Bactrocera oleae* (Vontas ve ark., 2002, Kakani ve ark., 2008), *B. dorsalis* (Hsu ve ark., 2006) ve *Drosophila melanogaster* (Fournier ve ark., 1992, Mutero ve ark., 1994)’de insektisit direncinde rol oynayan AChE enzimini kodlayan ve *ace-2* olarak isimlendirilen tek bir gen bulunmaktadır. Buna karşılık, *Anopheles gambiae*, *Culex pipiens pipiens*, *C. p. quinquefasciatus* (Weill ve ark., 2002, 2003, 2004), *Myzus persicae* (Nabeshima ve Kozaki, 2003), *Aphis gossypii* (Toda ve ark., 2004) ve *C. tritaeniorhynchus* (Nabeshima ve ark., 2004) gibi diğer pek çok böcek ve akarda ise, AChE1 ve AChE2 olmak üzere iki farklı AChE enzimini kodlayan ve *ace-1* ve *ace-2* olarak adlandırılan en az iki gen olduğu rapor edilmiştir. Bu ikinci gruptaki organizmalarda *ace-1* geninin kodlamış olduğu AChE1 enziminin insektisit direncinde etkin rol oynadığı bilinmektedir. *C. pipiens*’de, AChE1 enziminin aktif merkezindeki Gly119Ser ve Phe290Val (*Torpedo californica* AChE numaralandırılmasına göre) değişikliklerinin enzimin OP ve CB grubu insektisitlere karşı duyarsızlaşmasına neden olduğu bildirilmiştir (Weill ve ark., 2002, 2003, 2004; Alout ve ark., 2007; Alout ve Weill, 2008).

1.6. Genetik Belirteçler

Belirteçler kalıtsal modelleri morfolojik, biyokimyasal ya da DNA seviyesinde izlenilebilen karakterlerdir. Bu karakterler doğrudan olmamasına karşın, bir organizmadaki doğrudan ilgilenilen özelliklerin yanında bir lokusta bulunup onlarla birlikte kalıtıldıkları gözlemlendiğinden ilgilenilen özelliğin genetik özellikleri hakkında bilgi sağlamalarından dolayı belirteç diye adlandırılırlar. Bir tür içinde var olan çeşitliliğin (varyasyon) saptanması genom analiz çalışmalarının temelini oluşturmaktadır (Doğaç, 2013; Işık, 2013). Genetik belirteçlerin sınıflandırılması Şekil 1.13.'te sunulmuştur.



Şekil 1.13. Genetik belirteçlerin sınıflandırılması.

1.6.1. PCR'a dayalı DNA belirteçleri

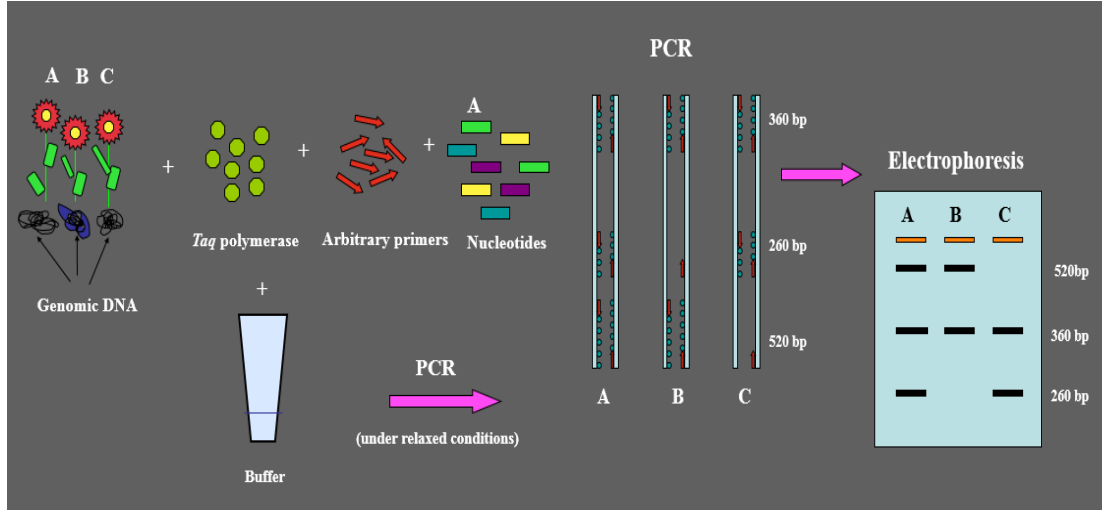
Bitki ve hayvan türlerinin tanımlanmasında ve populasyonların genetik varyasyonlarının tespitinde DNA belirteçleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Morfolojik ve biyokimyasal belirteçlerin uygulamadaki yetersizlikleri DNA belirteçleriyle ortadan kalkmıştır. DNA belirteçleri, diğer tekniklere göre daha fazla

avantajlara sahiptirler. Bu belirteçler çevre faktörlerinden etkilenmezler ve polimorfizm oranları yüksektir (Doğaç, 2013). Aynı zamanda pleotropik ve epistatik etki göstermeyip, son derece stabildirler (Soller ve Beckmann, 1983; Tanksley, 1983; Avise, 1994; Bretting ve Widrlechner, 1995).

Aşağıda belirtilen özelliklerin genellikle bir moleküler belirteçte olması istenir (Doğaç, 2013):

1. Yüksek derecede polimorfik davranış,
2. Kodominant kalıtım,
3. Genomda sıkça bulunma,
4. Genomda düzgün dağılım,
5. Seçici nötr davranış (pleitropik etkisi yok),
6. Kolay ulaşım (satın alma veya hızlı işlemler sonucunda),
7. Kolay ve hızlı değerlendirme (otomasyona uygun işlemler),
8. Yüksek tekrarlanabilirlik,
9. Laboratuvarlar arası kolay veri alışverişi.

Bu çalışmada *Culex pipiens* kompleksi sivrisinek populasyonlarını karakterize etmek amacıyla PCR'a dayalı DNA belirteçlerinden birisi olan RAPD (= Random Amplified Polymorphic DNA = Rastgele üretilen polimorfik DNA) belirteçleri kullanılmıştır. Bu yöntemde 6-10 nükleotidlik primerler kullanılarak genom üzerinde rastgele bölgelerin DNA amplifikasyonu gerçekleştirilir. Şekil 1.14.'te RAPD tekniği şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 1.14. RAPD tekniğinin şematik gösterimi (Ben Hui Lui, 1998).

RAPD tekniğinin en büyük avantajı ilgilenilen taksonun genleriyle ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir. Çoğaltmada tüm organizmalar için aynı oligonükleotid primer seti kullanılabilir. Ayrıca radyoaktiviteye, Southern transferlere veya DNA hibridizasyonuna gerek duyulmamaktadır. RAPD karakterlerinin sayısı ihtimal olarak sınırsızdır. Kullanılan primer sayısı artırıldıkça elde edilen bant sayısı da artacaktır. Bu açıdan yakın türleri ayırmada izozimden daha duyarlıdır. Farklı araştırmacılar tarafından kodominant veriler gerektirmeyen sistematik problemlerin çözümünde RAPD belirteçlerin kullanımı güçlü bir şekilde savunulmaktadır (Angın, 2011; Işık, 2011). Bununla beraber metodun dezavantajları da vardır. RAPD tekniğinde ana güçlük sonuçta oluşan bant profillerinin reaksiyon şartlarındaki varyasyonlara, DNA kalitesine ve PCR sıcaklık profiline çok duyarlı olmasıdır. RAPD kullanım açısından kolay olmasına karşılık, belirteçleri dominanttır ve heterozigotları teşhis etmek zordur. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilmektedir. Bunun için diğer karşılaştırmalı analizlere girmeden evvel yöntemin optimize edilmesi oldukça önemlidir (Angın, 2011; Işık, 2011).

1.7. Çalışmanın Amacı

Bu çalışma ile Ege Denizi'ne kıyısı olan illerden ve göreceli olarak daha karasal bir iklime sahip olan Denizli'den örneklenen, insan sağlığı açısından önemli bir vektör ve ülkemizde baskın olan, *Culex pipiens* kompleksi sivrisinek populasyonlarında *ace-1* genindeki Gly119Ser ve Phe290Val mutasyonlarının direnç frekanslarının zamana bağlı değişimlerinin belirlenmesi ve bunun yanısıra RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA = Rasgele Üretilen Polimorfik DNA) belirteçlerinin yardımı ile bu populasyonların populasyon içi ve populasyonlar arası çeşitliliğe ilişkin parametreler bakımında da karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. *Culex pipiens* Örneklerinin Toplanması

Çalışma kapsamında, Ege Denizi'ne kıyısı olan Çanakkale, Balıkesir, İzmir, Aydın ve Muğla illerindeki ve bunların yanı sıra Denizli İli'ndeki *Culex pipiens* kompleksi populasyonları örneklenmiştir. Denizli İli'nin kıyı şeridinden seçilmiş olan illere ek olarak çalışmamıza dahil edilmesinin nedeni, çalışılacak türdeki değişik insektisit gruplarına karşı direnç mutasyon frekanslarının göreceli olarak daha karasal iklimdeki zamanla değişim durumlarının ve bu mutasyonlara sahip allellerin karasal ve ılıman iklimler arasındaki göç paternlerinin de gösterilmesidir. Denizli İli, çalışmamızın coğrafi bütünlüğünü bozmayacak bir il olması ve laboratuvarımıza yakınlığı nedeniyle bölgenin iç kesimlerindeki diğer illerine tercih edilmiştir. Ayrıca, çalışılacak mekanizmalar bakımından ana karadan farklılaşmaların da gösterilebilmesi amacıyla, ada ve yarım ada olmaları nedeniyle Çanakkale İli sınırları içerisinde bulunan Gökçeada ve Gelibolu Yarımadaları özellikle örneklenmiştir.

Her ili temsilen, ikisi tarım ikisi de turizm ya da yerleşimin yoğun olduğu alanlardan olmak üzere, toplam 4 adet lokasyon seçilmiştir. İlin daha iyi örneklenebilmesi amacı ile sadece İzmir İli için 5 lokasyon seçilmiştir. Örnekleme yapılan lokasyonlar Şekil 2.1.'de harita üzerinde gösterilmiş olup, bu lokasyonlar 1'den 25'e kadar populasyon (Pop) numaraları verilmek suretiyle kodlanmıştır ve bu kodlama da Çizelge 2.1.'de sunulmuştur. Bu lokasyonların koordinatları (enlem ve boylam) ve yükseklikleri ise Çizelge 2.2.'de sunulmuştur. Çalışmanın tüm aşamalarında ortak bir dil oluşturması ve kolaylık sağlaması bakımından örnekleme yapıldığı lokasyonlar 1'den 25'e kadar populasyon (Pop) numaraları verilmek suretiyle kodlanmıştır. Bu kodlama da Çizelge 2.1.'de sunulmuştur. 6 il için örneklenen toplam 25 adet lokasyonun her birinde ise, lokasyonu en iyi örnekleyecek şekilde en az 4, mümkün olan durumlarda ise daha fazla noktadan örnekleme yapılmıştır.

Ancak, yaklaşık 1 hektar (=10 000 m²)'lık bir alan içinde yapılan farklı örneklemler için tek GPS verisi alınmıştır (Çizelge 2.1.). Bu lokasyonların seçiminde fiziki şartlar, özellikle de sivrisineklerin üreme alanlarının durumu ve bu alanların çalışmadaki farklı örnekleme dönemlerinin her birinde süreklilik arz etmesi göz önünde bulundurulmuştur. Özel izin gerektirmeyen alanlardan seçilen, tarımsal drenajın ve dolayısı ile kirlilik birikiminin yüksek olduğu su birikintileri, su kuyuları, sulama kanalları, foseptikler, çöp konteynerleri, yalaklar, kullanılmış araç lastikleri, hayvan ayak izleri gibi noktalar başlıca örnekleme noktalarını oluşturmuştur.



Şekil 2.1. Örnekleme yapılan lokasyonlar.

Çizelge 2.1. Çalışma kapsamında örnekleme yapılan 6 ile ait 25 lokasyon ve bu lokasyonlara verilen popülasyon kodları.

MUĞLA İLİ	BALIKESİR İLİ
Lokasyon 1: Gökova (Pop-1)	Lokasyon 1: Manyas-Erdek (Pop-14)
Lokasyon 2: Datça (Pop-2)	Lokasyon 2: Susurluk-Merkez (Pop-15)
Lokasyon 3: Fethiye (Pop-3)	Lokasyon 3: Ayvalık (Pop-16)
Lokasyon 4: Köyceğiz (Pop-4)	Lokasyon 4: Gömeç-Burhaniye (Pop-17)
AYDIN İLİ	DENİZLİ İLİ
Lokasyon 1: Çine(Pop-5)	Lokasyon 1: Çivril (Pop-18)
Lokasyon 2: Söke (Pop-6)	Lokasyon 2: Merkez (Pop-19)
Lokasyon 3: Karpuzlu (Pop-7)	Lokasyon 3: Beyağaç (Pop-20)
Lokasyon 4: Didim-Kuşadası (Pop-8)	Lokasyon 4: Pamukkale (Pop-21)
İZMİR İLİ	ÇANAKKALE İLİ
Lokasyon 1: Seferihisar (Pop-9)	Lokasyon 1: Gökçeada (Pop-22)
Lokasyon 2: Bergama (Pop-10)	Lokasyon 2: Gelibolu (Pop-23)
Lokasyon 3: Menemen-Aliaga (Pop-11)	Lokasyon 3: Ezine (Pop-24)
Lokasyon 4: Çiğli (Pop-12)	Lokasyon 4: Ayvacık (Pop-25)
Lokasyon 5: Bornova (Pop-13)	

Çizelge 2.2. Tez kapsamında örnekleme yapılan 6 ile ait 25 lokasyonun koordinatları ve yükseklikleri.

İller/Lokasyonlar	Örnekleme Noktaları			
MUĞLA	I	II	III	IV
Gökova	37°01'58.59"N 28°20'21.22"E Yükseklik: 3.04 m	37°02'17.17"N 28°11'25.86"E Yükseklik: 78.02 m	37°01'41.24"N 28°21'32.15"E Yükseklik: 10.97 m	
Datça	36°47'16.99"N 28°01'53.41"E Yükseklik: 3.96 m	36°41'51.84"N 27°40'32.41"E Yükseklik: 3.96 m	36°44'09.09"N 27°41'48.13"E Yükseklik: 7.01 m	
Fethiye	36°38'16.41"N 29°05'40.91"E Yükseklik: 51.20 m	36°39'44.89"N 29°07'51.11"E Yükseklik: 16.45 m	36°39'21.61"N 29°06'39.30"E Yükseklik: 0 m	
Köyceğiz	36°57'15.30"N 28°42'01.72"E Yükseklik: 4.87 m	36°58'59.39"N 28°40'23.18"E Yükseklik: 31.39 m	36°57'34.97"N 28°40'24.80"E Yükseklik: 0.91 m	
AYDIN				
Çine	37°41'10.83"N 27°59'59.04"E Yükseklik: 59.13 m	37°32'05.54"N 28°03'49.34"E Yükseklik: 74.06 m	37°36'36.48"N 28°02'51.52"E Yükseklik: 83.82 m	
Söke	37°40'21.87"N 27°21'46.15"E Yükseklik: 7.92 m	37°44'30.96"N 27°23'45.91"E Yükseklik: 74.06 m	37°46'07.43"N 27°24'46.66"E Yükseklik: 83.82 m	

Çizelge 2.2. (Devam)

İller/Lokasyonlar	Örneklem Noktaları			
Karpuzlu	37°35'55.58"N 27°50'05.06"E Yükseklik: 112.7 m	37°34'46.85N 27°49'00.82E Yükseklik: 97.84 m		
Didim-Kuşadası	37°21'04.64"N 27°16'26.35"E Yükseklik: 12.49 m	37°50'36.64N 27°15'55.57E Yükseklik: 51.51 m	37°53'39.90"N 27°16'32.17"E Yükseklik: 11.58 m	
İZMİR				
Seferihisar	38°11'03.19"N 26°48'13.18"E Yükseklik: 11.58 m			
Bergama	39°06'16.91"N 27°10'06.33"E Yükseklik: 44.19 m	39°07'07.56"N 27°11'05.25"E Yükseklik: 60.65 m		
Menemen- Aliağa	39°01'05.52"N 27°04'24.17"E Yükseklik: 17.37 m	38°51'13.75"N 27°02'10.12"E Yükseklik: 2.43 m	39°36'19.95"N 27°05'05.72"E Yükseklik: 18.89 m	
Çiğli	38°29'34.04"N 26°57'22.01"E Yükseklik: 30.48 m	38°30'26.04"N 26°59'16.71"E Yükseklik: 6.09 m		
Bornova	38°27'26.32"N 27°14'01.35"E Yükseklik: 39.01 m	38°26'54.25"N 27°14'05.96"E Yükseklik: 38.70 m		
BALIKESİR				
Manyas-Erdek	40°07'02.15"N 27°59'11.66"E Yükseklik: 22.86 m	40°07'15.25"N 27°51'15.92"E Yükseklik: 34.74 m	40°27'11.89"N 27°45'06.27"E Yükseklik: 5.18 m	40°24'07.26"N 27°47'34.36"E Yükseklik:24.07m
Susurluk-Merkez	39°54'57.62"N 28°09'51.03"E Yükseklik: 42.06 m	39°37'50.39"N 28°02'06.64"E Yükseklik: 93.87 m	39°29'41.06"N 27°54'43.26"E Yükseklik: 166.4 m	39°47'58.89"N 28°07'56.45"E Yükseklik: 224.94 m

Çizelge 2.2. (Devam)

İller/Lokasyonlar	Örneklem Noktaları			
Ayvalık	39°16'25.80"N 26°38'19.40"E Yükseklik: 15.54 m	39°17'20.14"N 26°41'12.05"E Yükseklik: 13.71 m		
Gömeç- Burhaniye	39°22'53.57"N 26°50'06.60"E Yükseklik: 14.93 m	39°22'34.43"N 26°51'46.83"E Yükseklik: 31.08 m	39°30'07.07"N 26°58'53.96"E Yükseklik: 24.68 m	39°29'23.55"N 26°56'03.45"E Yükseklik: 3.35 m
DENİZLİ				
Çivril	38°19'20.75"N 29°51'01.28"E Yükseklik: 834.8 m	38°17'51.18"N 29°44'32.49"E Yükseklik: 829.6 m		
Merkez	37°47'36.00"N 29°04'46.08"E Yükseklik: 365.1 m	37°46'51.03"N 29°06'45.72"E Yükseklik: 336.8 m		
Beyağaç	37°14'14.51"N 28°53'48.10"E Yükseklik: 701.3 m	37°13'56.18"N 28°53'36.34"E Yükseklik: 691.2 m		
Pamukkale	37°54'55.25"N 29°06'53.78"E Yükseklik: 245.3 m	37°54'51.10"N 29°07'16.22"E Yükseklik: 262.4 m		
ÇANAKKALE				
Gökçeada	40°08'15.87"N 25°44'12.88"E Yükseklik: 75.89 m			
Gelibolu	40°25'24.08"N 26°40'05.44"E Yükseklik: 37.79 m	40°24'35.41"N 26°39'48.15"E Yükseklik: 7.01 m		
Ezine	Elev.39°47'05.18"N Elev.26°19'41.40"E Yükseklik: 63.09 m			
Ayvacı	39°34'00.74"N 26°10'04.71"E Yükseklik: 20.11 m	39°35'56.95"N 26°24'35.10"E Yükseklik: 257.2 m		

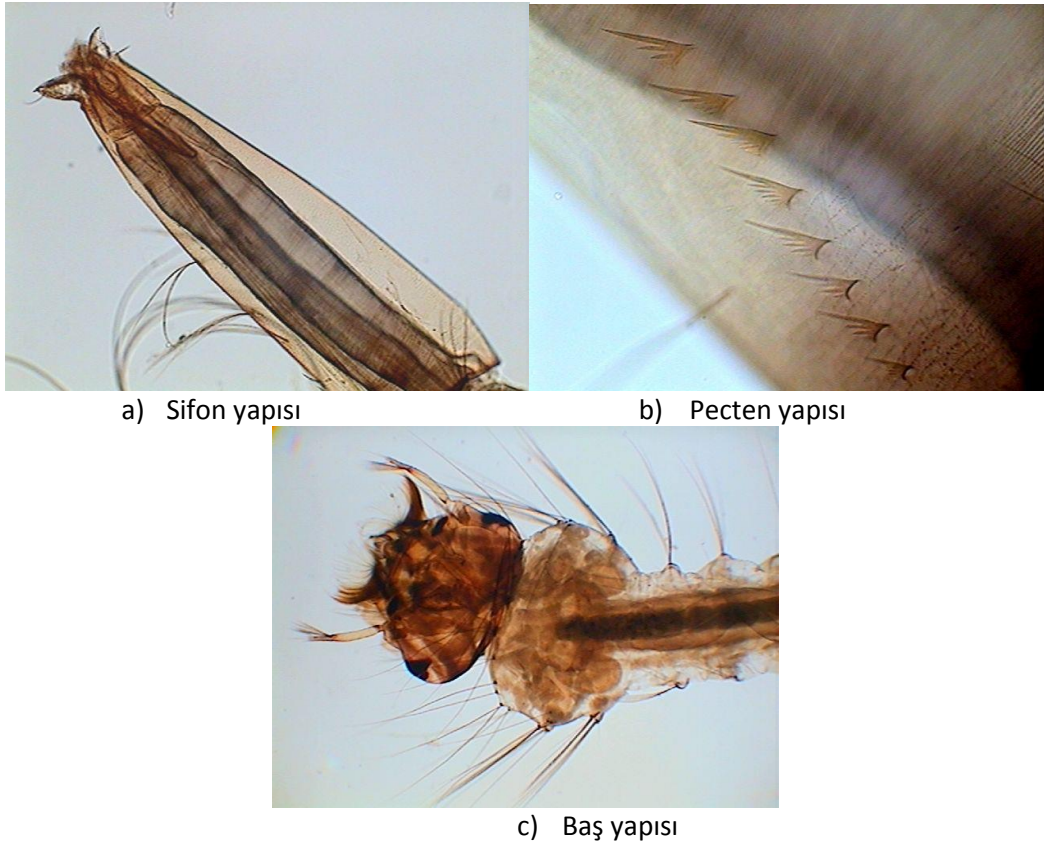
Çalışma materyalini oluşturan *Culex pipiens* örnekleri üç farklı dönemde toplanmıştır. Birinci dönem; yıllık sivrisinek mücadele çalışmalarının başlamasının hemen öncesinde, 15 Nisan – 30 Mayıs 2012 tarihleri arasında, ikinci dönem; yaz boyunca yapılan ilaçlamaları takiben, 15 Eylül – 30 Ekim 2012 tarihleri arasında, ve üçüncü dönem ise direnç allellerinin kışı geçirme durumlarını dolayısı ile uyum bedellerini ortaya koyabilmek amacı ile 15 Nisan – 30 Mayıs 2013 tarihleri arasında olmuştur. Toplama işleminde larva yakalama kepçeleri kullanılmıştır. Larva yakalama kepçeleri ile gerçekleştirilen toplama işlemine ait bir resim Şekil 2.2.' de sunulmuştur. Toplanan larvalar, stres faktörünün ortadan kaldırılması amacı ile kendi ortamlarından alınan bir miktar su ile birlikte ağzına tül bağlanmış olan uygun şişelere konularak laboratuvara ulaştırılmıştır. Şişelerin üzerindeki tül kısımlara % 10'luk şeker çözeltisi içeren pamuklar yerleştirilerek beklenenden erken çıkan erginlerin beslenmeleri sağlanmıştır. Bu ergin bireyler, alkole alınarak çalışmada kullanılmıştır.



Şekil 2.2. Larva yakalama kepçesiyle gerçekleştirilen toplama işlemine ilişkin görüntü.

2.2. *Culex pipiens* Örneklerinin Teşhis Edilmesi

Örnek toplama işlemi sırasında ilk olarak *Culex* larvaları, *Aedes*, *Anopheles* ve *Culiseta* larvalarından ayrılmıştır. Bu ayırma işleminde, *Anopheles* larvalarının diğer türlerin larvalarında bulunan ve solunumda kullanılan sifon yapısı taşımamaları ve bu nedenle su yüzeyine paralel durmaları ve *Culiseta* larvalarının diğer türlerin larvalarına oranla çok büyük olmaları dikkate alınmıştır (Alten ve Çağlar, 1998). *Aedes* larvalarının *Culex* larvalarından ilk ayrımında ise torax/baş oranına bakılmıştır. *Culex* larvalarında torax yapısı başa göre belirgin biçimde büyükken *Aedes* larvalarında torax ile başın hemen hemen aynı büyüklükte olması ayrımı sağlamıştır. *Culex pipiens* larvalarının mikroskop altında ayrımında kullanılan vücut kısımları Şekil 2.3.'te ve *C. pipiens* erginlerinin mikroskop altında ayrımında kullanılan vücut kısımları ise Şekil 2.4.'te sunulmuştur.



Şekil 2.3. *Culex pipiens* larvalarının mikroskop altında seçiminde kullanılan vücut kısımları (Anonim, 2009).



Şekil 2.4. *Culex* ergin bireylerinin mikroskop altında seçiminde kullanılan vücut kısımları (Anonim, 2009).

2.3. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu Bender ve ark. (1983)'e ait lifton metodunun modifiye edilmiş şekli kullanılarak yapılmıştır. Bu metoda göre kısaca; steril tüpe alınan bir birey sıvı azotta ezilmiş, üzerine 400 µl lifton tampon çözeltisi (0.1 M Tris-HCl, 0.05 M EDTA, pH 9.1) ve 100 µl % 0.5'lik SDS eklenerek homojenize edilmiştir. Su banyosunda 65° C'de 30 dakika inkübasyonu takiben üzerine 1 µl Proteinaz K eklenerek 37° C'de 30 dakika tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 200 µl 0.6 M sodyum asetat eklenerek 1 saat boyunca buz içerisinde bekletilmiştir. Buzdan alınan örnek 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek sıvı olan üst faz dipteki kalıntılardan dikkatli bir şekilde ayrılarak başka bir tüpe alınmıştır. Üzerine 500 µl fenol ve 1 damla kloroform: izoamilalkol (24:1) eklenerek 14.000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Yine üst faz ayrı bir tüpe alınarak üzerine 250 µl fenol ve 250 µl kloroform: izoamilalkol (24:1) eklenerek tekrar 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Üst faz yine ayrı bir tüpe alınarak üzerine bu kez 500 µl kloroform: izoamilalkol eklenemiş ve 14.000 rpm'de 5 dakika süreyle

santifüjlenmiştir. Üstteki faz tekrar başka bir tüpe aktarılarak içerisine 1 µl RNaz eklenerek 37° C’de 30 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyondan sonra örnekler % 96’lık etanol eklenerek 14.000 rpm’de 15 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Daha sonra %96’lık etanol uzaklaştırılmış ve üzerine % 80’lik etanol eklenerek tekrar 14.000 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve bu işlem sonunda alkolün oluşan pelletten uzaklaştırılması amacı ile 1 saat kurumaya bırakılmıştır. Son olarak, pellet 30 µl otoklavlanmış dH₂O’da çözünerek bir gece +4°C’de bekletilmiştir. Örnekler % 1’lik agaroz jelde yürütülerek elde edilen DNA’lar kalite bakımından test edilmiş, ayrıca spektrofotometrede miktar tayinleri yapılmıştır.

2.4. *ace-1* Genindeki Gly119Ser ve Phe290Val Mutasyonlarının Saptanması

Çalışma kapsamında *ace-1* genindeki Gly119Ser ve Phe290Val mutasyonları her 3 toplama döneminde örneklenen bireylerde çalışılmıştır. *ace-1* genindeki mutasyonların saptanması amacıyla, her ili homojen örnekleyecek şekilde seçilen 4 lokasyonun her birinden 15’er birey alınması ile her il toplam 60 bireyle temsil edilmiştir (İzmir İli için 5 lokasyon örneklendiğinden bu il 75 bireyle temsil edilmiştir). Dolayısı ile, çalışma alanının tümünde her bir toplama döneminde *ace-1* genindeki mutasyonlar toplam 375 örnek baz alınarak hesaplanmıştır.

2.4.1. *ace-1* geninde Gly119Ser mutasyonunun saptanması

Örneklerin *ace-1^R* olarak gösterilen *ace-1* genindeki Gly119Ser mutasyonu Weill ve ark. (2004) ve Djogbénou ve ark. (2008) esas alınarak PCR-RFLP yöntemiyle saptanmıştır. Bu yöntemde ilk olarak, sineklerin genomik DNA’ları Ex3AGdir (5'-GATCGTGGACACCGTGTTTCG-3') ve Ex3AGrev (5'-AGGATGGCCCGCTGGAACAG-3') primerleri kullanılarak PCR’la çoğaltılmış, ancak PCR ürünlerinde spesifik bağlanmanın gerçekleşmediği görülerek, istenilen bölgeyi çoğaltabilmek amacı ile 6 adet (3’ü forward = F, 3’ü reverse = R olmak üzere) alternatif primer dizayn edilmiştir. Bunlardan ACE1-F1: 5'-CCGGGGGCCACCATGTGGAA-3' ve ACE1-R2: 5'-

GTTCTCCTCCGAGGCCAGCGTCCG-3' primer çifti ile en iyi sonuç alınarak tüm çalışma materyaline uygulanmıştır. Analizlerde, optimum PCR karışımı 25 µl PCR hacmi için 20ng DNA, 1xPCR tamponu, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP (her birinden), 1 U Taq DNA polimeraz ve F ve R primerlerinin her biri için 10 pmol'den, amplifikasyon koşulları ise 94 °C'de 5 dakikalık ön denatürasyonu takiben, her bir döngüsü 94 °C'de 30 saniye (denatürasyon), 65 °C'de 30 saniye (bağlanma) ve 72 °C'de 30 saniye (uzama) olacak şekilde toplam 35 döngü ve 72 °C'de 5 dakikalık son uzama basamağından oluşmuştur. PCR'lar Eppendorf Mastercycler Gradient Thermalcycler'da gerçekleştirilmiştir. Örneklerin PCR ürünlerinin 12 µl'leri 37 °C'de 4 saat *AluI* restriksiyon enzimi ile inkübe edilmiştir. Bu enzimin çoğaltılan DNA parçası üzerindeki tanıma bölgesi (5'....AG▼CT....3') olup, sadece dirençli allelleri kesmektedir. İnkübasyon sonucu oluşan ürünler % 2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Enzimle kesim sonucunda, homozigot duyarlı (SS) bireylerde sadece 194 bp'lik tek bant, homozigot dirençli (RR) bireylerde 120 ve 74 bp'lik iki bant ve heterozigot (RS) bireylerde ise bu bantların her üçü de saptanmıştır. Pop-21'in üçüncü dönem örneklerine ait örnek bir jel görüntüsü Şekil 2.5.' te sunulmuştur.

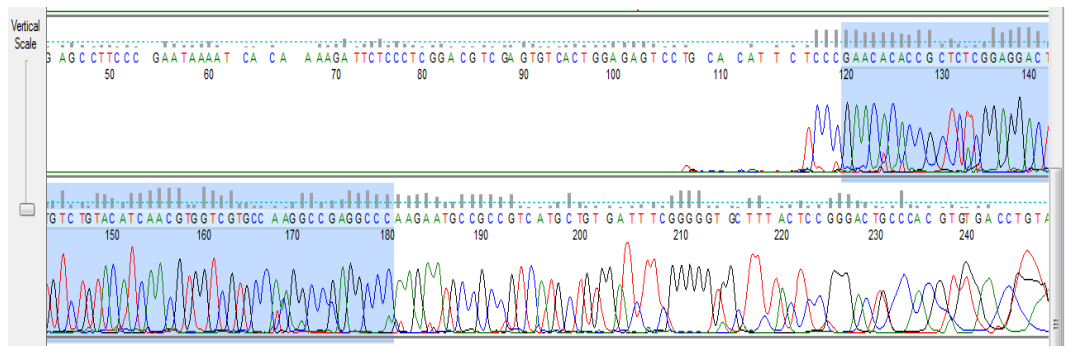


Şekil 2.5. Pop-21'in üçüncü dönem örneklerinin *ace-1* genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre direnç durumları.

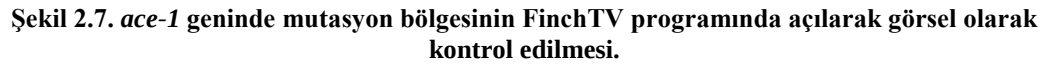
PCR-RFLP yöntemi ile *ace-1* geni için elde edilen veriler, bu analizde kullanılmış olan örneklerden her il için rastgele seçilen 3'er örnekte (toplam 18 örnekte; bu örnekler toplama dönemi başına 1'er örnek ve saptamış olduğumuz SS, RR, RS

bireylerinden dönem başına 3'şer örnek olacak şekilde seçilmiştir) baz dizi analizi yapılarak da doğrulanmıştır.

Baz dizi analizi için *ace-1* genin çoğaltılmasında, analizlerde kullanılan, yukarıda dizinleri verilen ACE1-F1 ve ACE1-R2 primer çifti kullanılmıştır. Yine analizlerde kullanılan PCR karışımı ve amplifikasyon koşulları kullanılarak elde edilen PCR ürünleri yaklaşık miktar ve kalite açısından kontrol edilmek amacıyla % 1'lik agaroz jelde 1 µl ürün, 1µl boya karıştırılarak 80 Volt sabit akımda yürütülmüş ve görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Daha sonra istenilen uzunluğa sahip örnekler jelden dikkatlice kesilmiş ve jelden DNA izolasyon kiti (Qiagen) kullanılarak (üretici firmanın önerdiği basamaklar takip edilerek) izole edilmiştir. Elde edilen ürünün miktar tayini spektrofotometrede yapılmış ve baz dizi analizi için ilgili firmaya gönderilmiş ve iki yönlü okumalar yaptırılmıştır. ABI formatlı kromatogram dosyası şeklinde laboratuvarımıza gönderilen diziler ilk olarak FinchTV programında açılarak görsel olarak incelenmiştir (Şekil 2.6.). Elde edilen DNA baz dizilerinden öncelikle baz dizi analizi için kullandığımız primer dizileri çıkarılarak istenilen bölge MEGA5 paket programı (Tamura ve ark., 2011) içerisinde bulunan CLUSTALW çoklu hizalama programı (ClustalW multiple sequence alignment program) kullanılarak sıraya dizilmiştir (Şekil 2.8.). İlgili bölgenin baz dizi analizi sonucu elde edilen dizilere ait örnek Şekil 2.7.'de verilmiştir. Ayrıca, *ace-1* genine ait diziler MEGA programı kullanılarak aminoasit dizilerine çevrilerek mutasyon bölgesinde Gly→Ser (GGC→AGC) mutasyonu incelenmiştir (Şekil 2.9.).

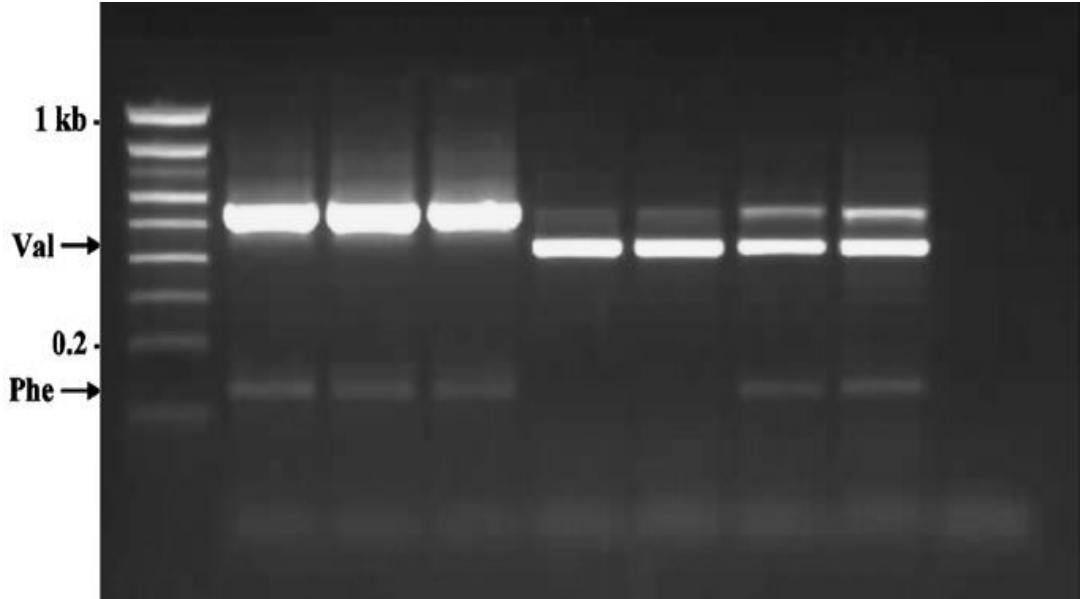


Şekil 2.6. *ace-1* genine ait baz dizisinin FinchTV programında açılarak görsel olarak kontrol edilmesi.



33

Amplifikasyonu) yöntemiyle saptanmıştır. Bu yöntemde, sineklerden elde edilen genomik DNA'lar kullanılarak ilgili bölge Valdir (5'-ACGCTGGGGATCTGCGAGG-3'), CxEx5dir (5'-GTCTGGCCGAGGCCGTCA-3'), CxKrev2 (5'-TGCTTCTGTGCGTGTACAGG) ve Valrev (5'-TCCACAACCGGAACGAACGGAAA-3') primerleri kullanılarak PCR'la çoğaltılmıştır. Analizlerde, optimum PCR karışımı 25 µl PCR hacmi için 20ng DNA, 1xPCR tamponu, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP (her birinden), 1 U Taq DNA polimeraz ve primerlerden Valdir ve CxEx5dir için 0.6 µl, Valrev ve CxKrev2 için 0.3 µl kullanılmıştır. PCR şartları; 94 °C'de 5 dakikalık ön denatürasyonu takiben, her bir döngüsü 94 °C'de 30 saniye (denatürasyon), 51 °C'de 30 saniye (bağlanma) ve 72 °C'de 30 saniye (uzama) olacak şekilde toplam 35 döngüden ve 72 °C'de 5 dakikalık son uzamadan oluşmuştur. PCR sonuçlarından elde ettiğimiz jel görüntülerinde 290 numaralı pozisyonda Phe içeren bireylerde yaklaşık 148 bç'lik, Val içeren bireylerde ise yaklaşık 435bç'lik bant görülmüştür (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. PASA yöntemi kullanılarak yapılan çalışmanın sonucunu gösteren örnek jel görüntüsü.

2.5. Populasyonların RAPD Belirteçleriyle Karakterizasyonları

2.5.1. RAPD analizlerinde izlenen strateji

RAPD analizleri sadece populasyon hareketliliklerinin en fazla yaşandığı yaz döneminin sonunda (İkinci dönem) toplanan örneklerde (375 örnek) yapılmıştır. Diğer çalışmalar için izole edilen ikinci dönem DNA'ları RAPD çalışmasının tamamının gerçekleşmesine yetmeyeceği için RAPD çalışması, yine ikinci dönem örneklerinden yeni bir set oluşturularak izole edilen DNA'lar kullanılarak çalışılmıştır. Populasyonu uygun bir şekilde yansıtmayı amacıyla DNA izolasyonu için seçilen bireylerin yaklaşık olarak 1:1 oranında dişi ve erkeklerden oluşmasına özen gösterilmiştir. Göçü daha iyi anlayabilmek ve çalışmanın daha anlaşılabilir olmasını sağlamak amacıyla, diğer çalışmalar için oluşturduğumuz 25 populasyon RAPD çalışması için 6 populasyon olarak sınırlandırılmıştır. Çalışma materyalini oluşturan 6 populusyona ait tüm bireylerin 80 RAPD primeri ile çalışılmasındaki zorluktan dolayı, öncelikle bu 6 populusyonun bireyleri arasından rastgele seçilerek oluşturulan 4 bireylik bir alt populusyonda 80 primer taranmıştır.

Alt populusyonda denenen 80 RAPD primerinden net bantlar üretmiş ve polimorfik bant sayıları yüksek olan primerlerin tekrarlanabilirlikleri test edilerek, tekrarlanabilirliği yüksek olan primerler arasından seçilen 20 primer tüm çalışma materyaline uygulanmıştır.

Populusyonlara ait RAPD bant desenleri Vilber Lourmant Infinity-115 jel görüntüleme cihazı yardımıyla okunmuştur. Bu tek lokustaki segregasyon verisinin değerlendirilmesinde bantın bulunması "1", bulunmaması "0", hiç PCR ürünü saptanmaması ise "." ile gösterilmiştir.

2.5.2. RAPD primerleri

Bu tez çalışmasında, OPERON Technologies (Alameda, California)'ya ait 18 kitlik (OPA-OPR) toplam 80 adet 10 bazlık RAPD oligonükleotid primeri kullanılmıştır.

Tüm bu primerler rastgele dizinden oluşuyor olup, hepsinin (G+C) içerikleri % 60 - % 70 arasındadır.

2.5.3. PCR koşulları

RAPD analizleri için optimum PCR karışımı 25 µl PCR hacmi için 10ng DNA, 1xPCR tamponu, 5.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP (her birinden), 1.0 U *Taq* DNA polimeraz, 10 pmol primer ve 0.3 µl tween-80'den, amplifikasyon koşulları ise 94 °C'de 4 dakikalık ön denatürasyonu takiben, her bir döngüsü 94 °C'de 1 dakika (denatürasyon), 36 °C'de 1 dakika (bağlanma) ve 72 °C'de 2 dakika (uzama) olacak şekilde toplam 45 döngü ve 72 °C'de 5 dakikalık son uzama basamağından oluşmuştur. PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde 70 V sabit akımda 180 dakika yürütülmüştür.

2.5.4. Verilerin analizi

RAPD analizleri sonucunda populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitliliğe ilişkin tüm parametreler POPGENE Version 1.32 (Yeh ve ark., 1999) bilgisayar programı ile hesaplanmıştır. Bu parametreler şunlardır:

- Gözlenen ortalama allel sayısı (N_a) ve ortalama etkili allel sayısı (N_e),
- Polimorfik lokus oranı (% P),
- Nei'nin genetik çeşitliliği (heterozigotluk = h)
- G istatistiği
- Gen akışı (Nm),
- Genetik uzaklık (D_N).

Bu parametrelere ilişkin açıklamalar Velioğlu ve ark. (2002; 2008)'na göre aşağıda verilmiştir.

2.5.4.1. Allel sayısı

Genetik varyasyon göstergelerinden birisi de lokus başına düşen allel sayısıdır (N_a). Allelik zenginlik olarak da anılan bu ölçüt örnek sayısından etkilenmekte ve aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır (Nei, 1987).

$$Ortalama(n_a) = \frac{\sum_i n_{ai}}{r} \quad (2.1)$$

Bu formülde,

n_{ai} : i lokusunun allel sayısı

r : Lokus sayısı'dır.

2.5.4.2. Etkili allel sayısı

Kimura ve Crow (1978) tarafından geliştirilen bu ölçüt homozigotluğun tersidir ve aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$N_e = 1 / \sum x_i^2 \quad (2.2)$$

Bu formülde,

N_e : Etkili allel sayısı

x_i : i allelinin frekansı'dır.

2.5.4.3. Polimorfik lokus oranı

En yaygın allelinin (x_i) frekansı 0.99 veya 0.95'e eşit veya az ise o lokusa polimorfik denmektedir. Bu çalışmada 0.99 kriteri kullanılmıştır. Polimorfik lokus oranı (P) aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Nei, 1987):

$$P = \frac{n_p}{r} \quad (2.3)$$

Bu formülde,

n_p : polimorfik lokus sayısı

r : Lokus sayısı'dır.

2.5.4.4. Heterozigotluk

Bir popülasyondaki genetik varyasyonun en yaygın kullanılan ölçütü heterozigotluktur. Bir lokustaki beklenen heterozigotluğun (h) tahmininde aşağıdaki formül kullanılmaktadır:

$$\hat{h} = \frac{2N \left(1 - \sum x_i^2 \right)}{2N - 1} \quad (2.4)$$

Bu formülde,

N : Birey sayısı

x : Allel frekansı'dır.

2.5.4.5. G - İstatistiği

Nei (1973; 1975)'nin G -istatistiği, toplam genetik çeşitliliğin popülasyon içi ve popülasyonlar arasındaki dağılımını ve genetik farklılaşmanın göreceli düzeyini belirlemek için yapılan bir istatistiktir. Nei'nin G -istatistiği, Wright (1951; 1978)'in F -istatistiğinin bir modifikasyonudur. Bunda H_S , popülasyon içi genetik çeşitliliği, H_T , toplam genetik çeşitliliği, D_{ST} , popülasyonlar arası genetik çeşitliliği ve G_{ST} ise genetik farklılaşmanın göreceli düzeyini gösterir ve aşağıdaki formüllere göre hesaplanır:

$H_S = \sum H_{ej} / n$ $H_{ej} = j$ popülasyonunun beklenen heterozigotluk düzeyi.

n = Popülasyon sayısı

$H_T = 1 - \sum (X_{ia})^2$ X_{ia} = Bütün popülasyonlar gözönüne alındığında i allelinin ortalama frekansıdır.

$$D_{ST} = H_T - H_S$$

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

2.5.4.6. Gen akışı (Nm)

Gen akışı, popülasyondaki bireylerin göçü ile genlerin yayılmasıdır. Her generasyonda 1 bireyin göçü genetik sürüklenmeden kaynaklanan genetik varyasyon azalmasını önleyecektir. Bu değer popülasyon büyüklüğünden bağımsızdır. Eğer Nm değeri 1'den küçükse, popülasyonlar arasında genetik sürüklenme yüzünden farklılaşma gözlenir, bu değer 0.5 veya daha düşük olduğundaysa kritik bir değeri ifade eder (Wright 1969).

Nm ile G_{ST} arasındaki ilişki aşağıdaki gibidir:

$$Nm = 0.5(1 - G_{ST}) / G_{ST}$$

2.5.4.7. Genetik uzaklık

Popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşma düzeyini saptayabilmek amacıyla, çalışılan popülasyonlar arasındaki genetik uzaklık (D_N) değerleri (Nei, 1978)'de POPGENE Version 1.32 bilgisayar programı ile elde edilmiştir. Sonuçların görsel bir ifadesini elde edebilmek için bu (D_N) değerleri ve UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average) kullanılarak bir dendrogram da aynı bilgisayar programı ile elde edilmiştir.

Genetik uzaklık popülasyon çiftleri arasındaki gen farklılıklarının büyüklüğüdür. Benzerlik (I) ve uzaklık (D) değerleri birbirine komplementerdir ($I+D = 1$). En fazla kullanılan genetik uzaklık değeri Nei'nin Genetik Uzaklığıdır (Nei, 1972).

$$I = \frac{J_{xy}}{(J_x J_y)^{1/2}}$$

$$J_{xy} = \sum_i^m x_i y_i \quad J_x = \sum_i^m x_i^2 \quad J_y = \sum_i^m y_i^2 \quad (2.5)$$

I : x ve y populasyonlarının genetik benzerliğidir.

x_i ve y_i : i allelinin x ve y populasyonlarındaki frekanslarıdır.

Çalışılan tüm lokuslar için J_{xy} , J_x ve J_y toplanıp lokus sayısına bölünerek tüm alleller için ortalaması alınmaktadır. Elde edilen ortalama değerler (J'_{xy} , J'_x , J'_y) genetik uzaklık (D') ve benzerliğin tahmininde kullanılmaktadır.

$$I' = \frac{J'_{xy}}{(J'_x J'_y)^{1/2}} \quad D' = -\ln I' \quad (2.6)$$

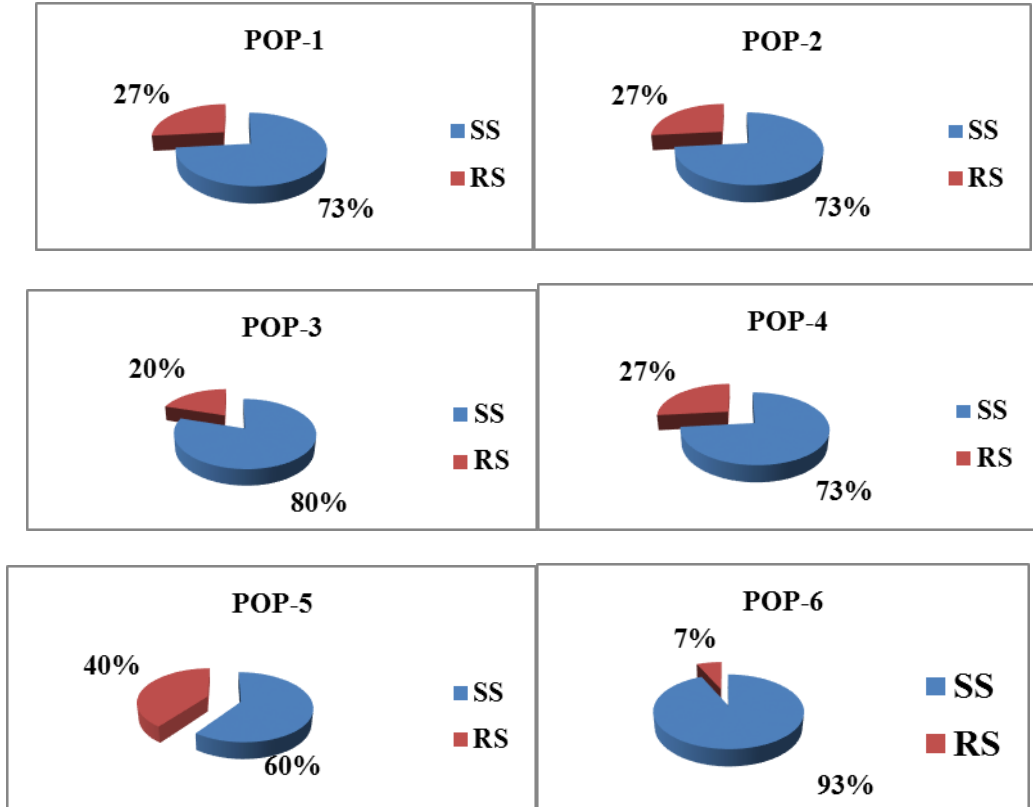
3. BULGULAR ve TARTIŞMA

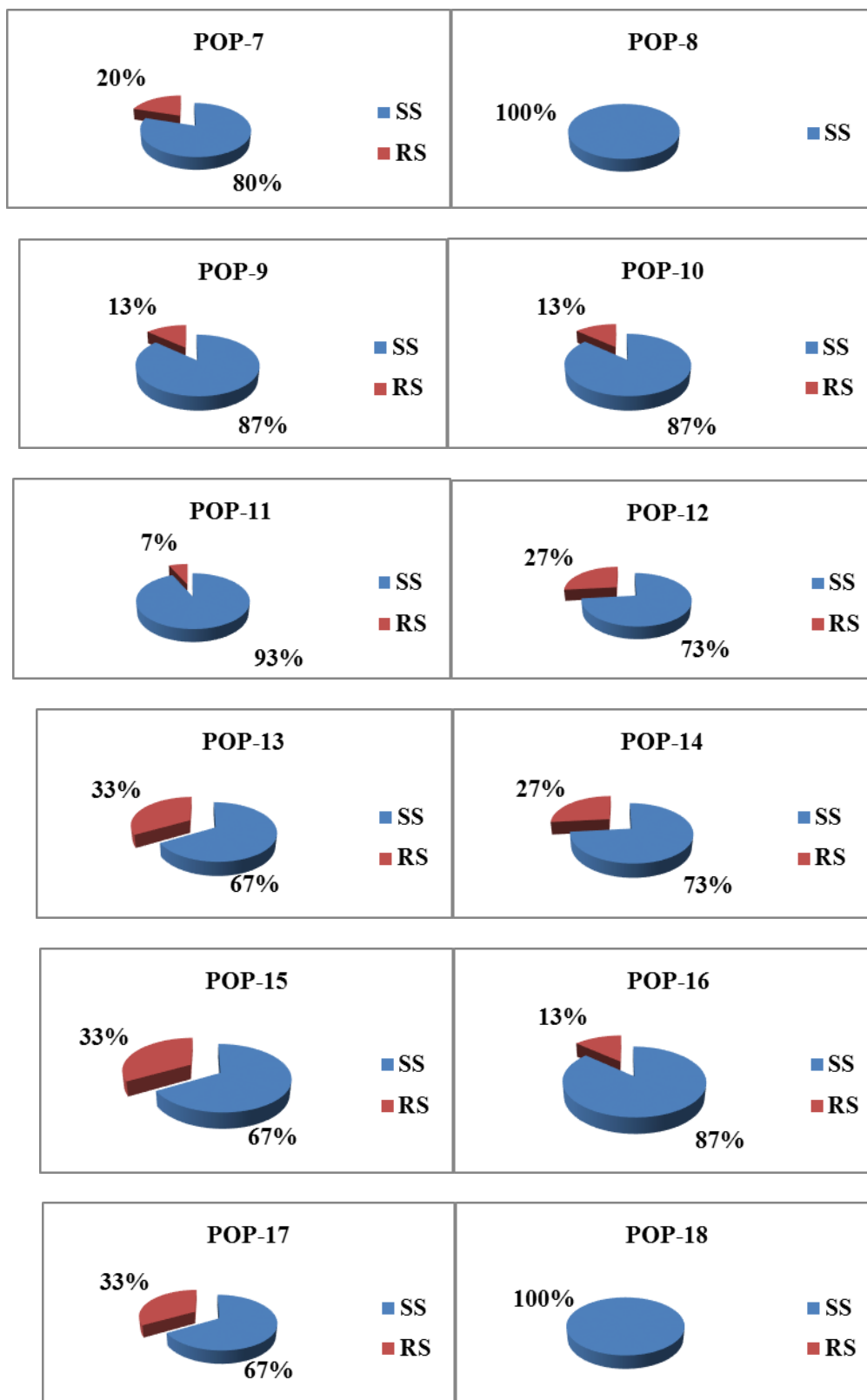
3.1. ace-1 Genindeki Gly119Ser ve Phe290Val Mutasyonlarının Saptanmasına İlişkin Bulgular

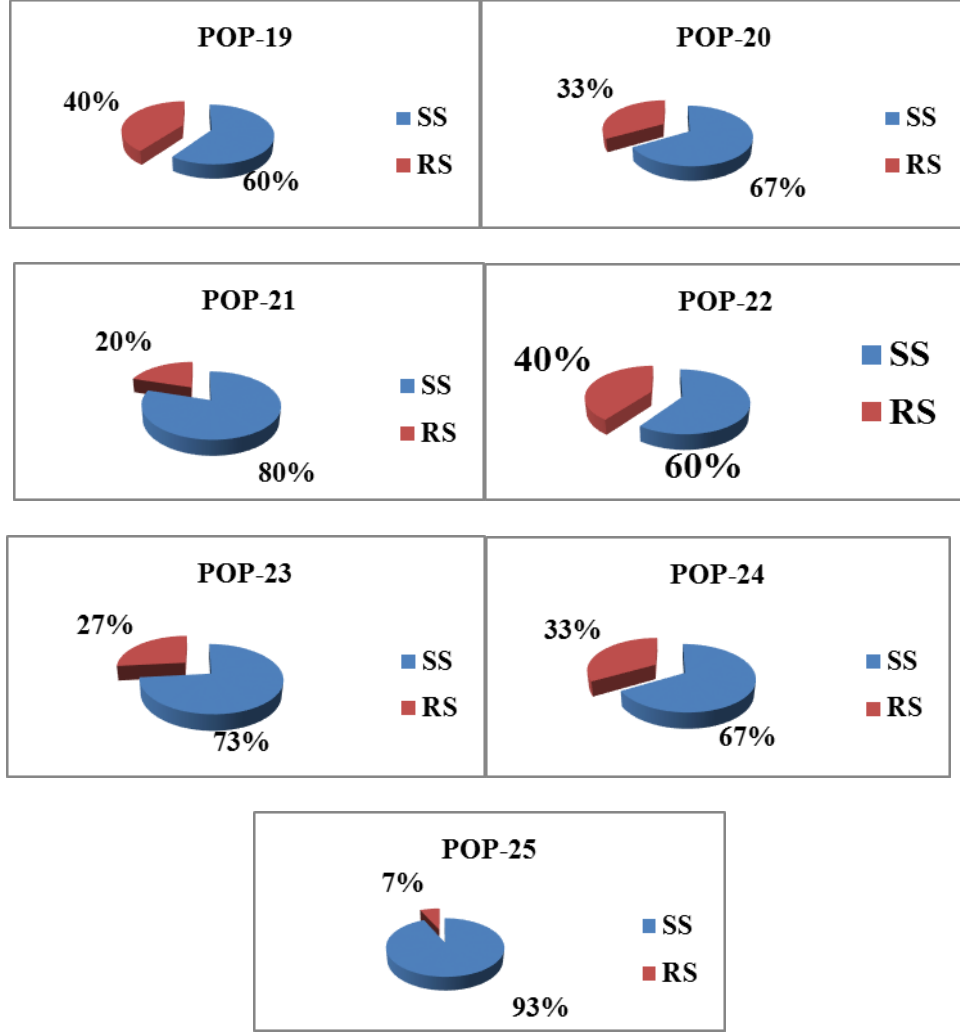
3.1.1. ace-1 geninde Gly119Ser mutasyonunun belirlenmesine ilişkin bulgular

3.1.1.1. Birinci toplama dönemine ilişkin bulgular

ace-1 geninde Gly119Ser mutasyonu için birinci dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumlarını gösteren grafik Şekil 3.1.'de verilmiştir.

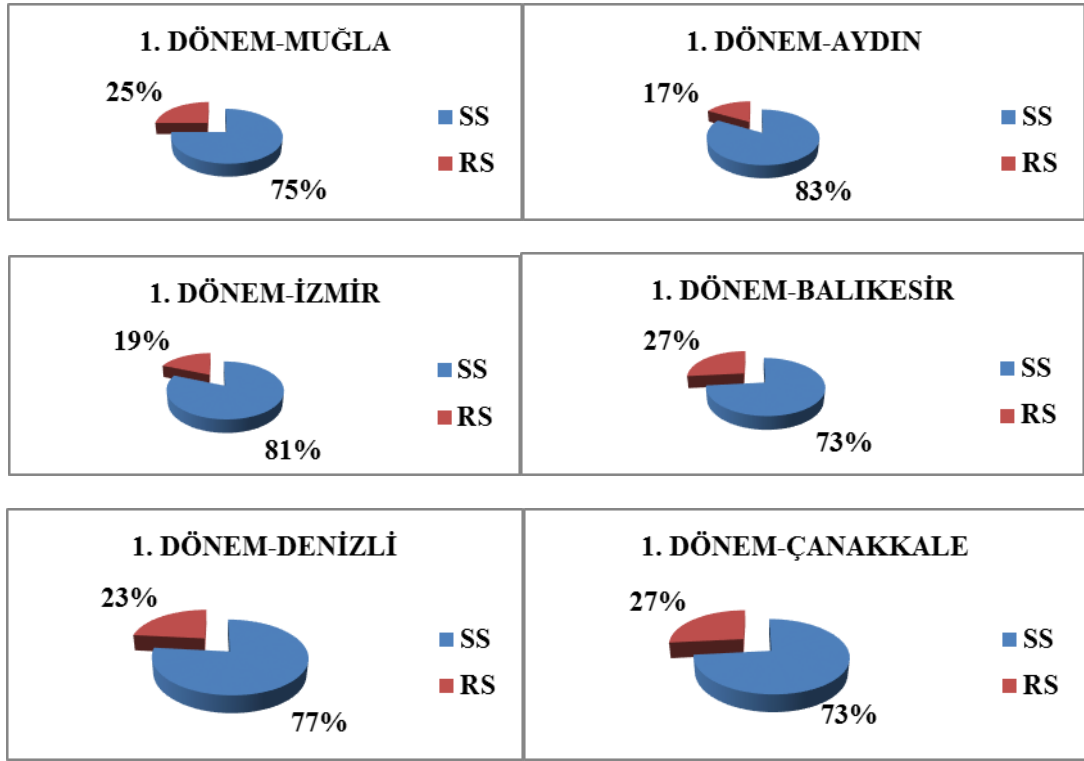




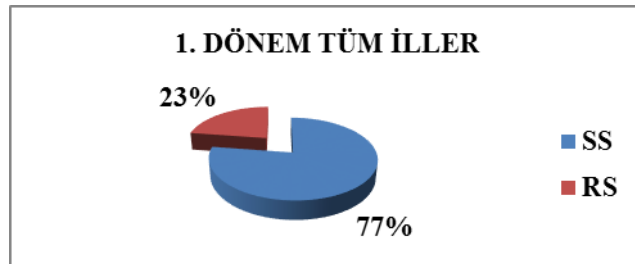


Şekil 3.1. *ace-1* geninde Gly119Ser mutasyonu için birinci dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumlar.

ace-1 geninde Gly119Ser mutasyonu için birinci dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre homozigot dirençli (RR) hiçbir bireye rastlanmamıştır. Çalışılan populasyonlarda % 17-27 arasında heterozigot (RS) bireye rastlanmıştır. Birinci dönem sonuçlarına göre en yüksek direnç % 27 ile Balıkesir ve Çanakkale’de gözlenirken, en düşük direnç ise % 7 ile Aydın’da gözlenmiştir (Şekil 3.2.). *ace-1* genindeki Gly119Ser mutasyonu için yapılan çalışmanın birinci dönem sonuçlarının tüm illere göre ortalamaları Şekil 3.3.’te verilmiştir.



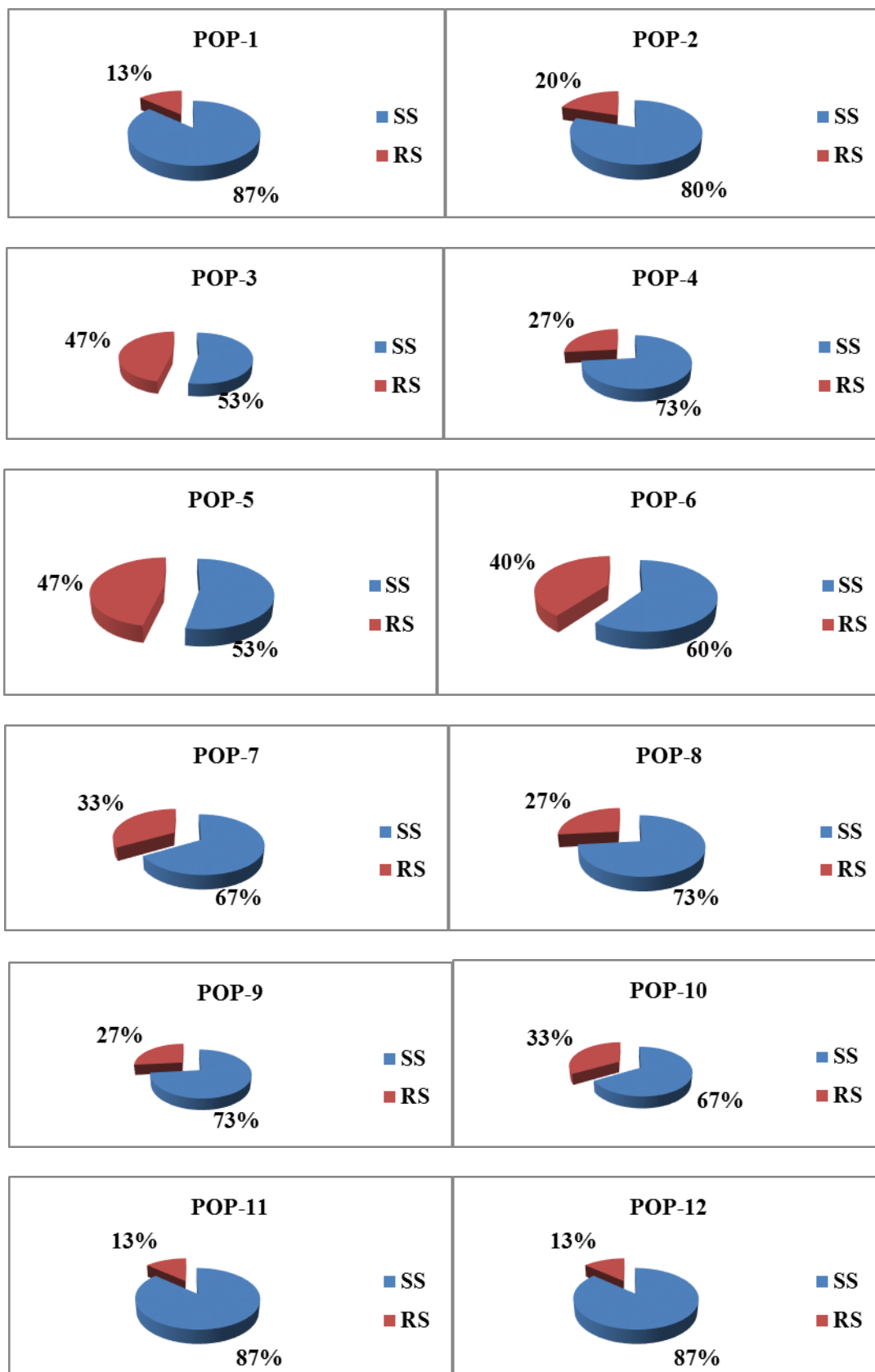
Şekil 3.2. *ace-1* genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre illerin birinci dönem popülasyonları için direnç durumları.

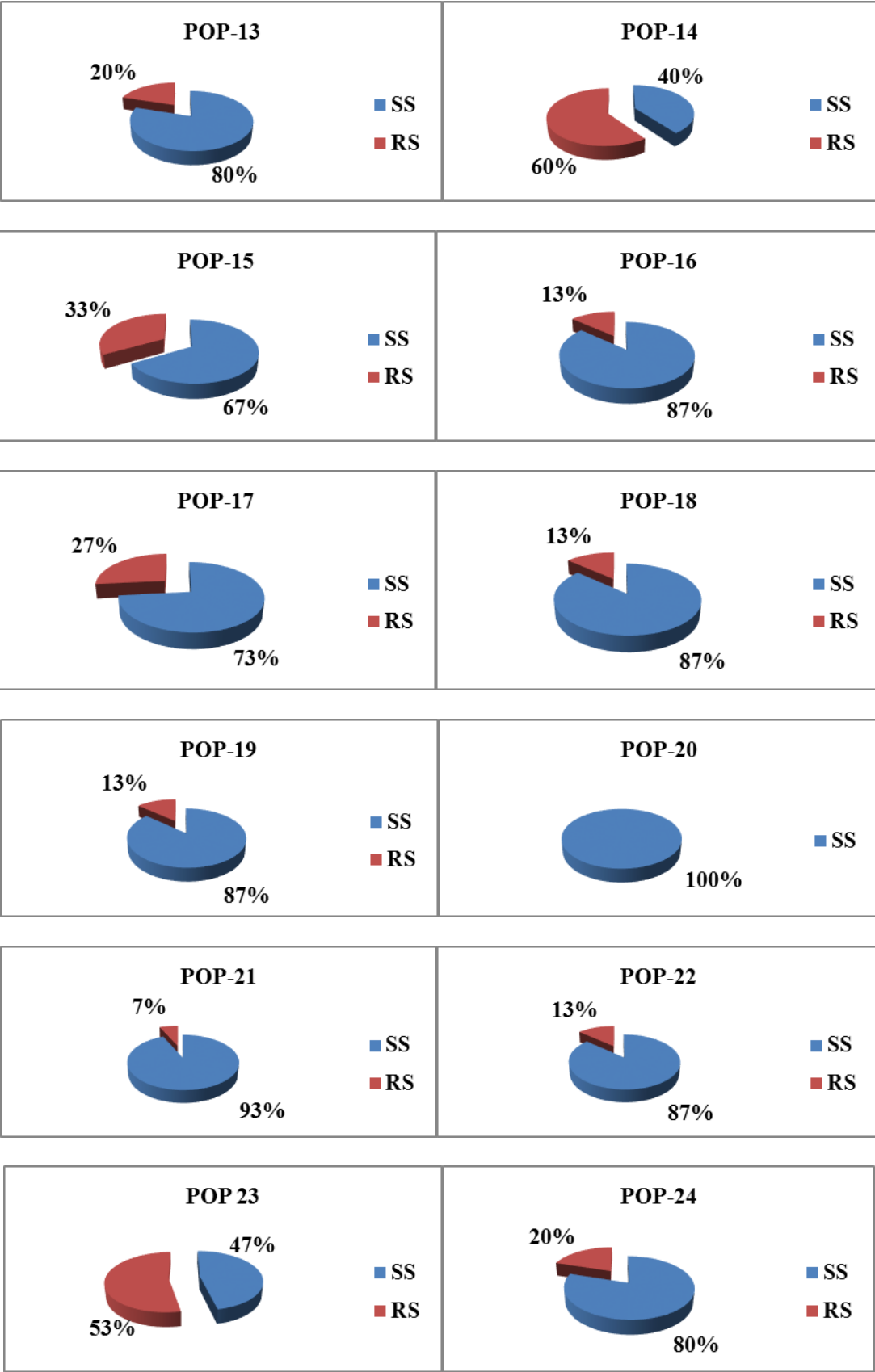


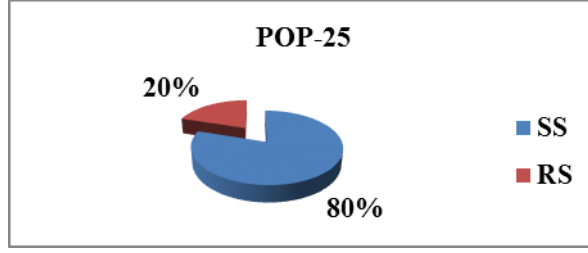
Şekil 3.3. Birinci toplama dönemi için *ace-1* genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları.

3.1.1.2. İkinci toplama dönemine ilişkin bulgular

ace-1 geninde Gly119Ser mutasyonu için ikinci dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumlarını gösteren grafik Şekil 3.4.' te verilmiştir.

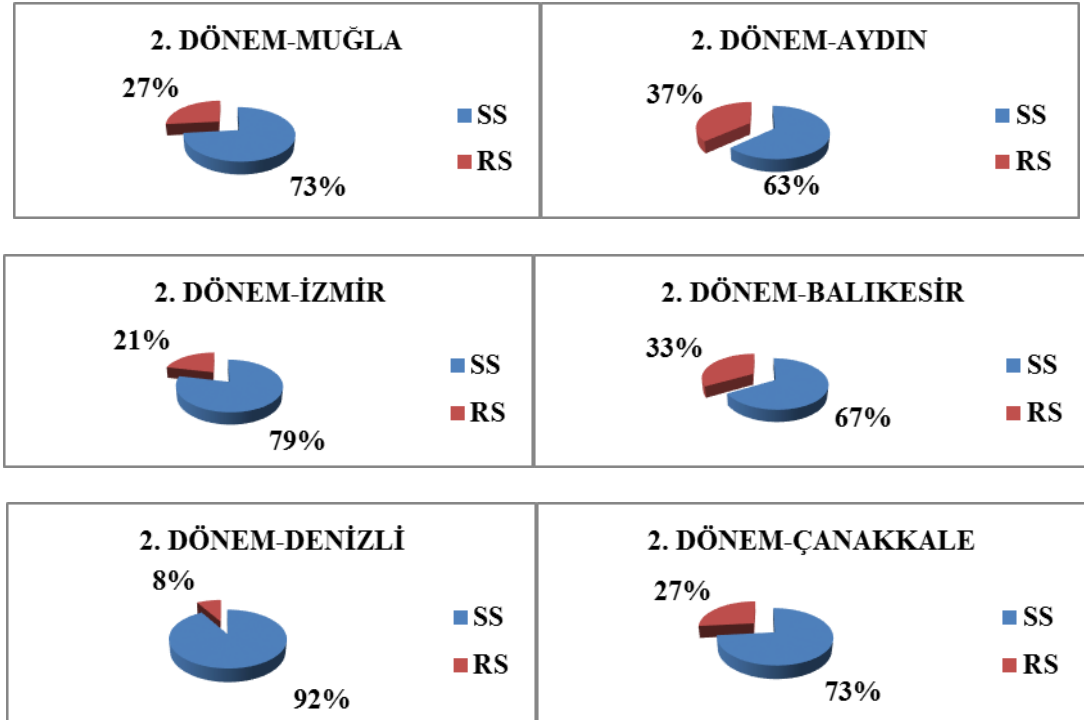




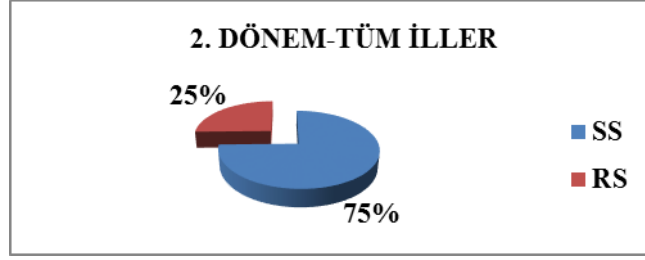


Şekil 3.4. *ace-1* geninde Gly119Ser mutasyonu için ikinci dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumları.

İkinci toplama dönemine ilişkin elde edilen sonuçlara göre *ace-1* geni için yapılan çalışmada homozigot dirençli (RR) hiçbir bireye rastlanmamıştır. Çalışılan populasyonlarda % 8-37 arasında heterozigot (RS) bireye rastlanmıştır. İkinci toplama dönemi il ortalamaları sonucunda en yüksek direnç durumu % 37 ile Aydın'da gözlenirken, en düşük direnç durumu ise % 8 ile Denizli'de gözlenmiştir (Şekil 3.5.). İkinci toplama dönemi için *ace-1* genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları Şekil 3.6.'da verilmiştir.



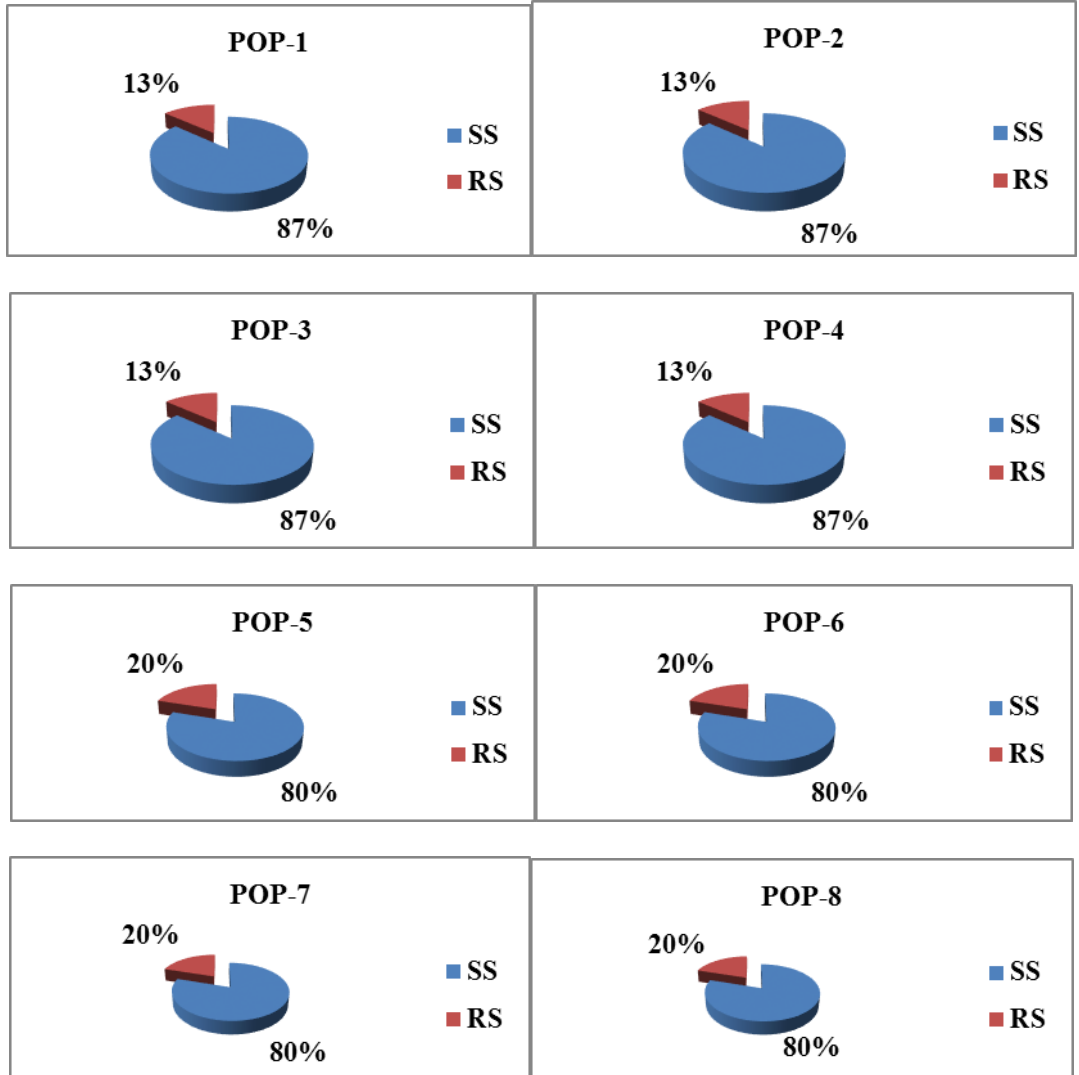
Şekil 3.5. *ace-1* genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre illerin ikinci dönem populasyonları için direnç durumları.

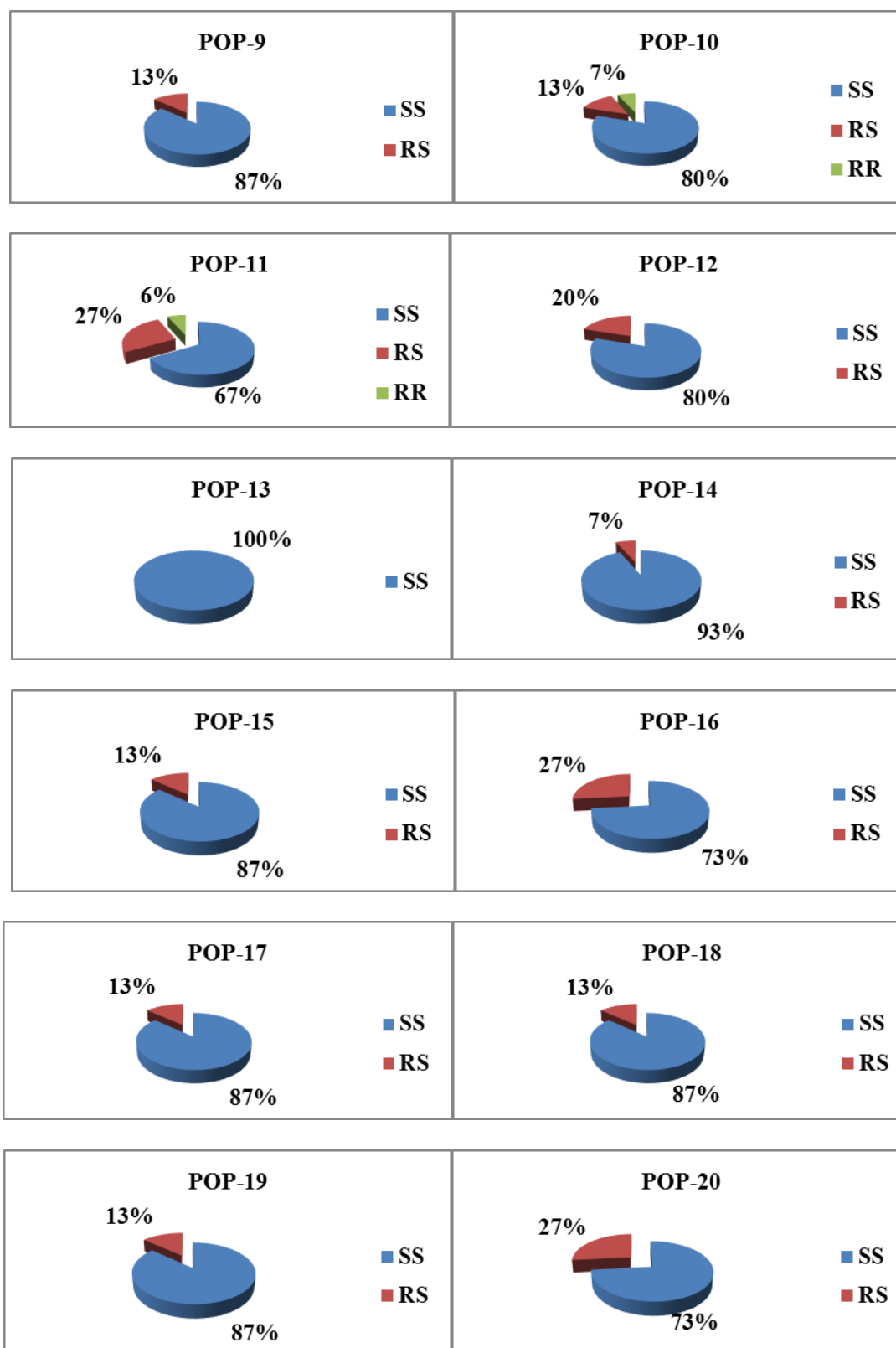


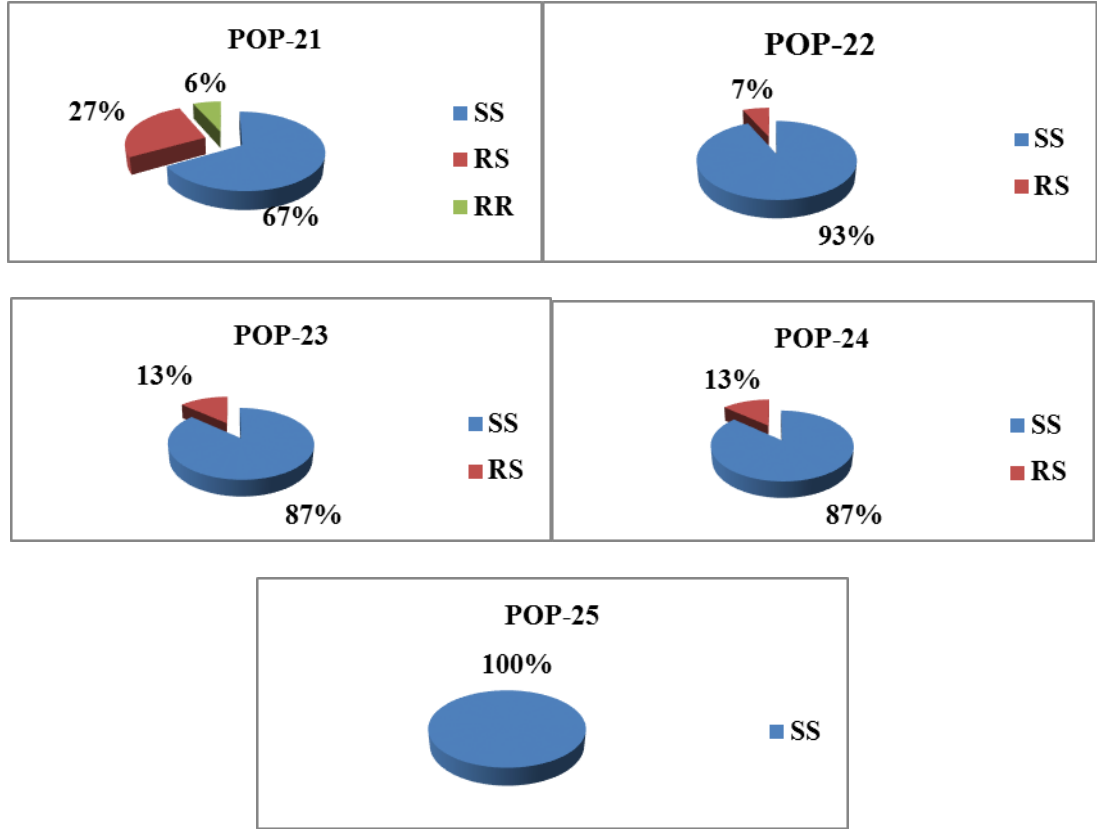
Şekil 3.6. İkinci toplama dönemi için *ace-1* genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları.

3.1.1.3. Üçüncü toplama dönemine ilişkin bulgular

ace-1 geninde Gly119Ser mutasyonu için üçüncü dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumlarını gösteren grafik Şekil 3.7.' de verilmiştir.

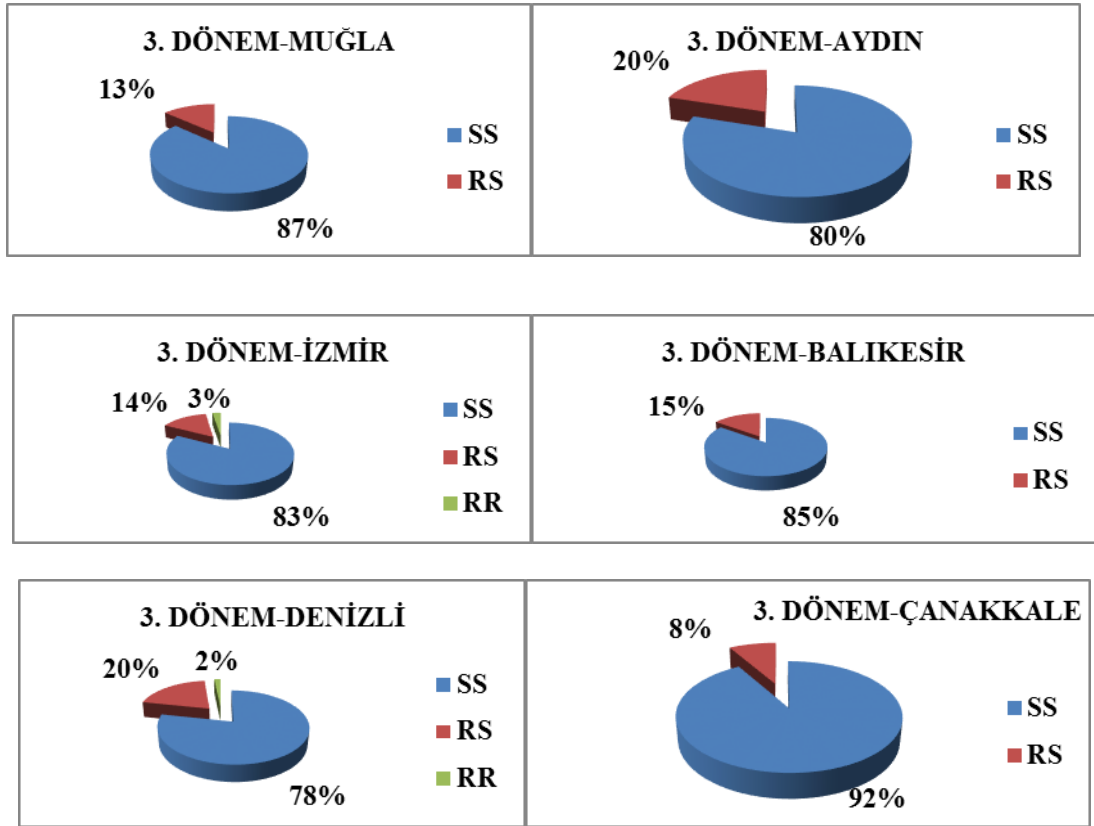




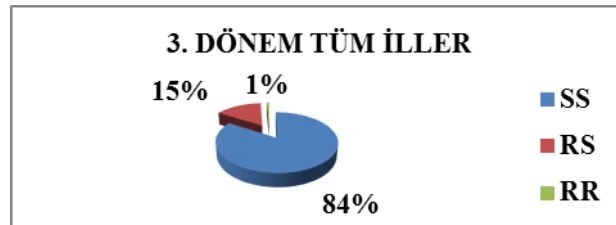


Şekil 3.7. *ace-1* geninde Gly119Ser mutasyonu için üçüncü dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumları.

Üçüncü toplama döneminde örneklenmiş olan populasyonların *ace-1* genine ilişkin analizleri sonucunda İzmir’de % 3 ve Denizli’de % 2 oranında homozigot dirençli (RR) bireye rastlanmıştır. Çalışılan populasyonlarda % 8-22 arasında heterozigot (RS) bireye rastlanmıştır. Üçüncü toplama dönemi il ortalamaları sonucunda en yüksek direnç durumu % 22 ile Denizli’de gözlenirken, en düşük direnç durumu ise % 8 ile Çanakkale’de gözlenmiştir (Şekil 3.8.). Üçüncü toplama dönemi için *ace-1* genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları Şekil 3.9.’ da verilmiştir.



Şekil 3.8. *ace-1* genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre illerin üçüncü dönem popülasyonları için direnç durumları.

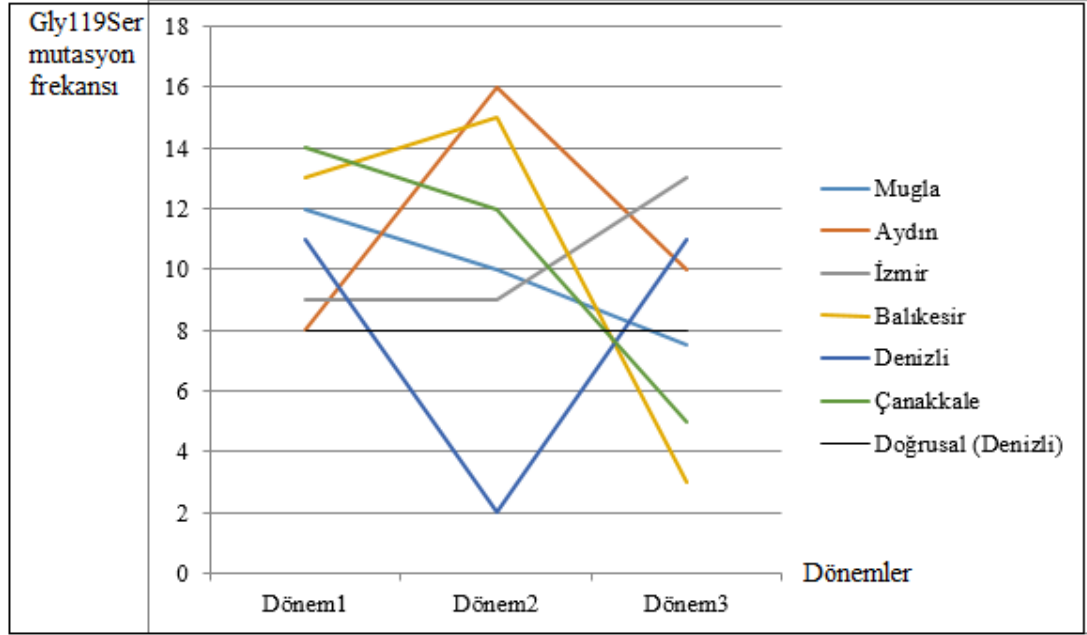


Şekil 3.9. Üçüncü toplama dönemi için *ace-1* genindeki Gly119Ser mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları.

Gly119Ser mutasyon frekanslarının her bir dönemdeki il ortalamalarına bakıldığında, çalışılan illerde bu mutasyonun dönemler bazında belirgin ortak bir patern göstermeği görülmüştür (Çizelge 3.1., Şekil 3.10.).

Çizelge 3.1. Gly119Ser mutasyon frekanslarının her bir dönemdeki il ortalamaları.

Gly119Ser	Dönem1	Dönem2	Dönem3
Muğla	12	10	7,5
Aydın	8	16	10
İzmir	9	9	13
Balıkesir	13	15	3
Denizli	11	2	11
Çanakkale	14	12	5

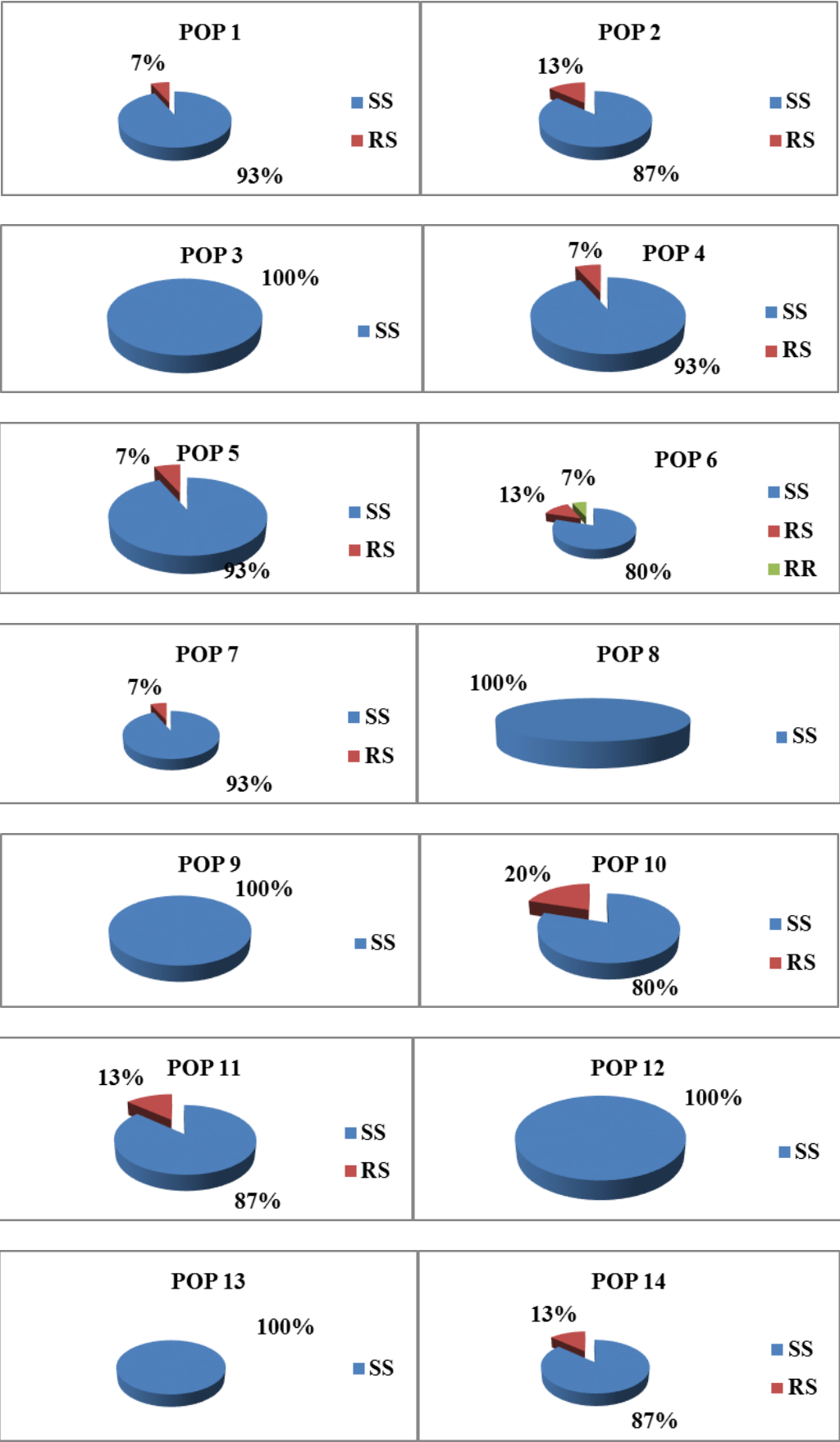


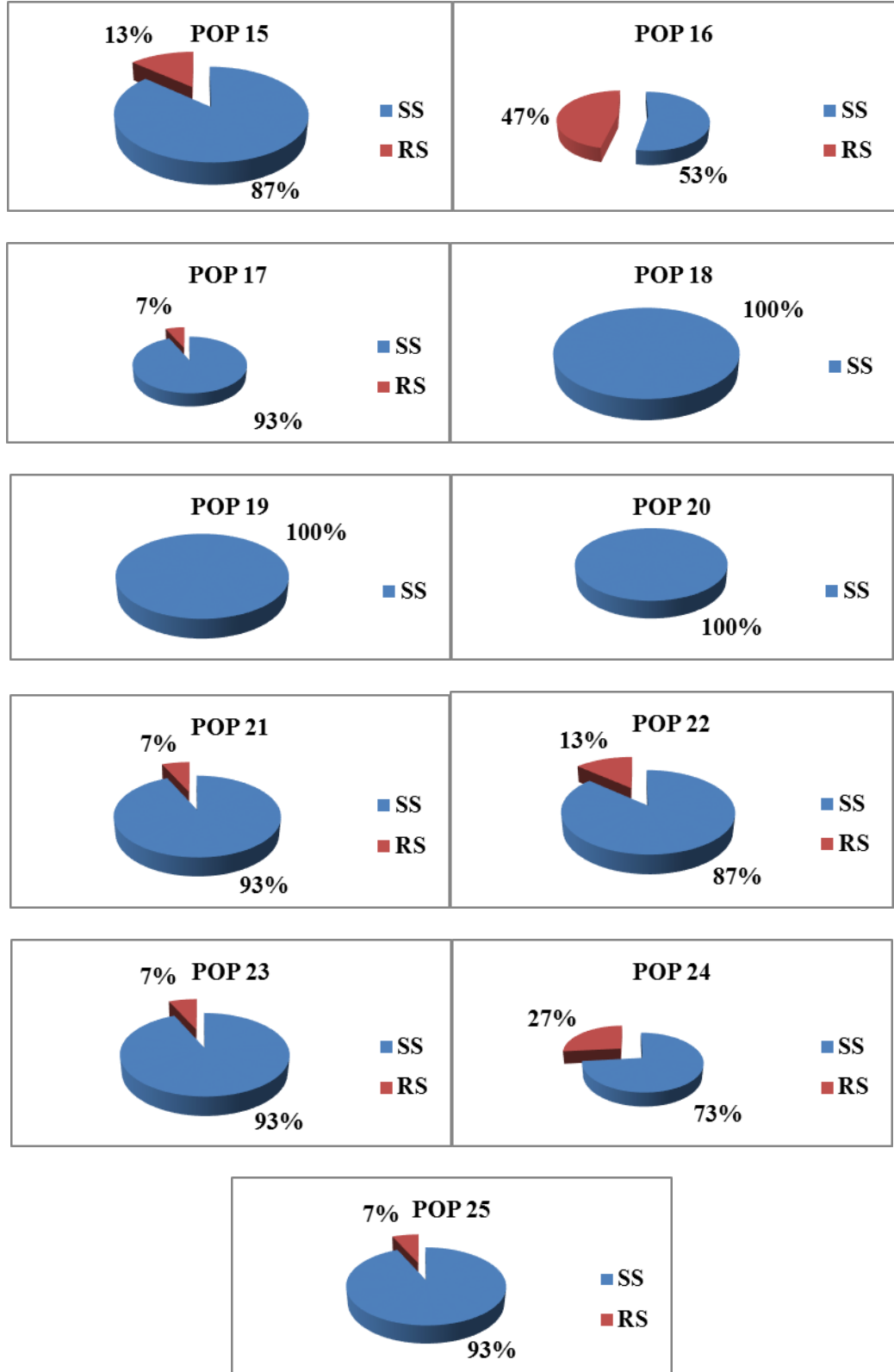
Şekil 3.10. Gly119Ser mutasyon frekanslarının her bir dönemdeki il ortalamalarının grafiksel gösterimi.

3.1.2. *ace-1* geninde Phe290Val mutasyonunun belirlenmesine ilişkin bulgular

3.1.2.1. Birinci toplama dönemine ilişkin bulgular

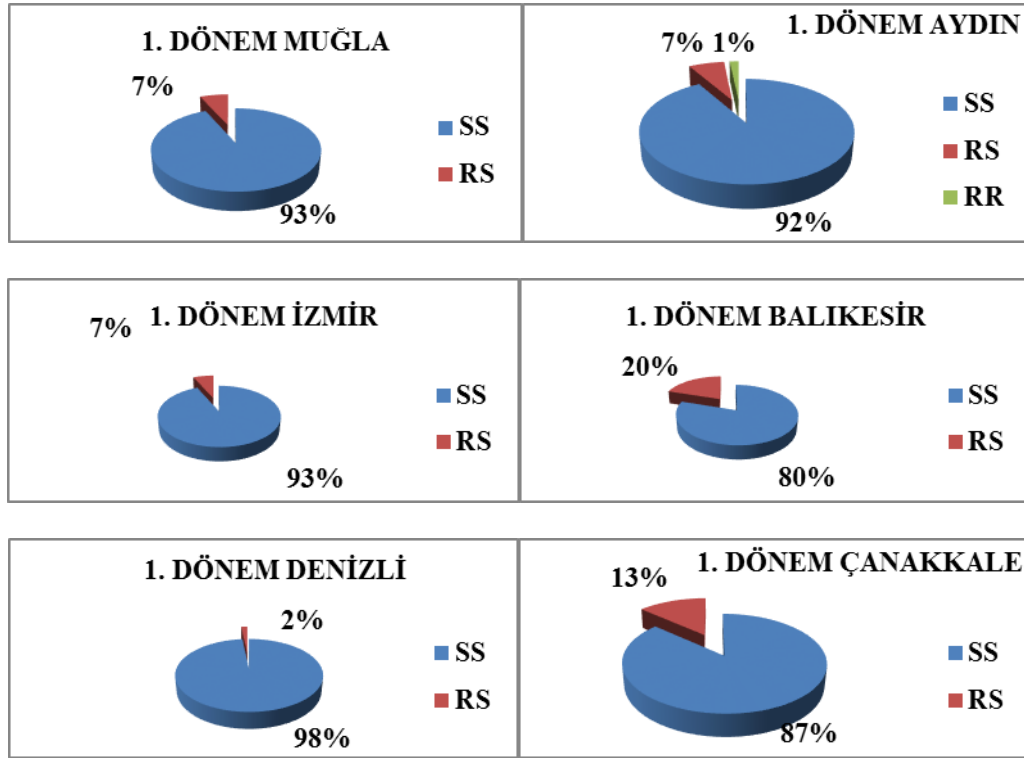
ace-1 geninde Phe290Val mutasyonu için birinci dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumlarını gösteren grafik Şekil 3.11.'de verilmiştir.



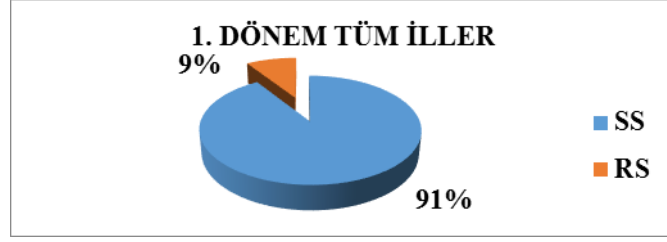


Şekil 3.11. *ace-1* geninde Phe290Val mutasyonu için birinci dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumları.

Birinci dönem populasyonlarının Phe290Val mutasyonuna göre analizleri sonucunda Pop 6’da % 7 oranında homozigot dirençli (RR) bireye rastlanmıştır. Çalışılan populasyonlarda en yüksek direnç durumu % 47’lik bir oran ile Pop 16’da belirlenirken populasyonlarda genel olarak % 0-47 arasında heterozigot (RS) bireye rastlanmıştır. Birinci dönem için Phe290Val mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları Şekil 3.12.’ de verilmiştir. Birinci toplama dönemi il ortalamaları sonucunda en yüksek direnç durumu %20 ile Balıkesir’de gözlenirken, en düşük direnç durumu ise % 2 ile Denizli’de gözlenmiştir. Birinci toplama dönemi için *ace-1* genindeki Phe290Val mutasyonuna göre tüm illerin ortalamalarını gösteren grafik Şekil 3.13.’ te verilmiştir.



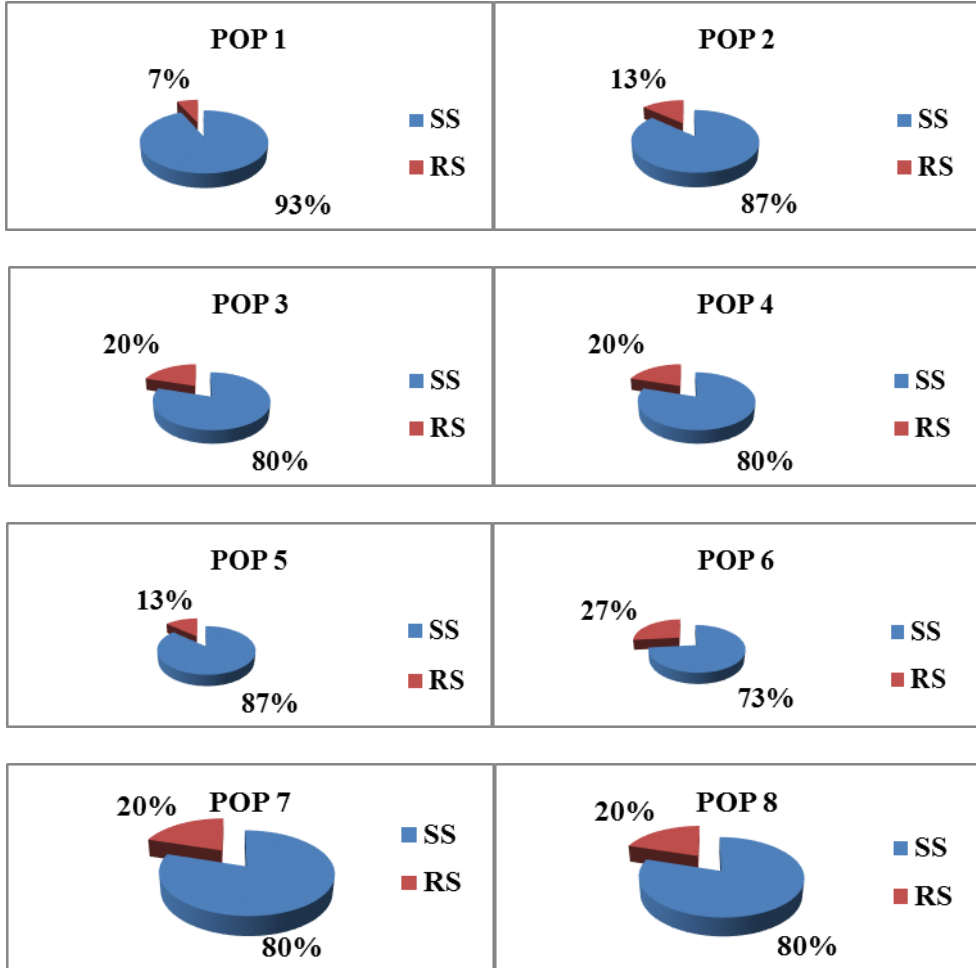
Şekil 3.12. *ace-1* genindeki Phe290Val mutasyonuna göre illerin birinci dönem populasyonları için direnç durumları.

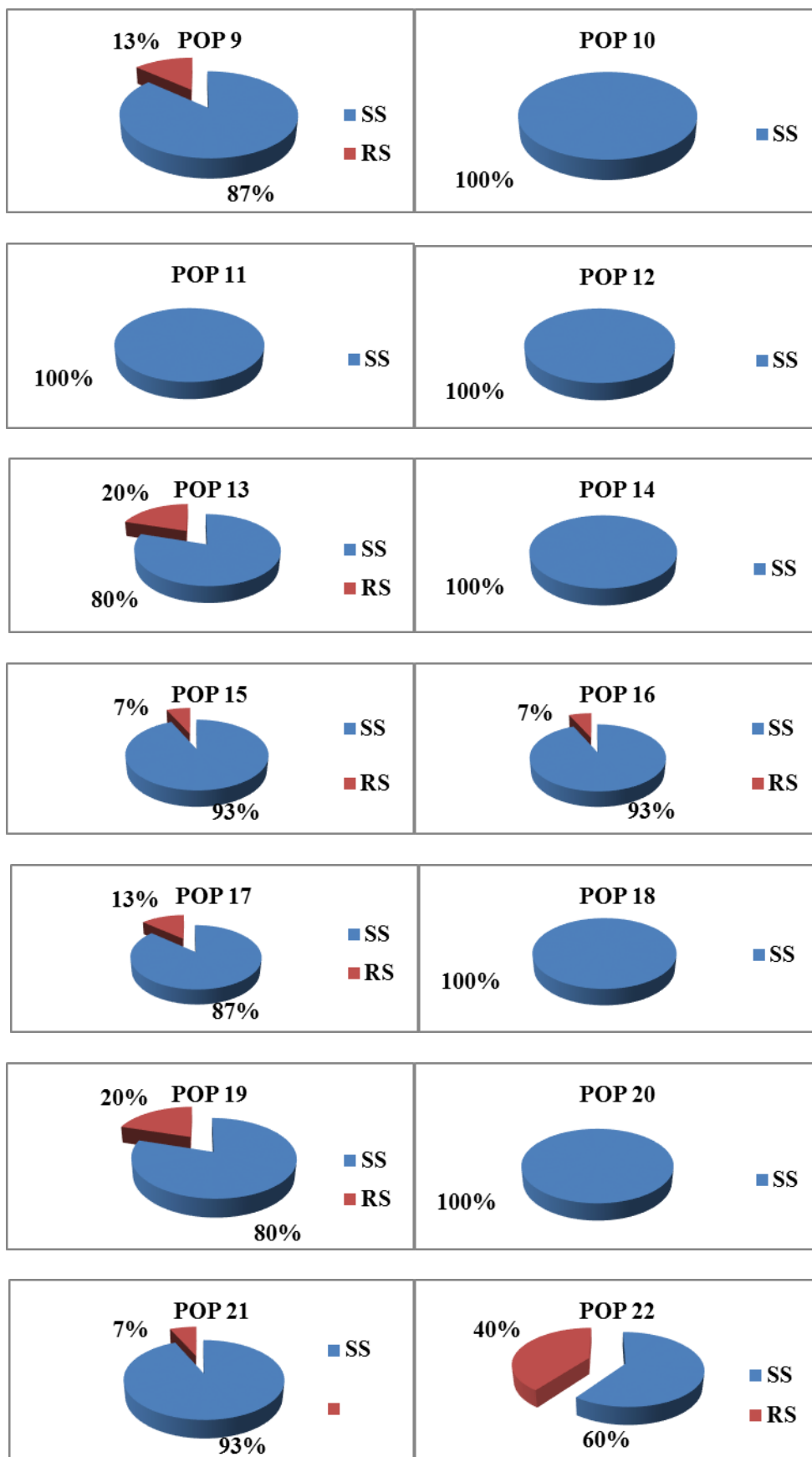


Şekil 3.13. Birinci toplama dönemi için *ace-1* genindeki Phe290Val mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları.

3.1.2.2. İkinci toplama dönemine ilişkin bulgular

ace-1 geninde Phe290Val mutasyonu için ikinci dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumlarını gösteren grafik Şekil 3.14.' te verilmiştir.

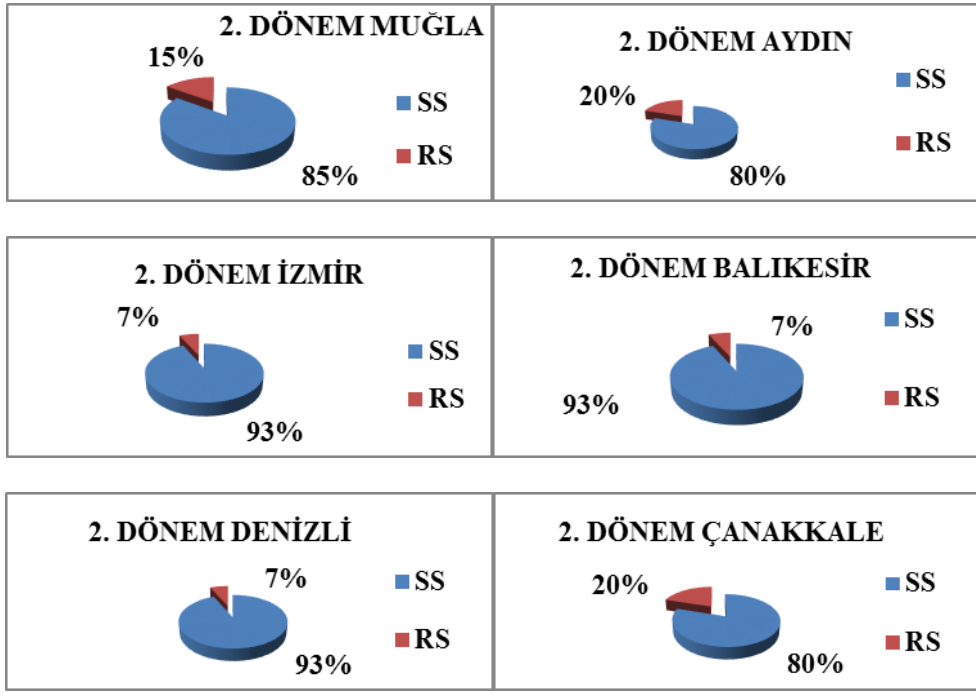




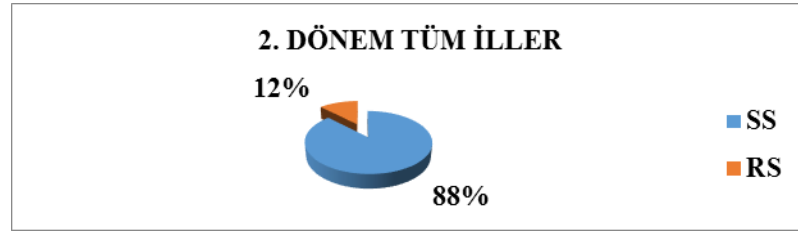


Şekil 3.14. *ace-1* geninde Phe290Val mutasyonu için ikinci dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumları.

İkinci toplama döneminde örneklenmiş olan populasyonların Phe290Val mutasyonuna göre analizleri sonucunda homozigot dirençli (RR) hiçbir bireye rastlanmıştır. Çalışılan populasyonlarda en yüksek direnç durumu % 40'lık bir oran ile Pop 22'de belirlenirken populasyonlarda genel olarak % 0-40 arasında heterozigot (RS) bireye rastlanmıştır. İkinci toplama dönemi için Phe290Val mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları Şekil 3.15.' te verilmiştir. İkinci toplama dönemi il ortalamaları sonucunda en yüksek direnç durumu % 20 ile Aydın ve Çanakkale'de gözlenirken, en düşük direnç durumu ise % 7 ile İzmir, Denizli ve Balıkesir'de gözlenmiştir. İkinci toplama dönemi için *ace-1* genindeki Phe290Val mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları Şekil 3.16.' da verilmiştir.



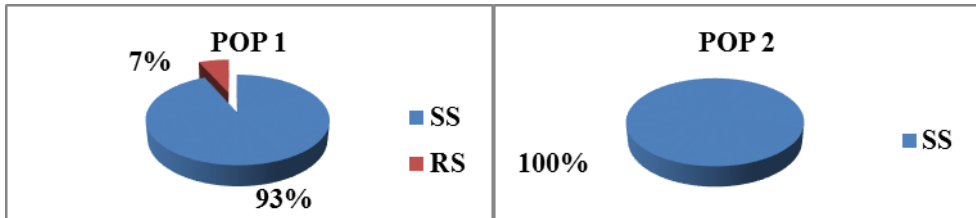
Şekil 3.15. *ace-1* genindeki Phe290Val mutasyonuna göre illerin ikinci dönem popülasyonları için direnç durumları.

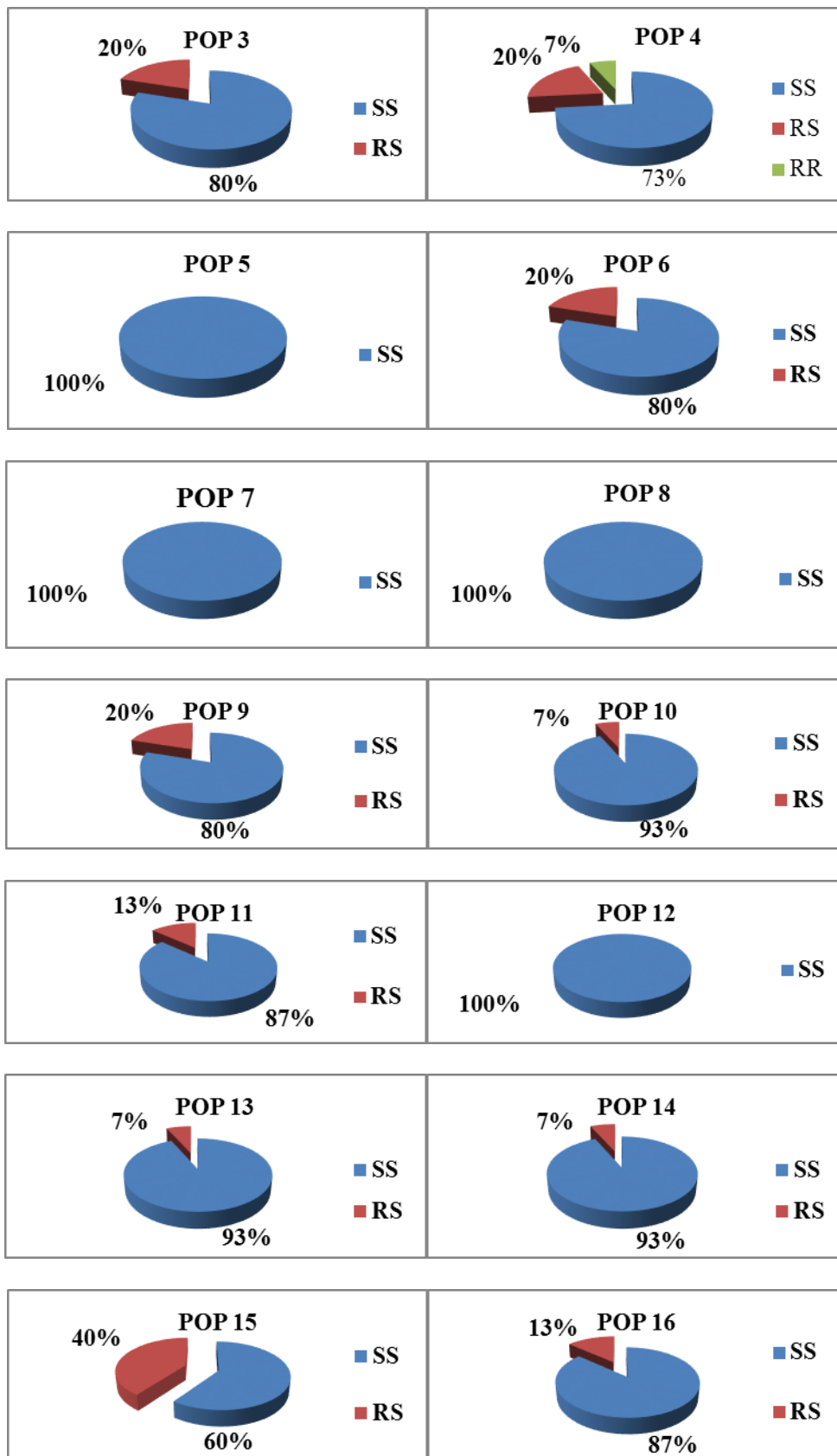


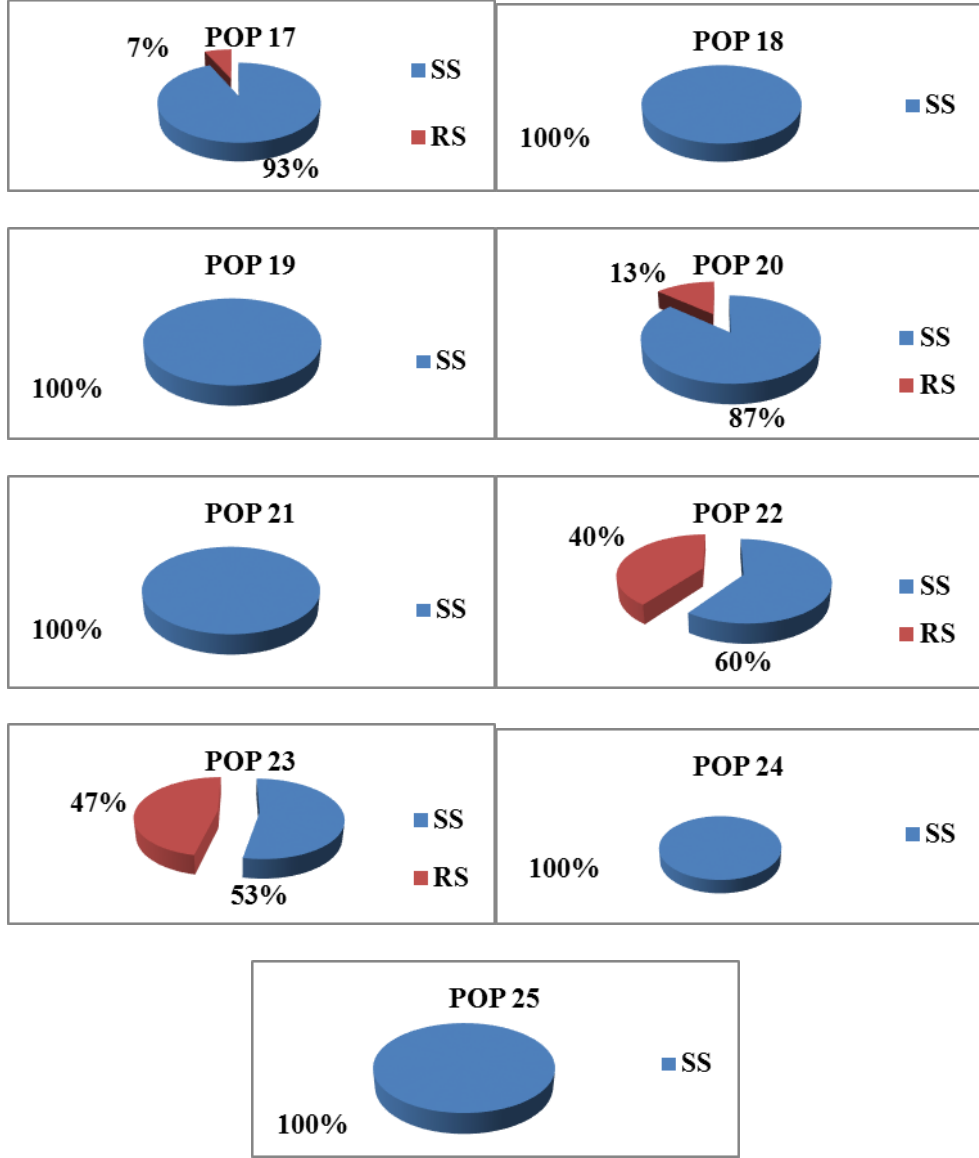
Şekil 3.16. İkinci toplama dönemi için *ace-1* genindeki Phe290Val mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları.

3.1.2.3. Üçüncü toplama dönemine ilişkin bulgular

ace-1 geninde Phe290Val mutasyonu için üçüncü dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumlarını gösteren grafik Şekil 3.17.' de verilmiştir.

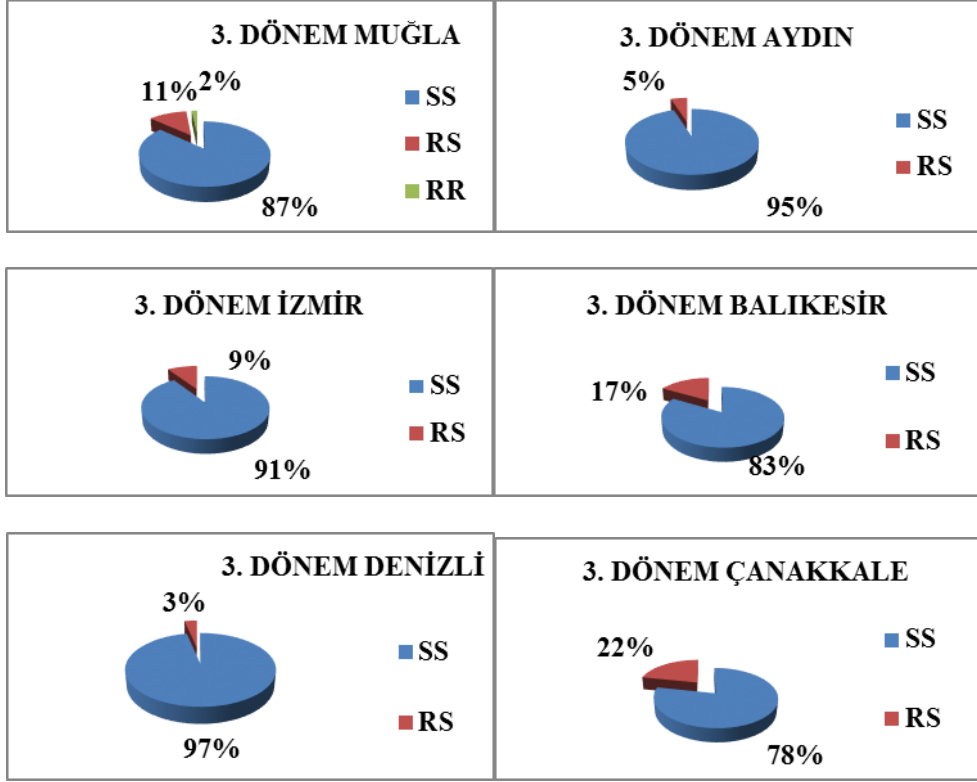




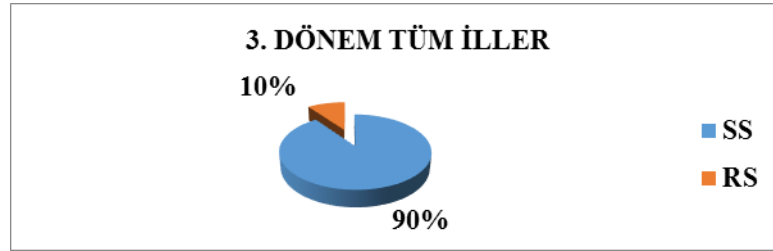


Şekil 3.17. *ace-1* geninde Phe290Val mutasyonu için üçüncü dönem örneklerine yapılan çalışma sonuçlarına göre direnç durumları.

Üçüncü toplama döneminde örneklenmiş olan populasyonların Phe290Val mutasyonuna göre analizleri sonucunda sadece Pop 4'te % 7 oranında homozigot dirençli (RR) bireye rastlanmıştır. Çalışılan populasyonlarda en yüksek direnç durumu % 47'lik bir oran ile Pop 23'de belirlenirken populasyonlarda genel olarak % 0-47 arasında heterozigot (RS) bireye rastlanmıştır. Üçüncü toplama dönemi için Phe290Val mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları Şekil 3.18.' de verilmiştir. Üçüncü toplama dönemi il ortalamaları sonucunda en yüksek direnç durumu % 22 ile Çanakkale'de gözlenirken, en düşük direnç durumu ise % 3 ile Denizli'de gözlenmiştir.



Şekil 3.18. *ace-1* genindeki Phe290Val mutasyonuna göre illerin üçüncü dönem populasyonları için direnç durumları.

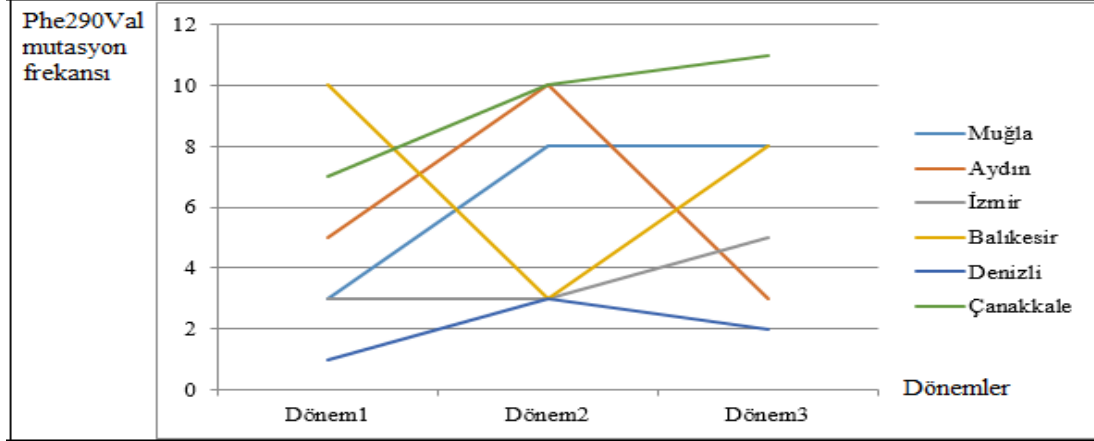


Şekil 3.19. Üçüncü toplama dönemi için *ace-1* genindeki Phe290Val mutasyonuna göre tüm illerin ortalamaları.

Phe290Val mutasyon frekanslarının her bir dönemdeki il ortalamalarına bakıldığında, çalışılan illerde bu mutasyonun dönemler bazında belirgin ortak bir patern göstermeği görülmüştür.

Çizelge 3.2. Phe290Val mutasyon frekanslarının her bir dönemdeki il ortalamaları.

Phe290Val	Dönem-1	Dönem-2	Dönem-3
Muğla	3	8	8
Aydın	5	10	3
İzmir	3	3	5
Balıkesir	10	3	8
Denizli	1	3	2
Çanakkale	7	10	11



Şekil 3.20. Phe290Val mutasyon frekanslarının her bir dönemdeki il ortalamalarının grafiksel gösterimi.

3.1.3. ace-1 genindeki direnç mutasyonlarının birlikte değerlendirilmesi

ACH_{E1} fenotipleri PCR-RFLP ve PASA testleri ile saptanmış olup, bu testler Gly119Ser ve Phe290Val ve yabanıl tip duyarlı allellerin tümünü ayırt edebilmiştir. Elde edilen Gly119Ser ve Phe290Val mutasyonlarının her biri her üç dönemde de düşük frekans ve geniş coğrafik dağılım göstermiştir. *ace-1* lokusundaki Gly119Ser mutasyonu için homozigot duyarlı (SS), *ace-1^R* mutasyonu için heterozigot (RS) ve *ace-1^R* mutasyonu için homozigot (RR) bireyler saptanmıştır. Her üç dönemde de örneklerin büyük bir çoğunluğu homozigot duyarlı (SS) olarak bulunurken, heterozigotların 6 coğrafik lokasyondaki üç döneme ait ortalama frekansları % 17 ila % 22 arasında değişmiş, her üç dönem için analiz edilen toplam 1,125 bireyden sadece 2 tanesinin *ace-1^R* mutasyonu için homozigot dirençli (RR) olduğu görülmüştür. Phe290Val mutasyonu için SS ve RS genotiplerinin ortalama dönemsel frekansları sırasıyla % 88-91 ve % 9-12 arasında değişmiş ve homozigot dirençli

(RR) hiçbir bireye rastlanmamıştır. *ace-1* genindeki her iki direnç mutasyonu için dirençli homozigot bireylerin frekansı son derece düşüktür ($< \% 0.2$). Homozigot dirençli *Culex pipiens* bireylerinin doğadaki bu yok denecek oranları, her iki mutasyonun da homozigot durumda bulunmaları halinde ödenen yüksek genetik bedelle uyumludur (Lenormand ve ark., 1998; Berticat ve ark. 2002; Bourguet ve ark. 2004).

Her iki *ace-1* direnç mutasyonunun üç dönemdeki ortalama dönemsel frekansları oldukça düşük olup, Gly119Ser mutasyonu için ≤ 0.11 ve Phe290Val mutasyonu için ise ≤ 0.06 olarak bulunmuştur. Bu durum, OP/CB insektisitlerinin sürekli ancak sınırlı kullanımlarının bir sonucu olabilir. Diğer bir değişle, pyrethroidlerin artan kullanımı bu mutasyonların doğadaki seçilimini engellemiştir. Her iki direnç mutasyonunun çalışılan dönemlerdeki frekansları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P \geq 0.05$)

ace-1'deki her iki direnç mutasyonunun tüm dönemlerdeki ve tüm lokasyonlardaki gözlenen frekansları Hardy-Weinberg dengesinden anlamlı bir sapma göstermemiştir. Bu bulgular, Tantalev ve ark. (2010)'un bulgularına benzer şekilde, olasılıkla ülkemizin Ege Bölgesi'nde *ace-1* geninde duplikasyon olmadığına işaret etmektedir. Oysa daha önce çeşitli Karayipler, Akdeniz ve Güneydoğu ülkelerinde *ace-1* geninin dirençli ve duyarlı kopyaları rapor edilmiştir (Labbe ve ark. 2007). Ülkemiz örneklerinde *ace-1* geninde duplikasyon olup olmadığı üzerinde detaylı olarak çalışılmalıdır.

Gly119Ser ve Phe290Val mutasyonlarının takip eden üç dönemdeki düşük frekansları ve çoğunlukla heterozigot dirençlilik durumları Osta ve ark. (2008)'in Lübnan ve Kioulos ve ark. (2014)'ün Yunanistan'da yapmış oldukları *Culex pipiens*'in AChE1 direnç mutasyon dağılımları ile uyumlu, ancak Alout ve ark. (2009)'un diğer Akdeniz ülkeleri için yapmış oldukları çalışmadakine göre ise düşüktür. Lübnan, Türkiye ve Yunanistan'daki direnç mutasyon frekanslarındaki benzerlik, Doğu Akdeniz'deki benzer insektisit kullanım paternleri ile açıklanabilir. Daha önce gösterildiği üzere, her iki mutasyon farklı OP insektisitlere karşı farklı düzeylerde direnç ortaya koyduğundan (Alout ve ark., 2007), her iki mutasyon için

gözlenen frekans farklılıkları, lokal olarak kullanılan insektisitlerin doğası ile açıklanabilir.

Eğer insektisit kullanımı sınırlı ise, pleiotropik bedelden ötürü bir direnç geni çoğunlukla dezavantajlı olacaktır (Chevillon ve ark. 1995a). *Culex pipiens*'in arazi popülasyonlarında saptanan düşük *ace-1* direnç mutasyon frekansları, Gazave ve ark. (2001), Berticat ve ark. (2002), Bourguet ve ark. (2004) ve Weill ve ark. (2005) tarafından detaylı bir şekilde ortaya konulan mutasyonların uyum bedelleri durumları ile birlikte, toplama sezonları boyunca uygulanan zayıf OP/CB insektisit seleksiyon baskılarının bir sonucu olabilir ya da ülkemizde bu türe karşı uygulanan insektisit mücadelesinin uzun tarihini göz önüne aldığımızda, çok daha düşük bir olasılıkla bu mutasyonların bölgede ortaya çıkışları yakın bir zamanda olmuş olabilir. Bir diğer alternatif açıklama da sivrisineklerin çevredeki insektisit kullanılan alanlardan kullanılmayan alanlara pasif taşınma ile göçleri olabilir. Yakın zamanda *C. quinquefasciatus*'un laboratuvar popülasyonlarında yapılan bir çalışmada ortaya konulan oldukça ilginç ve dikkat çekici bir bulguya göre *kdr* mutasyonu insektisit kullanılmayan bir ortamda *ace-1^R* mutasyon bedelini kompanse edebilmektedir ki bu da sadece CB'lara dirençli sivrisineklere göre hem PYR ve hem de CB insektisitlere karşı dirençli olan sivrisineklerde *ace-1^R*'ye karşı seleksiyon baskısının daha yavaş olduğuna işaret etmektedir (berticat ve ark. 2008). Bu da çalışılan bölgede *C. pipiens* popülasyonlarında AChE1 direnç mutasyonlarının halen düşük frekanslarda bulunuyor olmalarını açıklayabilir. Bu interaksiyonları anlamamız, Türkiye'de ve dünyada direnç yönetimi konusunda etkili stratejiler geliştirilmesine olanak sağlamanın yanı sıra, fizyolojik prosesleri de anlamamıza ışık tutacaktır.

1990'lardan bu yana, OP/CB insektisitlerin vektör kontrolündeki azalan kullanımları, bölgedeki direnç geni üzerindeki seleksiyon baskısını yeterince zayıflatan bir unsurdur. Ancak, özellikle Doğu Akdeniz'de OP/CB insektisitlerin artan baskısıyla, *Culex pipiens* popülasyonlarında AChE1 direnç mutasyonları önümüzdeki yıllarda büyük olasılıkla hızla artacak ve yayılacaktır. Lenormand ve ark. (1998) tarafından bildirildiği üzere, güney Fransa'da OP kullanılan alanlarda *C. pipiens* popülasyonlarında *ace-1* direnç mutasyonları hızla artmış ve yüksek frekanslara ulaşmıştır. Benzer şekilde, Cui ve ark. (2006) tarafından rapor edildiği üzere Çin'de

de OP/CB kullanılan alanlarda *C. pipiens* populasyonlarında *ace-1^R* mutasyonu yüksek frekanslara ulaşmıştır.

3.2. Populasyonların RAPD Belirteçleriyle Karakterizasyonlarına İlişkin Bulgular

3.2.1. Seksen RAPD primerinin alt populasyonda taranmasına ilişkin bulgular

Oluşturulan alt populasyonda seksen RAPD primerinin taranması sonucunda, 45 primerin hiç birinin alt populasyon bireyleriyle yapılan çalışma sonucunda RAPD bandı oluşturmadığı görülmüştür. Geriye kalan 35 primer, en az 3 polimorfik bant oluşturmuş olup, tüm bireylerde oluşturduğu tüm bantlar bakımından monomorfik olan bir primer saptanmamıştır (Çizelge 3.3.).

Taranan primerlerin 10 tanesiyle 11-14 arasında bant üretilmiştir. Buna karşılık primerlerin büyük çoğunluğunun (21 primer) 6-10 arasında toplam bant sayısına sahip oldukları görülmüştür. 35 polimorfik primerden 21'i 6-9 arasında polimorfik bant oluştururken, 14'ü 3-5 arasında polimorfik bant oluşturmuştur (Çizelge 3.3., Çizelge 3.4.). Primerler tarafından oluşturulan RAPD ürünlerinin büyüklükleri 500 ile 3000 baz çifti aralığında değişmiştir (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. Dört bireylik alt populasyonda taranan 80 OPERON RAPD primeri, baz dizileri, ürettikleri toplam bant sayıları, ürettikleri bantların bant uzunluk aralıkları ve ürettikleri polimorfik bant sayıları.

	Primer Kodu	Primer Dizini (5'-3')	Toplam Bant Sayısı	Bant Uzunluk Aralığı (bp)	Polimorfik Bant Sayısı
1	OPA-11	CAATCGCCGT	6	500 - 3000	5
2	OPA-15	TTCCGAACCC	0	-	-
3	OPA-17	GACCGCTTGT	0	-	-
4	OPA-18*	AGGTGACCGT	6	500 - 3000	5
5	OPA-20*	GTTGCGATCC	4	500 - 3000	3
6	OPB-13	TTCCCCGCT	0	-	-
7	OPB-14	TCCGCTCTGG	6	500 - 3000	5

Çizelge 3.3. (Devam)

	Primer Kodu	Primer Dizini (5'-3')	Toplam Bant Sayısı	Bant Uzunluk Aralığı (bp)	Polimorfik Bant Sayısı
8	OPB-16	TTTGCCCGGA	11	500 - 3000	9
9	OPB-19	ACCCCCGAAG	6	500 - 3000	5
10	OPB-20*	GGACCCTTAC	8	500 - 3000	7
11	OPC-12	TGTCATCCCC	0	-	-
12	OPC-14	TGCGTGCTTG	0	-	-
13	OPC-17	TTCCCCCAG	0	-	-
14	OPC-19*	GTTGCCAGCC	8	500 - 3000	6
15	OPD-11*	AGCGCCATTG	12	500 - 3000	9
16	OPD-14	CTTCCCCAAG	0	-	-
17	OPD-15	CATCCGTGCT	0	-	-
18	OPD-17	TTTCCCACGG	0	-	-
19	OPE-13	CCCGATTCTGG	0	-	-
20	OPE-14*	TGCGGCTGAG	11	500 - 3000	8
21	OPE-16	GGTGACTGTG	4	1000 - 2000	3
22	OPE-17	CTACTGCCGT	8	500 - 3000	6
23	OPE-19	ACGGCGTATG	6	500 - 3000	5
24	OPF-11	TTGGTACCCC	0	-	-
25	OPF-14	TGCTGCAGGT	0	-	-
26	OPF-15	CCAGTACTCC	0	-	-
27	OPF-18	TTCCCGGGTT	0	-	-
28	OPF-19	CCTCTAGACC	0	-	-
29	OPG-11*	TGCCCCGTCGT	8	500 - 3000	6
30	OPG-12	CAGCTCACGA	0	-	-
31	OPG-16	AGCGTCCTCC	0	-	-
32	OPG-18	GGCTCATGTG	0	-	-
33	OPG-20	TCTCCCTCAG	0	-	-
34	OPH-11	CTTCCGCAGT	0	-	-
35	OPH-12*	ACGCGCATGT	6	500 - 3000	5
36	OPH-17	CACTCTCCTC	0	-	-
37	OPH-19	CTGACCAGCC	0	-	-
38	OPI-11*	ACATGCCGTG	11	500 - 3000	8
39	OPI-13*	CTGGGGCTGA	9	500 - 3000	6
40	OPI-15	TCATCCGAGG	0	-	-
41	OPI-16	TCTCCGCCCT	7	500 - 3000	7
42	OPI-18	TGCCCAGCCT	0	-	-
43	OPJ-12	GTCCCGTGTT	0	-	-
44	OPJ-16	CTGCTTAGGG	0	-	-
45	OPJ-17	ACGCCAGTTC	0	-	-

Çizelge 3.3. (Devam)

	Primer Kodu	Primer Dizini (5'-3')	Toplam Bant Sayısı	Bant Uzunluk Aralığı (bp)	Polimorfik Bant Sayısı
46	OPJ-19	GGACACCACT	0	-	-
47	OPK-14	CCCGCTACAC	0	-	-
48	OPK-15	CTCCTGCCAA	9	500 - 3000	4
49	OPK-17*	CCCAGCTGTG	10	500 - 3000	9
50	OPK-18	CCTAGTCGAG	0	-	-
51	OPL-13	ACCGCCTGCT	0	-	-
52	OPL-14	GTGACAGGCT	6	500 - 3000	5
53	OPL-17*	AGCCTGAGCC	13	500 - 3000	9
54	OPL-18	ACCACCCACC	0	-	-
55	OPM-11	GTCCACTGTG	0	-	-
56	OPM-12*	GGGACGTTGG	12	500 - 3000	9
57	OPM-14	AGGGTCGTTT	0	-	-
58	OPM-18	CACCATCCGT	0	-	-
59	OPM-20	AGGTCTTGGG	0	-	-
60	OPN-13*	AGCGTCACTC	10	500 - 3000	8
61	OPN-14*	TCGTGCGGGT	14	500 - 3000	6
62	OPN-15	CAGCGACTGT	12	500 - 3000	8
63	OPN-20*	GGTGCTCCGT	12	500 - 3000	9
64	OPO-12	CAGTGCTGTG	6	500 - 3000	5
65	OPO-15*	TGGCGTCCTT	10	500 - 3000	8
66	OPO-16*	TCGGCGGTTT	9	500 - 3000	8
67	OPO-18	CTCGCTATCC	0	-	-
68	OPP-13	GGAGTGCCTC	0	-	-
69	OPP-16*	CCAAGCTGCC	9	500 - 3000	8
70	OPP-17	TGACCCGCCT	5	500 - 3000	4
71	OPP-18	GGCTTGGCCT	0	-	-
72	OPQ-12	AGTAGGGCAC	0	-	-
73	OPQ-14	GGACGCTTCA	0	-	-
74	OPQ-19	CCCCCTATCA	0	-	-
75	OPQ-20	TCGCCCAGTC	0	-	-
76	OPR-11	GTAGCCGTCT	11	500 - 3000	9
77	OPR-12	ACAGGTGCGT	6	500 - 3000	4
78	OPR-14	CAGGATTCCC	0	-	-
79	OPR-16*	CTCTGCGCGT	5	500 - 3000	4
80	OPR-19	CCTCCTCATC	0	-	-

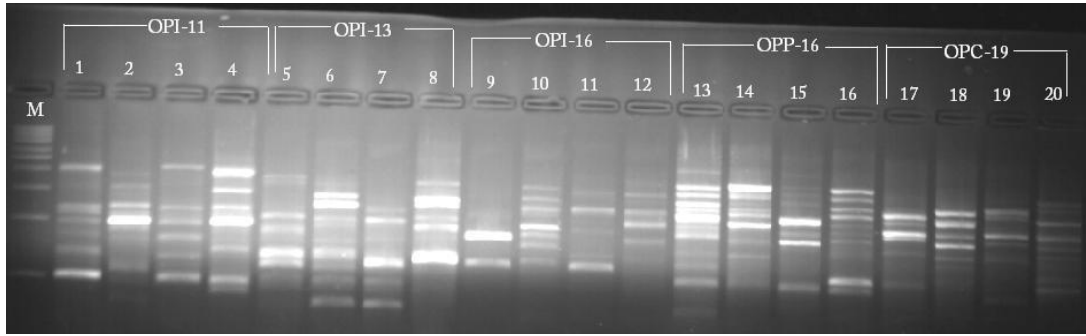
*İkinci toplama dönemi örneklerinin tümüne uygulanmak üzere seçilen, tekrarlanabilirliği yüksek olan primerler.

Çizelge 3.4. Primerler tarafından üretilen toplam bant ve toplam polimorfik bant sayıları.

Toplam Bant Sayısı	Primer Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Primer Sayısı
0	45	0	0
1-5	4	3-5	14
6-10	21	6-9	21
11-14	10		

Polimorfik 35 primer arasından en polimorfik, tekrarlanabilirliği en yüksek ve en net bant üreten 20 primer seçilmiş ve tüm çalışma materyaline uygulanmıştır. Bu primerler Çizelge 3.3.' te (*) ile işaretlenmiştir.

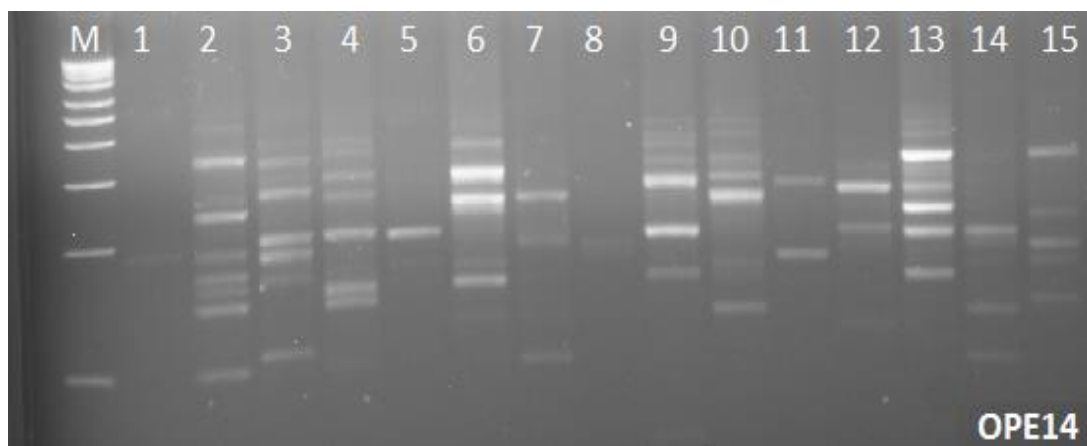
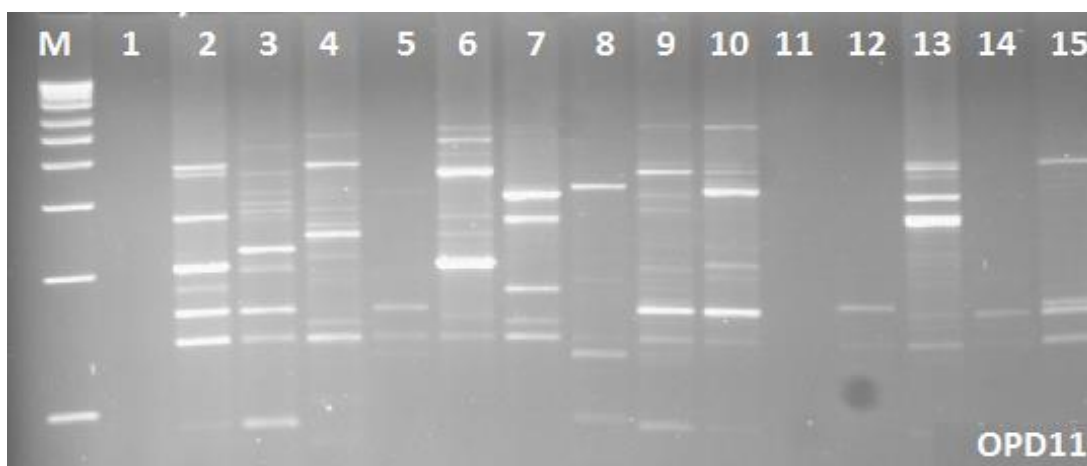
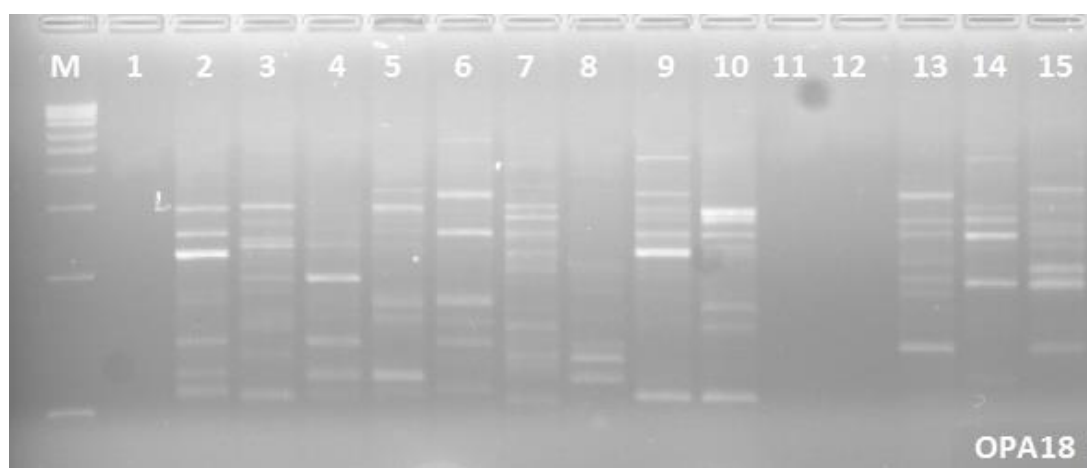
80 primerin 4 bireylik alt popülasyonda taranmasına ilişkin örnek bir jel fotoğrafı Şekil 3.21.'de verilmiştir.

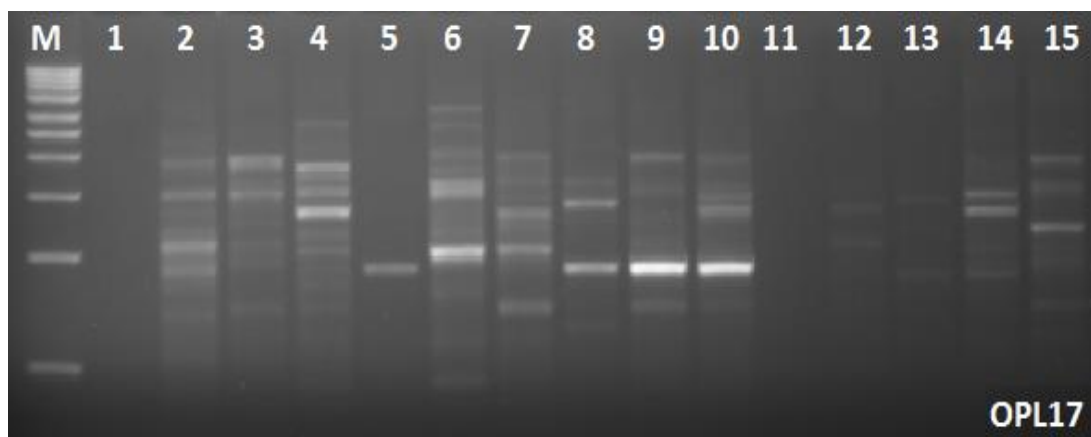
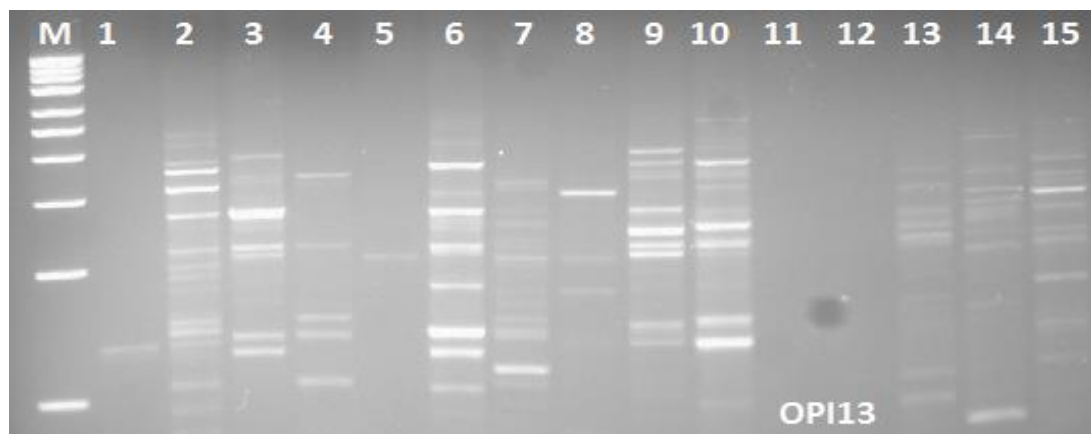
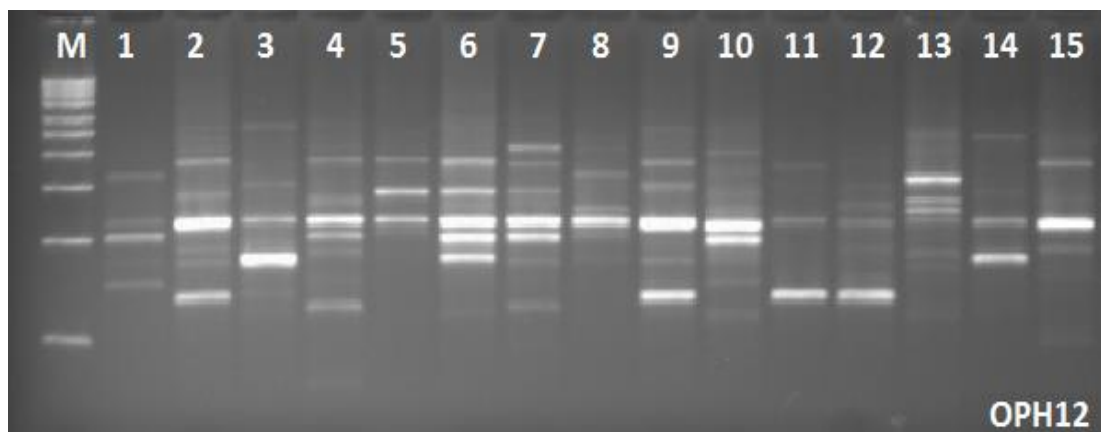


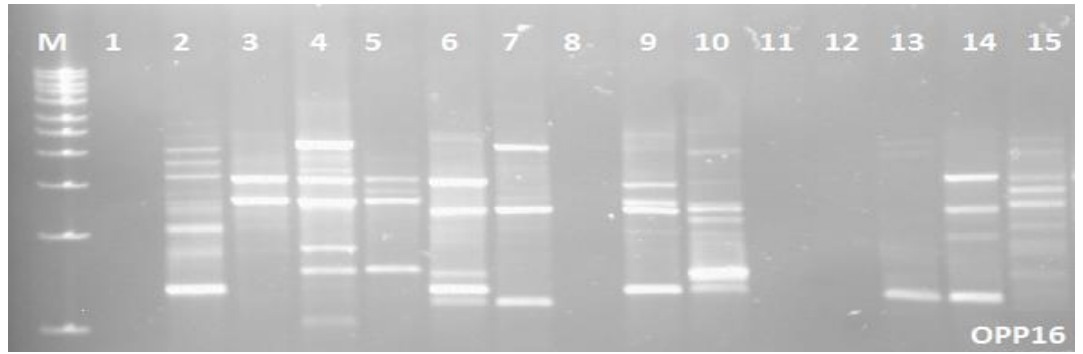
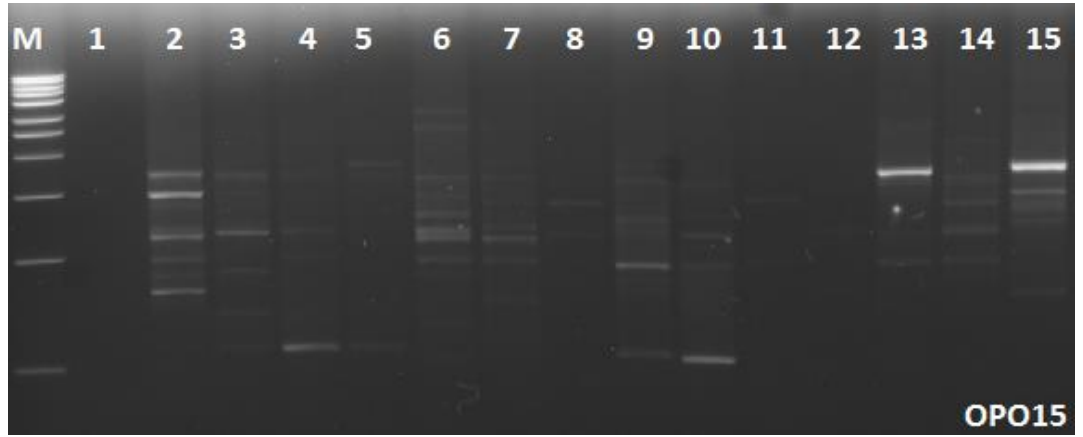
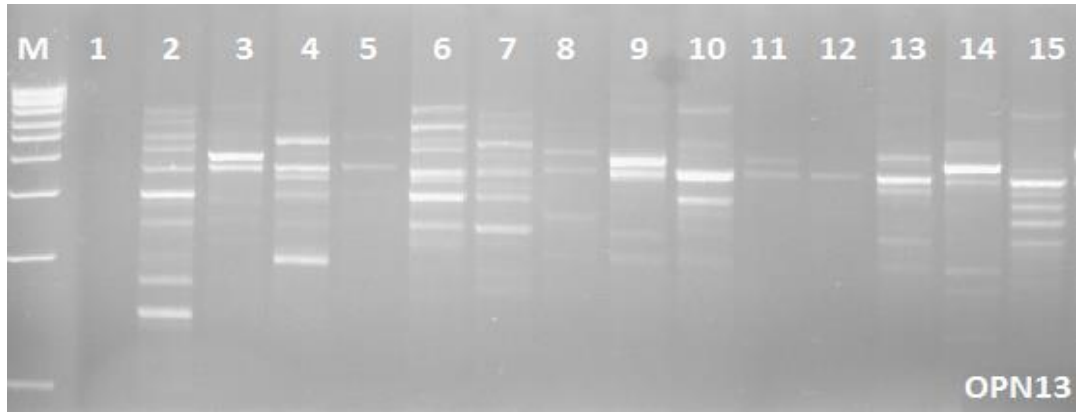
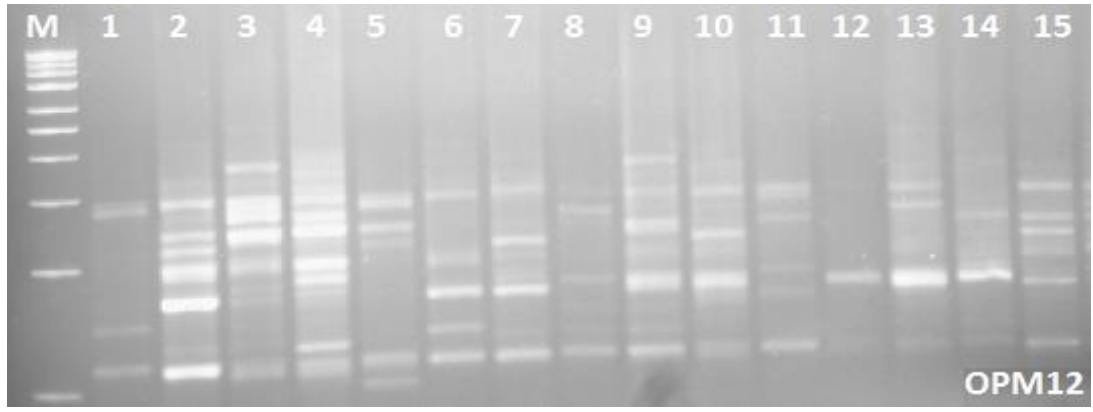
Şekil 3.21. OPI-11, OPI-13, OPI-16, OPP-16 ve OPC-19 primerlerinin 4 bireylik alt popülasyonda taranması sonucu elde edilen jel görüntüsü.

3.2.2. RAPD lokuslarına göre popülasyonların genetik yapıları

Toplam 375 bireye uygulanan 20 primerin analizi sonucu toplam 252 lokus saptanmıştır. Bu lokuslardan sadece biri monomorfik olup, çalışılan *Cx. pipiens* popülasyonlarındaki toplam polimorfik lokus oranı % 99.63'tür. Pop-2 (Aydın-Söke Popülasyonu)'ye ait bireylerin çalışılan primerlerden 10'u ile oluşturdukları RAPD bant desenleri örnek olarak verilmiştir (Şekil 3.22.).







Şekil 3.22. Pop-2 (Aydın-Söke Populasyonu)'ye ait bireylerin çalışılan 10 primer ile sonuçları.

3.2.3. RAPD lokuslarına göre populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitliliğe ilişkin bulgular

3.2.3.1. Polimorfik lokus oranı

0.99 kriterine göre, çalışılan populasyonlarda ortalama polimorfik lokus oranı % 86.03 olarak bulunmuştur. En düşük polimorfik lokus oranına sahip olan populasyon % 77.38 değeri ile Pop-4 olmuştur. Pop-1 ise % 94.84 değeri ile en yüksek polimorfik lokus oranına sahip populasyon olmuştur (Çizelge 3.5.).

3.2.3.2. Allel sayısı

Genetik çeşitliliğin bileşenlerinden birisi olan gözlenen allel sayısı (N_a), bütün populasyonlar için ortalama 1.87 ± 0.33 , etkili allel sayısı (N_e) ise bütün populasyonlar için ortalama 1.47 ± 0.35 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.5.). Bütün lokuslar için ise gözlenen ortalama allel sayısı (N_a) 2.00 ± 0.0 , ortalama etkili allel sayısı (N_e) 1.47 ± 0.34 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.6.). Çalışılan populasyonlarda 1.65 ± 0.48 ile en düşük ' N_a ' değerine sahip populasyon Pop-6 iken, 1.95 ± 0.23 ile en yüksek ' N_a ' değerine sahip populasyon Pop-1 olmuştur (Çizelge 3.4.). Tüm populasyonlarda etkili allel sayıları (N_e) beklendiği gibi gözlenen allel sayılarından (N_a) düşük bulunmuştur. Çünkü, öldürücü alleller etkili allel sayısına dahil edilmediğinden, etkili allel sayısı gözlenen allel sayısından her zaman daha düşük olacaktır.

3.2.3.3. Nei'nin genetik çeşitliliği (Heterozigotluk)

Bu çalışmada Nei'nin genetik çeşitlilik değeri (h) tüm RAPD lokusları için ortalama 0.28 ± 0.16 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.6.). Çalışılan populasyonlar için ise bu değer ortalama 0.27 (Çizelge 3.5.). En fazla genetik çeşitlilik 0.29 değeri ile Pop-1 ve Pop-2'de saptanmıştır. En düşük genetik çeşitlilik ise 0.21 değeri ile Pop-6'da saptanmıştır (Çizelge 3.5.).

3.2.3.4. G-istatistiği

G-istatistiğine göre, 252 RAPD lokusundaki toplam genetik çeşitlilik (H_T) 0.28 ± 0.03 olarak bulunmuştur. Bunun 0.27'sini populasyon içi genetik çeşitlilik (H_S) oluşturmaktadır. Yine 252 lokus bazında, genetik farklılaşma katsayısı (G_{ST}) 0.07 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.7.).

Çizelge 3.5. RAPD lokuslarına göre, çalışılan populasyonlardaki populasyon içi ve populasyonlar arası çeşitliliğe ilişkin genetik parametreler.

Populasyon	N	N_a	N_e	% polymorphic loci	h	I
Muğla	54	1.95 ± 0.23	1.47 ± 0.33	94.84	0.29	0.44 ± 0.22
Aydın	55	1.93 ± 0.27	1.49 ± 0.34	92.46	0.29	0.44 ± 0.23
İzmir	71	1.87 ± 0.34	1.47 ± 0.35	86.90	0.28	0.42 ± 0.25
Balıkesir	57	1.78 ± 0.42	1.47 ± 0.36	77.38	0.27	0.41 ± 0.26
Denizli	57	1.79 ± 0.41	1.45 ± 0.35	78.57	0.27	0.41 ± 0.25
Çanakkale	55	1.65 ± 0.48	1.34 ± 0.34	64.29	0.21	0.32 ± 0.27
Ortalama	58.8	1.87 ± 0.33	1.47 ± 0.35	86.03	0.27	0.43 ± 0.24

N_a : Gözlenen allel sayısı.

N_e : Etkili allel sayısı.

h : Nei (1973)'nin genetik çeşitlilik değeri.

Çizelge 3.6. Tüm RAPD lokuslarına ait ortalama örnek sayısı, gözlenen ortalama allel sayısı (N_a), ortalama etkili allel sayısı (N_e), Nei'nin genetik çeşitliliği (h).

Ortalama Örnek Sayısı	N_a	N_e	h
349	2.0 ± 0.0	1.47 ± 0.34	0.28 ± 0.16

3.2.3.5. Gen akış düzeyi (Nm)

Bu çalışmada örneklenen populasyonlar için hesaplanan gen akış düzeyi değeri (Nm) 6.61'dir (Çizelge 3.7.).

Çizelge 3.7. RAPD belirteçleriyle hesaplanan gen çeşitliliği, genetik farklılaşma ve gen akış değerleri.

H_T	H_S	G_{ST}	N_m
0.28 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.07	6.61

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre; populasyonlar arası gen akış düzeyinin ($N_m=6.61$) literatüre uygun olarak bulunduğu görülmektedir. Buna paralel olarak da populasyonlar arası genetik farklılaşma ($G_{ST}=0.07$) oldukça düşük bulunmuştur. Bu değerler Lehmann ve ark. (1996)'nın izoenzim ve mikrosatellit belirteçlerini kullanarak *Anopheles gambiae*'nin Kenya ve Senegal populasyonlarında (populasyonlar arası uzaklık 6000 km'den fazla) elde ettikleri değerlere ($F_{ST}=0.016$, $N_m=7.7$), Besansky ve ark. (1997)'nin mitokondrial ND5 geninin 665 bç'lik segmentinin analizi ile Kenya'nın yedi köyüne ve Senegal'in üç köyüne ait *A. gambiae* populasyonlarında elde ettikleri değerlere ($F_{ST}=0.085$, $N_m=5.4$), yine Besansky ve ark. (1997)'nin birbirinden 7000 km uzaklıktaki *A. arabiensis* populasyonları için elde ettikleri değerlere ($F_{ST}=0.044$, $N_m=10.8$) ve Humeres ve ark. (1998)'in Arjantin'deki *Culex pipiens* ve *C. quinquefasciatus* populasyonlarında izoenzim lokuslarında elde ettikleri değerlere ($F_{ST}=0.088$, $N_m=61.12$) bakıldığında çok önemli farklılıklar olmadığı görülmektedir.

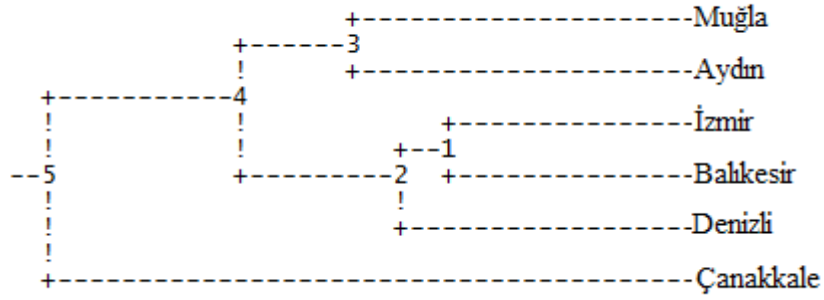
3.2.3.6. Populasyonlar arasındaki genetik uzaklık (D_N)

Çalışılan populasyon çiftleri için Nei (1978)'in Standart Genetik Uzaklık (D_N) değerleri hesaplanarak populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın düzeyi saptanmıştır. 252 lokusa dayanılarak elde edilen D_N değerleri Çizelge 3.7.'de verilmiştir. En düşük genetik uzaklık, $D_N=0.0185$ değeri ile, Pop-3 ve Pop-4 arasında bulunurken, en yüksek genetik uzaklık ise, $D_N=0.9815$ değeri ile, Pop-4 ve Pop-5 arasında saptanmıştır (Çizelge 3.8.).

Populasyonlar arası genetik uzaklıkların görsel ifadesi, D_N değerleri ve UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average) kullanılarak oluşturulan dendrogramda verilmiştir (Şekil 3.24.). Dendrogramdaki gruplaşmaların genel olarak populasyonların coğrafik yakınlıkları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.8. RAPD lokuslarına göre çalışılan populasyonlar arasındaki genetik uzaklık (D_N) değerleri (Nei 1978).

Populasyon	Muğla (Pop-1)	Aydın (Pop-2)	İzmir (Pop-3)	Balıkesir (Pop-4)	Denizli (Pop-5)	Çanakkale (Pop-6)
Muğla (Pop-1)						
Aydın (Pop-2)	0.0236					
İzmir (Pop-3)	0.0294	0.0185				
Balıkesir (Pop-4)	0.0417	0.0307	0.0185			
Denizli (Pop-5)	0.0412	0.0275	0.0222	0.0187		
Çanakkale (Pop-6)	0.0560	0.0474	0.0407	0.0393	0.0375	



Şekil 3.23. RAPD lokuslarına göre çalışılan populasyonlar arasında saptanmış olan genetik uzaklık (D_N) değerleri ile UPGMA kullanılarak oluşturulan dendrogram.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada gerçekleştirilen PCR'a dayalı moleküler analizler, *ace-1* genindeki her iki direnç mutasyonunun (Gly119Ser ve Phe290Val) da frekanslarının düşük olduğunu ve belirgin dönemsel farklılıklar göstermediklerini ortaya koymuştur. Buna karşılık, bu tez çalışması kapsamı dışında gerçekleştirilen çalışmalarda ise, iki *kdr* direnç mutasyonu için yüksek frekanslar ve çarpıcı dönemsel farklılıklar saptanmıştır.

Çalışılan *Culex pipiens* kompleksi populasyonları arasında yüksek bir gen akışının olduğu ($Nm=6.61$) saptanmıştır.

Çeşitli direnç mekanizmalarının varlığını ve yüksek göç oranlarını düşündüğümüzde, değişik insektisit gruplarının rotasyonu esasına dayanan klasik insektisitle mücadele stratejilerinin bu populasyonlara uygulanmasındaki zorluk açıktır. Direnç problemine kısa dönemde mucizevi bir çözüm üretecek bir yaklaşımın olmadığı bilinci ile, böcek büyüme düzenleyicilerinin (insect growth regulators), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*'den izole edilen *Bti* toksinlerinin ve uyumsuz böcek tekniklerinin (incompatible insect techniques) kullanılması gibi etkili alternatif uygulamalara geçilmesi, çalışılan bölgedeki *C. pipiens* kompleksi populasyonlarının etkili ve özellikli kontrollerinde son derece yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Akner M. M., Simsek F. M., Caglar S. S., (2009). Insecticide Resistance of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Turkey, J. Pestic. Sci., 34(4), 259–264.
- Alout, H., Berthomieu A., Hadjivassilis A., Weill M., (2007). A New Amino-Acid Substitution in Acetylcholinesterase 1 Confers Insecticide Resistance to *Culex pipiens* Mosquitoes From Cyprus, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 37, 41–47.
- Alout, H., Weill M., (2008). Amino-acid Substitutions in Acetylcholinesterase 1 Involved in Insecticide Resistance in Mosquitoes, Chemico-Biological Interactions, 175: 138–141.
- Alten, S.B., Çağlar, S.S., (1998). *Vektör Ekolojisi ve Mücadelesi: Sıtma Vektörünün Biyo-Ekolojisi Mücadele Organizasyonu ve Yöntemleri*. T.C. Sağlık Bakanlığı Sıtma Savaş Daire Başkanlığı ve Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü, Bizim Büro Basımevi, Ankara, Pp: 242.
- Alter, K., Pirker, H. (1997). "On the specification of sentence initial F0-patterns in German", In INT-1997, 25-28.
- Angın, İ., Yağanoğlu, A.V. (2011). Effects of sewage sludge application on some physical and chemical properties of a soil affected by wind erosion. J. Agr. Sci. Tech., 13, 757-768.
- Awise, J.C. (1994) Molecular Markers, atural History and Evolution, Chapman and Hall, New York, NY. 511 pp.
- Becker, N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Dahl C., Lane J., Kaiser A., Mosquitoes and Their Control, Kluwer Academic, Plenum Publishers, USA, (2003) Pp: 49.
- Bender, W., P Spierer., Hogness D. S., (1983). Chromosomal Walking and Jumping to Isolate DNA From The *Ace* and *Rosy* Loci and Bithorax Complex in *D. melanogaster*, J. Mol. Biol., 168: 17-33.

- Berticat C, Boquien G, Raymond M, Chevillon C (2002). Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res* 79: 41-47. PubMed: 11974602.
- Berticat C, Bonnet J, Duchon S, Agnew P, Weill M, Corbel V., (2008). Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC Evolutionary Biology*, **8**:104.
- Besansky, N.J., Lehmann, T., Fahey, G.T., (1997). Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow, *Genetics*, 147 (4), 1817-1828.
- Bourguet D, Guillemaud T, Chevillon C, Raymond M (2004). Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution* 58: 128-135. doi:10.1554/03-423. PubMed:15058725.
- Bretting, P.K., Widrlechner, M.P., (1995). Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breed Rev* 31:11–86.
- Brownie, J., Shawcross S., Theaker J., Whitcombe D., Ferrie R., Newton C., Little S., (1997). The Elimination of Primer-Dimer Accumulation in PCR, *Nucleic Acids Res* 25: 3235–3241.
- Chen N, Ren J, Raymond LA, Murphy TH., (2001). Changes in agonist concentration dependence that are a function of duration of exposure suggest N-methyl-D-aspartate receptor nonsaturation during synaptic stimulation. *Mol Pharmacol* 59:212-9.
- Chen, L., Zhong D., Zhang D., Shi L., Zhou G., Gong M., Zhou H., Sun Y., Ma L., He J., Hong S., Zhou D., Xiong C., Chen C., Zou P., Zhu C., Yan G., (2010). Molecular Ecology of Pyrethroid Knockdown Resistance in *Culex pipiens pallens* Mosquitoes, Source: PLOS ONE 5 (7) Article Number: e11681.
- Chen, Z., Newcomb R., Forbes E., McKenzie J., Batterham P., (2001). The Acetylcholinesterase Gene and Organophosphorus Resistance in The Australian Sheep Blowfly, *Lucilia cuprina*, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 805–816.

- Chevillon C, Addis G, Raymond M, Marchi A., (1995). Population structure in Mediterranean islands and risk of genetic invasion in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 55: 329–343.
- Cui F, Raymond M, Berthomieu A, Alout H, Weill M, Qiao CL., (2006). Recent emergence of insensitive Acetylcholinesterase in Chinese populations of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 43, 878–883.
- Çağlar, S. S., Skavdis G., Özer N., Alten B., Şimşek F. M., Kaynaş S., Akiner M. M., Kuyucu A. C., Vontas J., (2008). Study of The Resistance in Commonly Used Insecticides, of Natural Mosquito Populations, In The Province of Thrace (Greece and Turkey) TÜBİTAK TBAG Proje 105T531, 1-128.
- Djogbenoua, L., Akogbéto M., Chandre F., (2008). Presence of Insensitive Acetylcholinesterase in Wild Populations of *Culex pipiens quinquefasciatus* From Benin L. *Acta Tropica*, 107, 272–274.
- Fournier, D., Bride J. M., Hoffman F., Karch F., (1992). Acetylcholinesterase: Two Types of Modifications Confer Resistance to Insecticides. *J. Biol. Chem.*, 267: 14270–14274.
- Gazave, E., Chevillon, C., Lenormand, T., Marquine, M., Raymond, M., (2001). Dissecting the cost of insecticide resistance genes during the overwintering period of the mosquito *Culex pipiens*. *Heredity* 87, 441-448.
- Georghiou, G.P., (1986), The Magnitude of Resistance Problem, Pesticide Resistance Strategies and Tactics for Management. National Research Council (U.S.). National Academy Press Washington, D.C. 14-43 p.
- Gressel, J., (1986). Genetics, biochemical, and physiological mechanisms and Tactics for Management. National Research Council(U.S). National Academy Press Washington, D.C. 45-54 p.
- Hemingway, J., Ranson H., (2000). Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease, *Annu. Rev. Entomol.*, 45, 371–391.

- Hemingway, J., Hawkes N. J., McCarroll L., Ranson H., (2004). The Molecular Basis of Insecticide Resistance In Mosquitoes, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 653–665.
- Highton, R. B., von Someren E. C., (1970). The Transportation of Mosquitoes Between International Airports, *Bulletin of The World Health Organisation* 42: 127–135.
- Hsu, J. C, Haymer D.S., Wu W.J., Feng T.H., (2006). Mutations in The Acetylcholinesterase Gene of *Bactrocera dorsalis* Associated With Resistance to Organophosphorus Insecticides, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 396-402,
- Huang, S., Molaei G., Andreadis T. G., (2008). Genetic Insights Into the Population Structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in The Northeastern United States by Using Microsatellite Analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79(4), pp. 518–527.
- Humeres, S., G., Almiron, W.,R., Sabattini, M., S., Gardenal, C., (1998). Estimation on Genetic Divergence and Gene Flow Between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 93(1):57-62.
- İmamzade, Z., (2008). KKTC'DE Görülen Sivrisineklerin Erişkinlerine Karşı Kullanılan Sentetik Piretroidlerin Sahada, Biyolojik Larvasitlerin (BTİ-*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) *Culex pipiens* Larvalarına Karşı Laboratuvarda Etkinliklerinin İncelenmesi, (Doktora Tezi), İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Kakani, E. G., Ioannides I. M., Margaritopoulos J. T., Seraphides N. A., Skouras J. A., Mathiopoulus K.D., (2008). A Small Deletion in The Olive Fly Acetylcholinesterase Gene Associated With High Levels of Organophosphate Resistance, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 781-787.
- Kence, M., (1988). Ecological genetics of malathion resistance in housefly, *Musca domestica* L. PhD. Thesis. 108 pp.

- Kidwell, M.G., J.F. Kidwell and M. Nei. (1973). A case of high rate of spontaneous mutation affecting viability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 75:133-153.
- Kimura M., Crow JF., (1978). Effect of overall phenotypic selection on genetic change at individual loci. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec;75(12):6168–6171.
- Kioulos I., Kampouraki A., Morou E., Skavdis C., Vontas J., (2014). Insecticide resistance status in the major West Nile virus vector *Culex pipiens* from Greece. *Pest Manag Sci*; **70**: 623–627.
- Knobler, S., (2003). Resistance in Microbes and Infectious Disease Vectors: Implications for Human Health and Strategies for Containment: Workshop Summary. National Academies Press 333 p.
- Kozaki, T., Shono T., Tomita T., Kono Y., (2001a). Fenitroxon Insensitive Acetylcholinesterases of the House Fly, *Musca domestica* Associated With Point Mutations, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 991-997.
- Kozaki, T., Shono T., Tomita T., Kono Y., (2001b). Polymorphism in The Acetylcholinesterase Gene of The Housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), *Appl. Entomol. Zool.*, 36: 377–380.
- Kurt, H., Ekici, G., (2013). *International Online Journal of Educational Sciences.* Vol. 5 Issue 3, p736-756. 21p.
- Kuyucu, N. (2007). Antibiyotik Direnci. *Cocuk Enf Derg* 2007; 1: Özel Sayı 1; 33-8.
- Labbe, P., Berthomieu, A., Berticat, C., Alout, H., Raymond, M., Lenormand, T., Weill, M., (2007). Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1056-1067.
- Lehmann, T., Havley, W.A., Kamau, L., (1996). Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: Comparison of microsatellite and allozyme loci, *Heredity*, 77 Part 2, 192-200.

- Lenormand T, Guillemaud T, Bourguet D, Raymond M. (1998). Appearance and sweep of a gene duplication: adaptive response and potential for a new function in the mosquito. *Culex pipiens*. *Evolution* 52, 1705–1712.
- Marshall, J.F., (1938). *The British Mosquitoes*, The British Museum, London, 341p.
- Matsumura, F., (1985). *Toxicology of Insecticides*. Plenum Press 598 pp.
- Menziozzi, P., Shi M. A., Lougarre A., Tang Z. H., Fournier D., (2004). Mutations of Acetylcholinesterase Which Confer Insecticide Resistance in *Drosophila melanogaster* Populations, *BMC Evol. Biol.*, 4: 4.
- Merdivenci, A., (1984). *Türkiye Sivrisinekleri*, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, Rektörlük no:3215 Dekanlık no:136 Pp: 354.
- Mutero, A., Pralavorio M., Bride J., M., Fournier D., (1994). Resistance-Associated Point Mutation in Insecticide Insensitive Acetylcholinesterase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 5922–5926.
- Mutero, A., Bride, J.M., Pralavorio, M., Fournier, D. (1994). *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase: Identification and expression of two mutations responsible for cold- and heat-sensitive phenotypes. *Mol. Gen. Genet.* 243(6): 699--705.
- Nabeshima, T., Kozaki T., (2003). An Amino Acid Substitution on The Second Acetylcholinesterase in The Pirimicarb-Resistant Strains of The Pearch Potao Aphid, *Myzus persicae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307: 15–22.
- Nabeshima, T., Mori A., Kozaki T., Iwata Y., Hidoh O., Harada S., Kasai S., Severson D.W, Kono Y., Tomita T., (2004). An Amino Acid Substitution Attributable to Insecticide-Insensitivity of Acetylcholinesterase in a Japanese Encephalitis Vector. Mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313: 794–801.
- Nauen, R., (2007). Insecticide Resistance in Disease Vectors of Public Health Importance, *Pest Manage. Sci.*, 63, 628-633.

- Nei, M., (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3321-3323.
- Nei, M., T. Maruyama and R. Chakraborty (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29:1-10.
- Nei, M., (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Oakeshott, J.G, Claudianos C., Campbell P. M., Newcomb R. D., Russell R. J., (2005). Biochemical Genetics and Genomics of Insect Esterases, In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS. (eds), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 5 - Pharmacology. Elsevier BV, Oxford, UK, pp 309-381.
- Osta, M.A., Rizk Z.J, Labbe P., Weill M and Knio K., (2008). Insecticide resistance to organophosphates in *Culex pipiens* complex from Lebanon. *Parasite Vector* 5:132.
- Özer, N., 2001. Vektör Ekolojisi ve Mücadelesi Teknikleri Ders Notları.
- Pedigo, L. P, (1996). *Entomology and pest management*. Prentice Hall, Upper Sanddle River, 679p.
- Perera, M. D. B., Hemingway J., Karunaratne S. P., (2008). Multiple Insecticide Resistance Mechanisms Involving Metabolic Changes and Insensitive Target Sites Selected in Anopheline Vectors of Malaria in Sri Lanka, *Malaria Journal*, 7:168.
- Ramsdale, C. D., Snow K.R., (1995). *Mosquito Control in Britain*, University of East London, The KPC group, Pp: 100
- Ramsdale, C. D., Alten, B., Çağlar, S. S. ve Özer, N. (2001). A revised, annotated checklist of the mosquitoes (Diptera, Culicidae) of Turkey. *European Mosquito Bulletin*, 9: 18-28.
- Raviele A., Giada F., Menozzi C., Specia G., Orazi S., Gasparini G., Sutton R., Brignole M., (2004). Vasovagal Syncope and Pacing Trial Investigators. A

randomized, double-blind, placebo-controlled study of permanent cardiac pacing for the treatment of recurrent tilt-induced vasovagal syncope. The vasovagal syncope and pacing trial (SYNPACE) *European Heart Journal*. 25(19):1741–8.

Russell, R. J., Claudianos C., Campbell P. M., Horne I., Sutherland T. D., Oakeshott J. G., (2004). Two Major Classes of Target Site Insensitivity Mutations Confer Resistance to Organophosphate and Carbamate Insecticides, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 79: 84-93.

Saitou N & Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Smith, J. L., Fonseca D. M., (2004). RAPD Assays For Identification of Members of The *Culex* (*Culex*) pipiens Complex, Their Hybrids, and Other Sibling Species (Diptera: Culicidae), *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 70(4), pp. 339–345.

Soller M, Beckmann JS (1983). Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theor Appl Genet* 67: 25-33.

Şimşek F.M., Alten B., Çağlar S.S., Özbel Y., Aytekin A.M., Kaynas S., Belen, A., Erisöz Kasap Ö., Yaman M., Rastgeldi S., (1997). Distribution and altitudinal structuring of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southern Anatolia, Turkey: their relation to human cutaneous leishmaniasis. *Journal of Vector Ecology*, 32 (2): 269-279.

Şimşek, F. M. (1997). Şanlıurfa İli Sınırları İçerisinde Bulunan Sivrisinek Türleri (Diptera: Culicidae) ve Sıtma Vektörlerinin Biyo-Ekolojisi Üzerine Araştırmalar. Doktora tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Tamura, K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Molecular Biology and Evolution*, 28,2731-39.

Tanksley, S.D. and Orton, T.J., (1983). Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p; 147-163.

- Tantalev M.L., Tortosa P., Alout H., Berticat C., Berthomieu A., Rutee A., Dehecq J.S., Makoundou P., Labbé P., Pasteur N., Weill M., (2010). Insecticide Resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* Mosquitoes From La Réunion Island. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 317-324.
- Toda, S., Komazaki S., Tomita R., Kono Y., (2004). Two Amino Acid Substitutions in Acetylcholinesterase Associated With Pirimicarb and Organophosphorous Insecticide Resistance in The Cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae), *Insect Mol. Biol.*, 13: 549–553.
- Velioğlu, E., Çengel, B., İçgen, Y., Kandemir, G., Alan, M., Kaya, Z., (2002). Moleküler Belirteçler Yardımıyla Karaçam (*Pinus nigra* Arnold subspecies pallasiana (Lamb.) Holmboe) Tohum Meşcerelerinde, Tohum Bahçelerinde ve Ağaçlandırmalarında Bulunan Genetik Çeşitliliğin Karşılaştırılması, Orman Bakanlığı Yayın No: 190, Teknik Bülten No: 11.
- Velioğlu, E., Kandemir, G., Tayanç, Y., Çengel, B., Alan M., Kaya, Z., (2008). Türkiye’deki Sığla (*Liquidambar orientalis* Miller) Populasyonlarının Genetik Yapısının Moleküler Belirteçlerle Belirlenmesi ve Koruma Stratejileri Geliştirilmesi, Orman Bakanlığı Yayın No: 339, Teknik Bülten No: 20.
- Vontas, J.G., Hejazi M. J., Hawkes N.J., Cosmidis N., Loukas M., Hemingway J., (2002). Resistance Associated Point Mutations of Organophosphate Insensitive Acetylcholinesterase In The Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae*, *Insect Mol. Biol.*, 1: 329-336.
- Yeh, F.C., Boyle T., Rongcai Y., Ye Z., Xiyan J.M., (1999). POPGENE VERSION 1.32 Microsoft Window-Based Freeware For Population Genetic Analysis.
- Walsh, S. B., Dolden T. A., Moores G. D., Kristensen M., Lewis T., Devonshire A. L., Williamson M. S., (2001). Identification and Characterization of Mutations in Housefly (*Musca domestica*) Acetylcholinesterase Involved in Insecticide Resistance, *Biochem. J.* 359: 175–181.
- Weill, M., Fort P., Berthomieu A., Dubois M.P., Pasteur N., Raymond M., Novel, A., (2002). Acetylcholinesterase Gene in Mosquitoes Codes for The Insecticide Target and is Non-Homologous to The *ace* Gene in *Drosophila*, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 269: 2007–2016.

- Weill, M, Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A, Berticat C., Pasteur N., Philips A., Fort P., Raymond M., (2003). Insecticide Rresistance in Mosquito Vectors. *Nature*, 423: 136-137.
- Weill, M, Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomien A., Marquine M., Raymond M., (2004). The Unique Mutation in *ace-1* Giving High Insecticide Resistance Is Easily Detected in Mosquito Vectors., *Insect Mol. Biol.*, 13: 1–7.
- Weill, M., Labbe P., Duron O., Pasteur N., Fort M., Raymond M., (2005). Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: towards an understanding of the evolution of *ace* genes. In *Insect evolutionary ecology*. Edited by Fellowes MDE, Holloway GJ, Rolff J. Wallingford: CABI Publishing; 397–408.
- WHO, (1998). Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-Efficacy and Persistance of Insecticide on Treated Surfaces: Report of The WHO Informal Consultation, World Health Organization, Geneva, 45p.
- Wright, S (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323–354.
- Wright, S (1969). The interpretation of population structure by Fstatistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 19, 395–420.
- Wright, S (1978). *Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations*. The University of Chicago Press, Chicago.

ÖZGEÇMİŞ

06. 09. 1989 tarihinde Mersin’de doğdu. İlköğretim, ortaokul ve lise eğitimini yine Mersin’ de tamamladı. 2008 yılında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazandı. 2012 yılında lisans öğrenimini tamamladıktan sonra aynı yıl yine Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek lisans eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizcedir.