T.C.
MUĞLA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

EGE VE AKDENİZ BÖLGELERİNDEN TOPLANAN KARASİNEK (*Musca domestica* L.) POPULASYONLARINDA *MdαE7* GENİNİN KISMİ BAZ DİZİ ANALİZİNİN YAPILMASI VE ÖRNEKLERDE KARBOKSİLESTERAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FERDA GAÇAR

AĞUSTOS 2008
MUĞLA

T.C.
MUĞLA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

EGE VE AKDENİZ BÖLGELERİNDEN TOPLANAN KARASİNEK (*Musca domestica* L.) POPULASYONLARINDA *MdαE7* GENİNİN KISMİ BAZ DİZİ ANALİZİNİN YAPILMASI VE ÖRNEKLERDE KARBOKSİLESTERAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ferda GAÇAR

MUĞLA 2008

T.C.

MUGLA ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

Yrd. Doç. Dr. Vatan TAŞKIN danışmanlığında Ferda GAÇAR tarafından hazırlanan Ege ve Akdeniz bölgelerinden toplanan karasinek (*Musca domestica* L.) populasyonlarında *MdaE7* geninin kısmi baz dizi analizinin yapılması ve örneklerde karboksilesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi başlıklı tez, 20/08/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Doç. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL	İmza	:
Üye	:Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL	İmza	:
Üye	:Yrd. Doç. Dr. Vatan TAŞKIN	İmza	:

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde büyük emeği bulunan hocam Yrd. Doç. Dr. Vatan Taşkın'a, eleştirileri ve önerilerinden ötürü değerli jüri üyelerim Doç. Dr. Kemal Büyükgüzel ve Yrd. Doç. Dr. Bekir Çöl'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bana her konuda yardımcı olan ve her zaman yanımda olan çok sevdiğim arkadaşlarım Arş. Gör. Yonca Surgun ve Rukiye Boran'a ayrıca birlikte çalışmaktan zevk aldığım arkadaşlarım, Arş. Gör. Ersin Doğaç ve Eaylettin Öztürk'e yürekten teşekkür ederim.

Tüm öğrenim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini hiçbir zaman eksik etmeyen aileme ve arkadaşım Erman Bakır'a hep yanımda oldukları ve bana güvendikleri için sonsuz teşekkürler…

Ferda GAÇAR
MUĞLA 2008

İÇİNDEKİLER **Sayfa No**

ÖNSÖZ....II
İÇİNDEKİLER....III
ÖZET....V
ABSTRACT....VII
ŞEKİLLER DİZİNİ....IX
ÇİZELGELER DİZİNİ....X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ....XI
1. GİRİŞ....1
2. KAYNAK ÖZETLERİ....4
2.1. Pestisitler....4
2.1.1. İnsektisit ve insektisit grupları....4
2.1.1.1. Organoklorinler....4
2.1.1.2. Karbamatlar....5
2.1.1.3. Pretroitler....5
2.1.1.4. Organofosfatlar....6
2.1.1.4.1. Malatyon....7
2.1.1.4.2. Diyazinon....7
2.1.2. Türkiyede insektisit kullanımı....8
2.2. Böceklerde Direnç Tipleri....9
2.2.1. Davranışsal direnç....9
2.2.2. Fizyolojik veya biyokimyasal temelli direnç....9
2.2.2.1.Vücut yüzeyi tarafından insektisit alımının azaltılması....10
2.2.2.2. Metabolik detoksifikasyonunun arttırılması....10
2.2.2.3. Hedef enzimdeki değişim....10
2.3. Metabolik Dirençte Rol Oynayan Enzimler....10
2.3.1. Glutatyon-S-Transferazlar (GST)....10
2.3.2. Asetilkolinesteraz enzimi....11
2.3.3. Monooksijenazlar....12
2.3.4. Esterazlar....12
2.3.4.1. Gen amplifikasyonu vasıtası ile direnç kazanılması....13

2.3.4.2. Diyazinona karşı direnç.....13
2.3.4.3. Malatyona karşı direnç.....14
2.4. MdαE7 Karboksilesteraz Enzimi.....15
2.5. Mutant Ali-Esteraz Hipotezi.....16
2.6. Çapraz Direnç.....16
2.7. Model Organizma Olarak Karasinek, *Musca* domestica L.....17
2.8. Çalışmanın Amacı.....17
3.MATERYAL METOT.....18
3.1. Karasinek Örneklerinin Toplanması.....18
3.2. DNA İzolasyonu.....19
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....19
3.4. PCR Ürünlerinin Görüntülemesi ve Jelden İzolasyonu.....20
3.5. Baz Dizi Analizi Tespiti.....21
3.6. Karboksilesteraz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....21
3.7. Örneklerdeki Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi.....21
3.8. Bilgisayar Programları.....21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....22
4.1. İncelenen Örneklerdeki *MdαE7*.....22
4.2. Karboksilesteraz Enzim Aktivitesi Sonuçları.....30
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....38
KAYNAKLAR.....45
ÖZGEÇMİŞ.....53

EGE VE AKDENİZ BÖLGELERİNDEN TOPLANAN KARASİNEK (*Musca domestica* L.) POPULASYONLARINDA *MdaE7* GENİNİN KISMİ BAZ DİZİ ANALİZİNİN YAPILMASI VE ÖRNEKLERDE KARBOKSİLESTERAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ferda GAÇAR

MUĞLA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

2008

ÖZET

Karasinek (*Musca domestica* L.)'te organofosfat grubu insektisitlere karşı direnç, diğer biyokimyasal mekanizmalarla birlikte karboksilesteraz enzim aktivitesiyle de bağlantılıdır. Esteraz gen ailesinin bir üyesi olan *αE7*'nin ürünü enzim ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Diyazinona karşı dirençli *M. domestica* soylarında bu genin baz dizi analizi yapılmış ve duyarlı soylar ile karşılaştırıldığında $Gly^{137} \rightarrow Asp$ değişimi enzimin aktif merkezinde bulunmuştur. Malatyona dirençli soylarda ise $Trp^{251} \rightarrow Ser$ değişimi yine enzimin aktif merkezinde tespit edilmiştir. Bu çalışmada, ülkemizde tarımın yoğun olarak yapıldığı Ege ve Akdeniz bölgelerinde 16 farklı ilden toplanan karasinek örneklerinde genom DNA'sı izole edilmiş ve *MdαE7* geni PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılmış ve ekson 3 bölgesinin başından ekson 4'ün ortasına kadar olan bölgenin baz dizi analizi yapılmıştır. Bununla birlikte, metiltiyobütirat substratı kullanılarak bu örneklerdeki karboksilesteraz enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Deneylerimizde WHO duyarlı soyu standart kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her bölgeden 32 adet olmak üzere toplam 64 birey kullanılarak deneylerimiz gerçekleştirilmiştir. Buna göre, Ege Bölgesi'nde 15 örnekte, malatyon direnç tip alleli olan Gly^{137}- Ser^{251}, 7 örnekte diyazinon direnç tip alleli olan Asp^{137} - Trp^{251}, 6 örnekte Gly^{137} - Ser^{251} / Trp, 2 örnekte Asp^{137} - Ser^{251} / Trp alleleri, 1 örnekte duyarlı allel tipi olan Gly^{137} - Trp^{251}, 1 örnekte ise Gly^{137} - Ser^{251} / Leu alleli gözlemlenmiştir.

Akdeniz Bölgesi'nde ise çalışılan 19 örnekte diyazinon direnç tip alleli Asp^{137} - Trp^{251}, 5 örnekte malatyon direnç tip alleli Gly^{137} - Ser^{251}, 4 örnekte duyarlı tip alleli

Gly^{137} - Trp^{251}, 2 örnekte Asp^{137} - Ser^{251} / Trp alleleri, 1 örnekte Gly^{137} - Leu^{251}, 1 örnekte ise Gly^{137} - Ser^{251} / Trp allelleri bulunmuştur. Karboksilesteraz enzim aktivitesi için yapılan ölçümlerde WHO referans soyu için aktivite değeri 142,7 ± 4,3 nmol/dk/mg olarak tesbit edilmiştir. Buna karşın, malatyon ve diyazinon direnç tipi allellerine sahip örneklerde ise aktivite değerleri 31,4 ± 3,5 nmol/dk/mg ile 136,8 ± 36,8 nmol/dk/mg arasında değişmiştir. Sonuçlarımız direnç allellerinin frekans ve dağılımının bölgelere göre değiştiğini göstermiştir. Bu durum ülkemizde insektisit kullanım stratejilerinin yeniden gözden geçirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Musca domestica*, insektisit direnci, *MdαE7,* malatyon, diyazinon, karboksilesteraz, allelik dağılım

Sayfa adedi **:** 53

Tez yöneticisi **:** Yrd. Doç. Dr. Vatan TAŞKIN

PARTIAL BASE SEQUENCE ANALYSIS OF *MdαE7* GENES and THE DETERMINATION OF CARBOXYLESTERASE ENZYME ACTIVITIES IN HOUSE FLY (*Musca domestica* L.) POPULATIONS COLLECTED FROM MEDITERRANEAN and AEGEAN REGIONS OF TURKEY

(M. Sc. Thesis)

Ferda GAÇAR

MUĞLA UNIVERSITY
INSTITUTE of SCIENCE and TECHNOLOGY

2008

ABSTRACT

In housefly (*Musca domestica* L.), in addition to other biochemical mechanisms, organophosphate insecticide resistance is associated with a change in carboxylesterase activity. The product of *αE7* gene, a member of the esterase cluster, probably plays a role in the detoxification of xenobiotic esters. In the diazinon resistant housefly strains, comparing with susceptible ones, Gly^{137} to Asp substitution was found in the active center of the product of *αE7.* A different amino acid substitution, Trp^{251} to Ser, was identified in the product of *MdαE7* in the malathion resistant housefly strains. In this study, the housefly samples were collected from the farms and garbage disposal sites of 16 provinces in the Aegean and Mediterranean Regions of Turkey. After isolating the genomic DNA, the *MdαE7* gene was amplified, isolated and sequenced, from the beginning of exon 3 to the middle of exon 4. In addition to this, the carboxylesterase enzyme activities in these samples were assayed by using methylthiobutyrate as a substrate. In our experiments WHO was used as a standart sensitive control. For each region 32 (totally 64) samples were used. In the Aegean Region, 15 of the studied samples have the diagnostic malathion resistance allele Gly^{137} – Ser^{251}, 7 of them have diagnostic diazinon resistance allele Asp^{137} – Trp^{251},

6 of them have Gly^{137} - Ser^{251} / Trp, 2 of them have Asp^{137} - Ser^{251} / Trp alleles, 1 of them has diagnostic sensitive allel Gly^{137} - Trp^{251}, 1 of them has Gly^{137} - Ser^{251} / Leu allelles.

In the Mediterranean Region, 19 of the samples have diagnostic diazinon resistance alleles Asp^{137} - Trp^{251}, 5 of them have malathion resistance alleles Gly^{137} - Ser^{251}, 4 of them have diagnostic sensitive allele Gly^{137} - Trp^{251}, 2 of them have Asp^{137} - Ser^{251} / Trp alleles, 1 of them has Gly^{137} - Leu^{251}, 1 of them has Gly^{137} - Ser^{251} / Trp allelles.

A high level of carboxylesterase enzyme activity (142,7 ± 4,3 nmol/min/mg) was detected for WHO strain. However, the enzyme activities for the other samples, having malathion and diazinon resistance alleles, differed between the range of 31,4 ± 3,5 nmol/min/mg to 136,8 ± 36,8 nmol/min/mg. Based on our results; the frequency and distribution of the alleles indicate that they evolved on a regional basis and the pest management strategies for these regions must be evaluated again.

KeyWords : *Musca domestica*, insecticide resistance, *MdαE7,* malathion, diazinon, carboxylesterase, allelic distribution

Page number : 53

Adviser : Yrd. Doç. Dr. Vatan TAŞKIN

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 2.1. Malatyon insektisidinin kimyasal yapısı.....7
Şekil 2.2. Diyazinon insektisidinin kimyasal yapısı…….....…….……...8
Şekil 2.3. *MdαE7* geninin intron ve ekson bölgeleri.....15
Şekil 3.1. Çalışmamızda kullandığımız karasinek örneklerinin toplandığı iller.....18
Şekil 3.2. PCR reaksiyon süreleri ve sıcaklıkları.....19
Şekil 4.1: Mersin, Aydın ve Burdur illerinin karasinek örneklerinin PCR ürünlerinin agaroz jeldeki DNA bantlarının görünümü.....22
Şekil 4.2. Ege ve Akdeniz Bölgelerinden toplanan karasinek örneklerinde tespit edilen *MdαE7* allel frekansları…….……..24
Şekil 4.3. Ege ve Akdeniz Bölgelerinde'ki *MdαE7* allelik dağılımı. 26
Şekil 4.4. Baz dizi analizleri yapılan farklı karasinek örneklerinde *αE7* geninden elde edilen aminoasit dizisi.....27
Şekil 4.5. Baz dizi analizi yapılan bireylerin UPGMA analizi ile değerlendirilmesi.....35
Şekil 4.6. Baz dizi analizi yapılan bireylerin neighbour joining analizi ile değerlendirilmesi.....36
Şekil 4.7. Baz dizi analizi yapılan bireylerin minimum evolution analizi ile değerlendirilmesi.....37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No **Sayfa No**

Çizelge 2.1. 1999-2002 yılları arasında Türkiye'de yoğun olarak tüketilen insektisit miktarları.....9

Çizelge 3.1. PCR reaksiyon karışımı.....20

Çizelge 4.1. Ege Bölgesinde çalışılan örneklerde MdαE7'de 137. ve 251. noktalarında gözlemlenen aminoasit değişimleri ve bu örneklerdeki karboksilesteraz enzim aktiviteleri……...……...32

Çizelge 4.2. Akdeniz Bölgesinde çalışılan örneklerde MdαE7'de 137. ve 251. noktalarında gözlemlenen aminoasit değişimleri ve bu örneklerdeki karboksilesteraz enzim aktiviteleri……...……...33

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKE	Asetilkolinesteraz
GST	Glutatyon-S-Transferaz
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
DTNB	5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
MdaE7	*Musca domestica* α esteraz 7 geni
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
M	Molar
mM	Milimolar
HCI	Hidroklorik asit
CO2	Karbondioksit
Gly	Glisin
Trp	Triptofan
Ser	Serin
Leu	Lösin
Asp	Aspartik asit
OF	Organofosfat
DDT	Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
nmol	Nanomol
LD_{50}	Populasyonun %50'sini öldüren lethal doz
LC_{50}	Populasyonun %50'sini öldüren lethal konsantrasyon
M.Ö	Milattan önce
yy	Yüzyıl
kg	Kilogram
kb	Kilobaz
Å	Angstron
bç	Baz çifti
^0C	Santigrat derece

dk	Dakika
rpm	Rotation per minute
NaCl	Sodyum klorür
DNA	Deoksiribonükleikasit
ddH_2O	Duble distile su
PCR	Polimerase chain reaction
vb	Ve benzeri
%	Yüzde
min	Minute
mg	Miligram
P450	Monooksijenaz geni
Glu	Glutatamikasit
His	Histidin
Ala	Alanin
UPGMA	Unweigthed Pair Group Method of Aritmetic Averages
nm	Nanometre
KCl	Potasyum klorür
CO_2	Karbondioksit
G	Glisin
A	Alanin
V	Valin
L	Lösin
I	İzolösin
F	Fenilalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Treonin
C	Sistein
M	Metiyonin
W	Triptofan
Y	Tirozin
N	Asparagin
Q	Glutamin
D	Aspartikasit
E	Glutamikasit
K	Lizin

R	Arjinin
H	Histidin

1. GİRİŞ

İnsanoğlu asırlar boyu çeşitli şekillerde yaşamını güçleştiren zararlı böcek türleri ile mücadele etme gereği duymuş ve bu amaçla değişik yöntemler kullanmıştır. Her geçen gün yenilerinin eklendiği bu yöntemleri 4 ana grupta toplamak mümkündür (Koçak, 1988). Birincisi, Kültürel Mücadele olup, halkı bilinçlendirmeye yönelik bir mücadele yöntemidir. Bunda zararlıların yaşam biçimleri ve bunlarla mücadele konusunda halkı bilgi sahibi yapmak amaçlanmaktadır. İkincisi, zararlıların yaşama ortamlarını ve üreme bölgelerini ortadan kaldırmayı hedefleyen Mekanik Mücadele'dir. Bu da fiziksel altyapının düzeltilmesiyle gerçekleştirilebilmektedir. Üçüncü yöntem olan Biyolojik Mücadele ise, doğada bulunan her canlının bir veya birden fazla düşmanının olduğu ve bu düşmanlar kullanılarak zararlıların kontrol altına alınabileceği düşüncesine dayanmaktadır. Bu yöntem doğaya zarar vermeyen bir yöntem olması nedeniyle oldukça önemlidir. Fakat uygulamasının zor ve ekonomik olmaması ayrıca bazı durumlarda hedef olan canlıyı yok ederken hedef olmayan türleri de yok etmesi nedeniyle çok tercih edilmemektedir. Dördüncü yöntem ise, Kimyasal Mücadele'dir. Bu yöntemde, kimyasal ilaçlar kullanılarak zararlı böcek türlerinin yok edilmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla zararlı böcek populasyonlarıyla mücadelede kullanılan kimyasal ilaçlara genel olarak insektisit adı verilmektedir.

Geleneksel bir yöntem olarak zararlı böcek populasyonları ile mücadelede insektisit kullanımı çok yaygındır. Buna karşın hedef, ve hedef olmayan türlerde meydana gelen direnç gelişimi ise bu türlerle mücadelede önemli bir engel oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) direnci; bir populasyondaki bireylerin çoğunu öldüren belirli bir insektisit dozuna karşı hayatta kalabilme yeteneği olarak tanımlamıştır (Ay ve Sökeli, 2005). Mc Kenzie (2006) doğada 600'den fazla türün bir veya daha fazla insektisite karşı direnç geliştirdiğini belirtmiştir. İnsektisit direncinde görülen bu mikro-evrim, bir kısır döngü oluşturarak her geçen yıl birim alanda daha fazla kimyasal kullanımına neden olmaktadır. Bunun olumsuz etkileri de başta insan sağlığı olmak üzere, hedef olmayan organizmalar ve genel olarak tüm ekosistemlerde yoğun bir şekilde hissedilmektedir. Bu durum insektisit kullanım stratejilerinin doğru belirlenebilmesi zorunluluğunu da ortaya koymaktadır.

Zararlı böcek türlerinde meydana gelen bu direnç oluşumunu en aza indirgemek için günümüzde bazı uygulamalar yapılmaktadır. Bu uygulamaları Kiremitçigil (1995) şöyle özetlemiştir;

a) İnsektisitlerin sınırlı alanlarda ve zamanlarda uygulanması; tüm mevsimler yerine sadece zararlıların üreme bölgelerinde ve dönemlerinde ve erginlerin aşırı çoğaldığı dönemlerde kullanılması,

b) Mümkün olduğunca kimyasal mücadele yöntemleri dışındaki diğer kontrol yöntemlerinden yararlanılması,

c) Vektör kontrolünde kalıcı insektisitler yerine, kalıcı olmayan çabuk etkili insektisitlerin tercih edilmesi,

d) Daha çok ergin dişilerin öldürülmesine yönelik uygulamaların tercih edilmesi,

e) Populasyonlarda direnç geliştiği zaman doz arttırımı yerine bu konuda araştırma ve bilgiye başvurulması,

f) Uygulamada zararlı için önerilen öldürücü doz miktarına dikkat edilerek gerekli dozun uygulanmasının önemsenmesi ve aşırı doz kullanılmasından kaçınılması,

g) Larva ve ergin mücadelelerinde değişik grup kimyasallardan yararlanılması, birbirleri ile yakınlığı olmayan insektisitlerin aynı dönemde karışık veya dönüşümlü kullanılması,

h) İnsektisitlerin etkisini arttıran sinerjist maddeler kullanılması ile direnç gelişiminin azaltılması sağlanabilir.

Böcek populasyonları ile uzun vadeli ve başarılı mücadele stratejileri geliştirirken, doğada bulunan zararlı böcek populasyonlarındaki direnç seviyeleri hakkında yeterli bilgiye sahip olmak gereklidir. Zararlı böcek populasyonlarındaki insektisit direnç seviyelerini belirlemek için günümüzde yaygın olarak kullanılan birkaç yöntem vardır. Bunlardan ilki, ve en geleneksel olanı; doğadan toplanan örneklerin laboratuarda çoğaltılmasıyla elde edilen F_1 dölüne ait bireyler üzerinde uygulanan bioassay yöntemidir. Bu yöntem kısaca, laboratuar ortamında böceğin sırt yüzeyine mikroapplikatörler vasıtasıyla veya böceğin besinine belirli dozlarda insektisit eklenmesi şeklinde yapılmaktadır. Yöntemin temel amacı; insektisitin uygulandığı populasyonun % 50 sini öldüren dozun yani LD_{50} (Lethal Dose,

Öldürücü Doz) ve LC_{50} (Lethal Concentration, Öldürücü Konsantrasyon) değerlerinin bulunması esasına dayanır. Doğal populasyonlardan elde edilen LD_{50} ve LC_{50} değerlerinin laboratuar kontrol soylarından elde edilen LD_{50} veya LC_{50} değerlerine bölünmesi ile de direnç seviyesi araştırılan populasyonlardaki spesifik direnç oranı bulunmaktadır. Bu yöntem her ne kadar uygulama açısından kolay gibi görünse de, çok fazla bireye ihtiyaç duyulması, organizmadaki veya soydaki potansiyel direncin tam olarak belirlenememesi, gibi açılardan dezavantajlara sahiptir. Buna karşın biyokimyasal ve moleküler biyoloji tekniklerini kullanarak elde edilen direnç seviye tespit çalışmalarında ise hem az sayıda örneğe ihtiyaç duyulması hem de organizmadaki potansiyel insektisit direnç seviyesinin daha spesifik ve net olarak belirlenebilmesi açısından bioassay yöntemine göre çok daha avantajlıdır (Kristensen 2005; Han ve ark., 1998).

Çalışmamızda, model organizma olarak kullandığımız, doğadan toplanan karasinek, *M. domestica,* populasyonlarındaki direnç mekanizmasının genetik ve biyokimyasal düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilecek bilgiler ve sonuçlar ışığında ise yeniden geliştirilecek olan ilaçlama politikaları ile hedef olmayan birçok türün korunması ve doğada bu türdeki potansiyel direnç seviyesi hakkında bilgi sahibi olmak mümkün olabilecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Pestisitler

Pestisitler, genel anlamıyla pest (haşerat) adı verilen zararlı canlıları öldürmek için kullanılan maddeler olup, insektisit (böcek öldürücü), herbisit (yabancı ot öldürücü), fungusit (mantar öldürücü), rodentisit (kemirgen öldürücü) vb. şekilde sınıflandırılan kimyasal maddelerin tümünü kapsamaktadır. Her ne kadar son 40-50 yıl içinde fazlasıyla artmış olsa da, pestisitlerin kullanımı çok eski tarihlere dayanmaktadır. M.Ö 1500'lere ait bir papirüste bit, pire ve yabani arılara karşı insektisitlerin hazırlanışına dair kayıtlar bulunmuştur. 19. yy'da zararlılara karşı inorganik pestisitler kullanılmış, 1940'lardan sonra pestisit üretiminde organik kimyadan yararlanılmış, DDT ve diğer iyi bilinen insektisit ve herbisitler keşfedilmiştir. Bugüne dek 6000 kadar sentetik bileşiğin patenti alınmış olmasına karşın, bunların 600 kadarı ticari kullanımdadır. Ülkemizde tarımı yapılan kültür bitkileri, sayıları 200'ü aşan hastalık ve zararlının tehdidi altında olup, halihazırda 1/3'lere varan oranlarda ürün kayıpları yaşanmaktadır. Bu nedenle de pestisitlerin daha uzun yıllar büyük bir kullanım potansiyeline sahip olacağı kuşkusuzdur (www.dogainsanisbirligidernegi.org.tr/ makaleler/ pestisitler.doc).

2.1.1. İnsektisit ve insektisit grupları

İnsektisitlerin kimyasal savaş içerisindeki payı yaklaşık % 40 civarındadır. Zehirlilikleri ise herbisit ve fungusitlere göre daha fazladır (Yamanel ve Çakır, 2004). Günümüzde zararlı böcek populasyonları ile mücadelede dört farklı insektisit grubu kullanılmaktadır. Bunlar; organoklorinler, organofosfatlar, karbamatlar, ve pretroidlerdir. Bu insektisit gruplarından organofosfatlar, dünyadaki genel duruma paralel olarak ülkemizde de diğer insektisit gruplarına oranla çok daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Delen ve ark., 2005).

2.1.1.1. Organoklorinler

Zararlı böcek populasyonlarının kontrolü amacıyla sentetik olarak hazırlanan ilk insektisit sınıfını oluştururlar. Grubun en iyi bilinen üyesi DDT'dir, ilk defa 1874

yılında sentezlenmesine karşın böcek öldürücü özelliği ancak 1939 yılında İsviçreli kimyager Dr. Paul Müller tarafından ortaya konmuştur (Yamanel ve Çakır, 2004). O tarihlerde zararlılara karşı kullanılan toksisitesi yüksek, kalıcılığı az ve etkileri düzensiz olan anorganik ve bitkisel kökenli ilaçlarla mukayese edildiğinde DDT bitki koruma alanında kimyasal yöntemlerin gelişimine çok önemli katkılarda bulunmuştur. Bu sınıf insektisitlerin en büyük avantajı yüksek derecede lipitlerde çözünebilmeleri ve çevre koşullarına uzun sürelerde dayanıklı olmaları nedeniyle uygulama bölgelerinde uzun süre kalmalarıdır. Temas zehiri olarak etkileyen bu grup, parazitlerin merkezi sinir sisteminde şiddetli uyarılara sebep olmak suretiyle koordinasyon bozukluğuna ve sonuçta ölüme yol açarlar. Yüksek derecede kalıcı etkiye sahip olmaları nedeniyle bugün için pek çok ülkede kullanımları kısıtlanmıştır. Bu grubun bilinen başlıca üyelerine örnek olarak dieldrin, aldrin ve lindan verilebilir (Şanlı, 1988).

2.1.1.2. Karbamatlar

Fenol ve fenol türevlerinden üretilen sentetik bileşiklerdir. Karbamat grubu insektisitler, organofosforlu insektisitlere benzer şekilde ektoparazitlerde merkezi sinir sisteminde bulunan kolinesteraz enzimini inhibe etmek suretiyle etkilerini meydana getirirler. Bu grup insektisitlerin çoğunluğu kontakt zehiri olarak etkilidirler. Ektoparazitlerin kontrolü amacıyla kullanılan başlıca karbamat grubu insektisitler arasında karbaril, pirolan ve dimetan sayılabilir (Şanlı, 1988).

2.1.1.3. Pretroitler

Pyrethrum cinsine ait türlerin çiçeklerinden elde edilmektedir. Pretrum ekstraktı pirethrin I ve pirethrin II maddelerini içermektedir. Bunlardan ilki insektisit özelliğine ikincisi ise kısa sürede böceği sersemletme etkisine (knockdown effect) sahiptir. Doğal piretrumların, diğer insektisit grupları ile karşılaştırıldıklarında, en belirgin avantajları; geniş bir etki alanına sahip olmaları, özellikle memeli organizmalara karşı zehirliliklerinin düşük olması ve kısa sürede kalıcılıklarını yitirmeleri ile çevreye olumsuz etkilerinin daha az olması sayılabilir. Buna karşın üretilme maliyetlerinin yüksek olması, sınırlı miktarda üretilebilmeleri ve piretrin

etkin öğelerinin ışığa dayanıksız olması dezavantajları olarak kabul edilebilir. Bu dezavantajlarınan ötürü günümüzde sentetik pretroidlerin hazırlanmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Pretroid insektisitler, temas ve mide zehiri olarak etkilidirler. Bunun yanı sıra sinir sistemi üzerine de olumsuz etkileri vardır. Bu grubun önemli temsilcileri arasında, permetrin, deltametrin, alletrin ve sipermetrin sayılabilir. (Şanlı, 1988; Ünal ve Gürkan, 2001) .

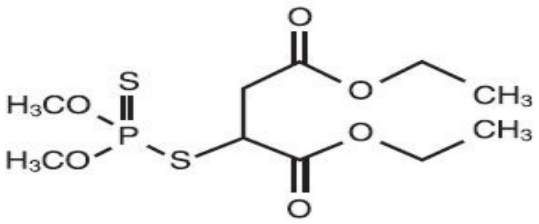
2.1.1.4. Organofosfatlar

Organofosfat esterleri pestisit, kimyasal savaş ajanları ve ilaç hammaddesi olarak kullanılırlar. İkinci Dünya Savaşından önce Almanya'da kimyasal savaş sırasında kullanılmak amacı ile sentezlenmiş olan organik fosforlu bileşiklerin savaş sonrasında güçlü insektisit etkileri ortaya çıkartılmış daha sonraki yıllarda aynı esasa dayanan binlerce yeni bileşik sentezlenmiştir (Ünal ve Gürkan, 2001). Ticari üretimlerine başlanmasından bu yana çok sayıda organofosforlu insektisit çeşidi zararlı böcek türlerinin kontrolünde kullanılmıştır (Akıner, 2003). Dünyada pestisit tüketiminin yaklaşık % 40'ını bu grup oluşturmaktadır. Sentezlenmelerinin kolay olması bu grubun büyümesi ve çeşitlenmesine neden olmuştur (Yamanel, 2004). Birçok koşulda azımsanmayacak derecede kalıcı etkileri bulunmakla beraber, organoklorlu insektisitlerle karşılaştırılamayacak derecede kolay ve hızla parçalandıklarından genellikle bir kalıntı sorunu yaratmazlar (Şanlı, 1988).

Bu grup insektisitler etkilerini sinir sisteminde bulunan asetilkolinesteraz enzimini aktif bölgesindeki serin aminoasidine geri dönüşümsüz bağlanarak gösterirler. Bunun sonucu olarak organizmada sinir iletimi aksar kasılma ve katılaşma meydana gelerek ölüm gerçekleşir (Lockridge ve ark. 1997). Bu grup insektisitler 1960'lı yılların başından itibaren karasinek (*M. domestica*) ve koyun etsineği (*Lucilia cuprina*)'ne karşı kullanılmaya başlanmış ve doğada bu grup insektisitlere karşı ilk dirençli örnekler 1960'lı yılların ortalarından itibaren tespit edilmiştir (Claudianos ve ark. 2002; Campbell ve ark. 1998a). Bu grubun en bilinen üyeleri arasında diyazinon, malatyon, diklorvos ve asuntol sayılabilir.

2.1.1.4.1. Malatyon

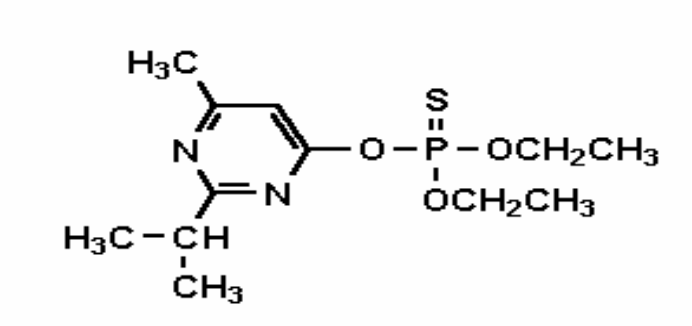
Malatyon [S-(1,2-karboethoksietil) O,O-dimetildithiofosfat)] en yaygın kullanılan organofosfat insektisitlerinden biridir. Karasinek ve sivrisinek de dahil olmak üzere geniş bir grup böcek türü ile mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır. Sarı-koyu kahverengi, hoşa gitmeyen keskin sarımsak kokulu bir insektisittir. Suda az, organik çözücülerde kolay çözünür. Yapısında 2 adet karboksilester grubuna ve bir fosfotriester grubuna sahip olması ile karakterize edilir (Şekil 2.1.). Malatyon *in vivo* ortamda karışık fonksiyonlu enzimler (mixed function oxidases) tarafından malaokzona dönüştürülür, bu form malatyon karboksilesteraz enziminin güçlü bir inhibitörüdür (Campbell ve ark. 1997).



Şekil 2.1. Malatyon insektisidinin kimyasal yapısı

2.1.1.4.2. Diyazinon

Diyazinon (O,O-dietil-O-(2-isopropil-6-metil-pirimidin-4-yl) fosforothioate) 1952 yılında bir İsveç firması tarafından geliştirilmiş olan bu insektisit daha çok hamamböceği, karınca, bit ve pire gibi zararlılarla mücadelede kullanılmıştır (Şekil 2.2.). Kahve renkli bir sıvı olup suda az, organik çözücülerde çok çözünürler. Diyazinon sinir sisteminde bulunan asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek organizmada ölüme yol açar (Gökçimen ve ark., 2007). Bu insektisitin günümüzde ABD'de bazı alanlarda kullanılması yasaktır.



Şekil 2.2. Diyazinon insektisidinin kimyasal yapısı

2.1.2. Türkiye'de insektisit kullanımı

Uygulanmasının kolay, etkisinin hızlı ve maliyetinin düşük olması nedeni ile ülkemizde de dünyadaki genel duruma paralel olarak özellikle tarımın yoğun olarak yapıldığı bölgelerde insektisit kullanımı en fazla tercih edilen mücadele yöntemidir. 1999-2002 yılları arasında ülkemizde yoğun olarak tüketilen insektisit miktarları çizelge (2.1.)'de verilmiştir.

Türkiye'de büyük çoğunluğu insektisit, fungisit ve herbisitler olmak üzere her yıl 33-35 bin ton zirai mücadele ilacı tüketilmektedir. Hektar başına tüketilen tarım ilacı aktif madde miktarı ise 0,5 kg'dır. Bu değer Fransa ve Almanya'da 4,4 kg, İtalya'da 7,6 kg, Hollanda'da 17,5 kg, Yunanistan'da 6 kg, Belçika'da 10,7 kg, Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde 7,5 kg'dır. Diğer bir deyişle Türkiye'ye kıyasla Fransa ve Almanya'da 9, İtalya, Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde 15, Hollanda'da 35, Yunanistan'da 12, Belçika'da 21 kat daha fazla ilaç tüketilmektedir (Keykubat ve Durmuşoğlu, 2005). Türkiye'deki en büyük sorun, bu ilaçların kullanımında yapılan teknik ve kişisel hatalar ile bilinçsiz ilaç kullanımından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 2.1.1999-2002 yılları arasında Türkiye'de yoğun olarak tüketilen insektisit miktarları (Delen ve ark., 2005'ten alınmıştır).

İnsektisit	**LD_{50} değerleri (mg/kg)**	**Yıllara göre insektisit tüketimindeki payları (%)**			
		1999	**2000**	**2001**	**2002**
Methamidophos	13	19,35	17,24	12,99	14,52
Chlorpyrifos-ethyl	135	13,72	14,09	31,94	12,76
Parathion-methyl	9	10,95	12,97	9,81	10,96
Diclorvos(DDVP)	25	7,72	10,22	8,91	8,08
Endosülfan	18	7,20	-	6,14	-
Carbaryl	307	-	5,80	-	-
Azinphos-methyl	5	-	-	-	7,08
TOPLAM		58,94	60,32	69,79	53,40

2.2. Böceklerde Direnç Tipleri

Plapp (1984), yaptığı çalışmasında böceklerde direncin, genel olarak, davranışsal, fizyolojik veya biyokimyasal olmak üzere ve iki temel mekanizmayla gerçekleştiğini belirtmiştir.

2.2.1. Davranışsal direnç

Organizmanın uygulanan insektisitten kaçma eğilimi göstermesidir. Sivrisineklerin insektisit uygulanan alanlarda dinlenmemeleri veya üreme bölgelerini değiştirmeleri bu tip dirence örnek olarak verilebilir.

2.2.2. Fizyolojik veya biyokimyasal temelli direnç

Bu tip direnç mekanizmaları 3 grupta incelenmektedir.

2.2.2.1. Vücut yüzeyi tarafından insektisit alımının azaltılması

Organizmanın dış iskeletinde meydana gelen, kalınlaşmalar vb, değişimler sonucunda insektisitin organizmanın dış yüzeyinden alımının azalmasıdır. Böylelikle alınan insektisit miktarının azalması ile organizmanın hayatta kalma şansı artmış olur.

2.2.2.2. Metabolik detoksifikasyonun arttırılması

İnsektisitin detoksifikasyonunda görev alan esteraz, karışık fonksiyonlu oksidazlar ve glutathion-S-transferaz gibi enzimlerde mutasyonlar sonucu meydana gelen değişikliklerle insektisitin hızlıca parçalanmasıdır.

2.2.2.3. Hedef enzimdeki değişim

İnsektisitin bağlanarak etkisiz hale getirdiği hedef enzimlerde (örn. asetilkolinesteraz) meydana gelen değişiklikler sonucu enzimin zehirli kimyasala karşı duyarsızlaşmasıdır.

Yukarıda bahsedilen bu mekanizmaların, pek çok direnç türünün gelişiminde birbirleriyle koordineli olarak değişimler gösterdiği düşünülmektedir (Gressel, 1986).

2.3. Metabolik Dirençte Rol Oynayan Enzimler

Genel olarak, böceklerde metabolik dirençte rol oynayan başlıca enzimler, glutathion-S-transferaz (GST), asetilkolinesteraz (AKE), monooksijenaz ve genel esterazdır. Bu enzimlerin metabolik dirençteki rolleri şöyle özetlenebilir:

2.3.1. Glutatyon-s-transferazlar (GST)

Bu grup enzimler, insektisitleri de içine alan ksenobiyotik bileşiklerin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Hemingway ve ark. 2000; 2004; Enayati ve ark., 2005). GST enzimleri indirgenmiş glutatyonu (GSH) insektisitlerle

veya onların metabolik ürünleri ile birleştirerek bu zehirli kimyasalları metabolizma açısından zararsız bir hale dönüştürürler. Organofosfat grubu insektisitlere karşı dirençli karasinek soylarında, duyarlı soylar ile karşılaştırıldığında, yüksek bir GST aktivitesi gözlenmiştir (Clark ve Shamaan, 1984; Zhou ve Syvanen, 1997). GST grubuna dahil olan enzimler bir gen ailesi tarafından kodlanmakta olup (Clark ve Shmaan, 1984; Zhou ve Syvanen, 1997), bu gen ailesinin üyeleri olan *MdGST-1,-2,-3,-4,-6a* ve *-6b* genlerinin baz dizi analizleri yapılmıştır. Her ne kadar, bir karasinekte üretilen GST izoenzimlerinin gerçek sayısı tam olarak bilinmese de, MdGST-1,-3 ve -6a izoenzimlerinin organofosfat grubu insektisitlere karşı dirençli karasinek soylarında duyarlı soylar ile karşılaştırıldığında fazla miktarda üretildiği belirtilmiştir (Zhou ve Syvanen, 1997).

2.3.2. Asetilkolinesteraz (AKE) enzimi

Bu enzim, sinir sisteminde nörotransmitter olarak görev yapan asetilkolini hidrolize ederek, sinir uyarılarının iletiminde önemli bir görev alır. Karasinekte organofosfat ve karbamat grubu insektisitlerin vücut içerisindeki primer hedeflerinden biridir (Taşkın ve Kence, 2004; Sussman ve ark. 1991). Özellikle organofosfat grubu insektisitler bu enzimin aktif bölgesindeki Serin amino asidine bağlanarak bu enzimi inhibe eder ve sinir uyarılarının iletimini engellerler ki, bu da organizmanın ölümüne yol açar (Chen ve ark., 2001). Bazı böcek türlerinde asetilkolinesteraz enziminde meydana gelen mutasyonlar sonucu bu enzimlerin organofosfat grubu insektisitlere karşı duyarsızlaştığı (yani bu grup insektisitler tarafından inhibe edilemediği) belirtilmiştir (Kozaki ve ark., 2001). Karasineklerde Ake enziminin değişik grup organofosfat ve karbamat insektisitlerine karşı duyarsızlaşmasının genetik temelleri ise Kozaki ve ark., (2001); Walsh ve ark., (2001); Tao ve ark., (2006) tarafından çalışılmış ve Ake enzimini kodlayan *ake* geninde farklı mutasyonlar saptanmıştır. Bir organofosfat olan Fenitrokzon'a dirençli karasinek soylarında bu enzimi kodlayan genin baz dizi analizi yapılmış ve 342 numaralı amino asidin Glisin'e, 402 numaralı amino asidin ise Tirozin'e dönüştüğü bulunmuştur (Yao ve ark., 1997; Kozaki ve ark., 2001). Ayrıca, Charpentier ve Fournier (2001) *Drosophila melanogaster*'de Ake enzim miktarı ve paratyon (bir

organofosfat)'a direnç düzeyi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

2.3.3. Monooksijenazlar

Böcekler, bitkiler, memeliler, kuşlar ve bakteriler gibi bütün aerobik organizmalarda mevcut olan bu enzim ailesi ilaçlar, pestisitler ve bitki toksinleri gibi ksenobiyotiklerin katabolizması ve anabolizması ile hormonlar, yağ asitleri ve steroidler gibi endergonik bileşiklerin düzenlenmesindeki rollerinden dolayı önemli metabolik bir sistemdir. Sitokrom P450 monooksijenazları bu ailenin bilinen en önemli temsilcisidir. Sitokrom P450 monooksijenazlar çok geniş bir substrat grubu üzerine etkilidirler. Bunun en önemli nedeni bu enzim grubunu kodlayan genlerin organizma da birden fazla sayıda kopyasının bulunmasıdır, *Caenorhabditis elegans*'ta 80 adet, insanda 57 adet, *Drosophila melanogaster*'de ise 90 adet *P450* geni olduğu bildirilmiştir. Pretroit gibi insektisit grupları için P450 enzimleri detoksifikasyonda önemli rol oynarken organofosfat grubu insektisitler için organizmada hem aktivasyon hem de detoksifikasyonda rol oynadığı rapor edilmiştir (Scott ve Zhang, 2003).

2.3.4. Esterazlar

Bu enzim grubu ester bağlarının hidrolizinden sorumlu olup, hormon ve feromon metabolizmasında, sindirim sisteminde, sinir iletiminde, üreme davranışında ve özellikle organofosfot grubu insektisitlere karşı dirençte önemli rol oynamaktadır (Claudianos, 1999b).

Esteraz enzimleri 3 farklı inhibitör grubu (sülfidril grubu bileşikler, organofosfatlar ve eserin sülfatlar) ile vermiş oldukları reaksiyona göre 4 sınıfa ayrılırlar. Bunlar; asetilesterazlar, arilesterazlar, karboksilesterazlar, ve kolinesterazlar olup Oakeshott ve ark., (1993) tarafından detaylı olarak açıklanmıştır.

*Asetilesterazlar***:** Bu enzimler yukarıdaki inhibitörler tarafından etkilenmez ve genellikle alifatik subsratları tercih ederler.

*Arylesterazlar***:** Sadece sülfidril grubu taşıyan inhibitörler tarafından inhibe edilirler ve genellikle aromatik subsratları tercih ederler.

*Karboksilesterazlar***:** Bu enzimler sadece organofosfatlar tarafından inhibe edilirler ve genellikle asetik asitten daha uzun olan alifatik subsratları tercih ederler.

*Kolinesterazlar***:** Organofosfat ve eserin sülfat inhibitörleri tarafından inhibe edilirler ve aromatik ve alifatik esterlerin dışında kolinesterleri tercih ederler.

Bir çok böcek türlerinde, organofosfat grubu insektisitlere karşı metabolik direnç kazanılmasında karboksilesteraz enzimi önemli bir rol oynar (Campbell ve ark., 1998a,b). Böcek türlerinde, şu ana kadar, organofosfat grubu insektisitlere karşı esteraz enzim temelinde gelişen 3 farklı metabolik direnç mekanizması bulunmaktadır, bunlar sırasıyla; gen amplifikasyonu vasıtası ile direnç kazanılması (ilgili genin organizmanın genomunda kopya sayısının arttırılması), diyazinona karşı direnç ve malatyona karşı (ilgili gende meydana gelen mutasyonlar sonucu) gelişen dirençtir (Claudianos ve ark., 1999a; 2002; Newcomb ve ark., 1997; Campbell ve ark., 1997, 1998a,b).

2.3.4.1. Gen amplifikasyonu vasıtası ile direnç kazanılması

Myzus persiace, Culex quinquefasciatus, Culex pipiens ve *Nilapartave lugens*'de olduğu gibi spesifik bir karboksilesteraz geninin genom içerisindeki kopya sayısının artırılması ile (yaklaşık 300 kopyaya kadar) üretilen enzim miktarının da artışı sağlanır (organizmadaki protein miktarının yaklaşık % 3'ü). Bu spesifik karboksilesteraz enziminin her ne kadar organofosfat insektisitleri parçalama miktarı düşükse de, organizma içerisinde fazla miktarda üretilmiş olması onun insektisitleri yeterli oranda parçalamasını sağlar. Böylece, insektisit organizma içerisinde hedef enzim olan asetilkolinesteraz enzimine ulaşmadan parçalanabilir ve organizma hayatta kalır (Hemingway, 2000; Newcomb ve ark. 1996, 1997; Guerro, 2000; Devonshire ve Field, 1991).

2.3.4.2. Diyazinona karşı direnç

L. cuprina ve *M. domestica* soylarında organofosfatlı (malatyon / diyazinon) insektisitlere karşı direnç, karboksilesteraz enzim aktivitesindeki değişikliklere bağlıdır. α-esteraz gen ailesinin bir üyesi olan *αE7* geninin ürünü, olasılıkla ksenobiyotik esterlerin detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Diyazinon / paratiyona dirençli karasinek ve koyun etsineği soylarında *MdαE7* ve *LcαE7* genlerinin baz dizi

analizleri yapılmış, ve duyarlı soylar ile karşılaştırıldığında, enzimin aktif bölgesinde 137 numaralı aminoasidinin Gly'den Asp'a (Gly^{137}→Asp) değiştiği bulunmuştur, bu durumun enzime diyazinon / paratiyon grubu organofosfat insektisitleri parçalama (OF hidroliz) yeteneği kazandırdığı buna karşın karboksilesteraz enzim aktivitesinin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir. Enzimin aktif merkezinde meydana gelen bu değişiklikle ortamda bulunan su molekülü fosfor-enzim ara bileşiğine rahatlıkla atak yapabilme imkanı kazanmış ve böylelikle enzim organofosfatları hidroliz edebilme yeteneği kazanmıştır, reaksiyonun mekanizması Newcomb ve ark., (1997) tarafından detaylı olarak açıklanmıştır.

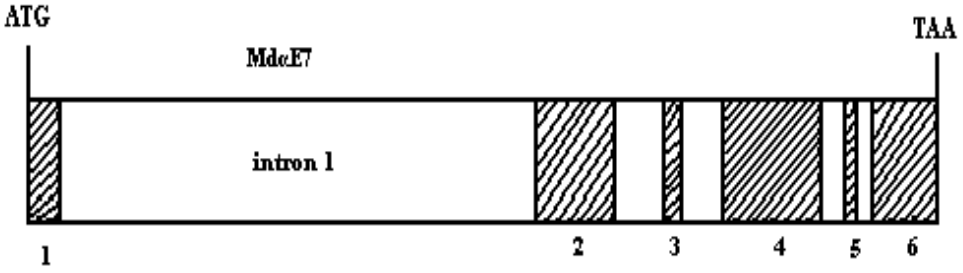
2.3.4.3. Malatyona karşı direnç

Malatyona dirençli karasinek ve koyun etsineği soylarında da *MdαE7* ve *LcαE7* genlerinin baz dizi analizleri yapılmış ve duyarlı soylar ile karşılaştırılmıştır. Yine enzimin aktif merkezinde *M. domestica'*da 251 numaralı aminoasitin Trp'dan Ser'e (Trp^{251}→ Ser), *L. cuprina*'da ise Trp'dan Leu'e değiştiği tespit edilmiştir (Taşkın, 2002; Campbell ve ark., 1997; 1998 a, b). Bu değişiklikler enzime organofosfat hidroliz ve malatyon karboksilesteraz enzim aktivitesi kazandırmış fakat asli görevi olan karboksilesteraz aktivitesinde de bir düşüşe neden olmuştur, reaksiyon mekanizması detaylı olarak Campbell ve ark., (1998b) tarafından tartışılmıştır. Kısaca; 251 numaralı Trp'ın aktif merkezde daha küçük bir amino asitle, Ser ve Leu gibi, yer değiştirmesi neticesinde aktif merkezdeki boşluk 4.3 Å'den 6 Å'a çıkmakta böylece enzim substrat arasında daha geniş bir alan yaratılmakta ve bunun sonucu olarak da sterik engelleme azalmaktadır. Bu etkilerin yanı sıra, aminoasit değişimi sonucu aktif merkezde yaratılan yeni konfigürasyon değişikliğinin de yukarıda belirtilen aktivitelerin kazanılmasında ve kaybedilmesinde büyük bir önemi vardır.

Organizmanın organofosfat grubu insektisitlere karşı direnç kazanmasında önemli bir rol oynayan MdαE7 karboksilesteraz enzimi hakkında daha detaylı bilgi aşağıda verilmiştir.

2.4. MdαE7 Karboksilesteraz Enzimi

MdαE7 geninin uzunluğu yaklaşık 10 kb olup 6 ekson ve 5 intron bölgesinden oluşmuştur (Şekil 2.5.). İntron 1 bölgesi yaklaşık 7 kb, intron 2 – 5 bölgeleri sırası ile 63, 62, 61 ve 61 bç uzunluktadır. İntron I bölgesinin diğer intron bölgelerinden daha uzun olmasının nedeni ise bu bölgenin transpozon kapsamasındandır. *MdαE7* geninde protein kodlayan ekson bölgelerinin uzunluğu 1710 bç. olup kodlamış olduğu αE7 enzimi ise 570 aa den oluşmaktadır.



Şekil 2.3. *MdαE7* geninin intron ve ekson bölgeleri

Bu enzim karboksil / kolinesteraz enzim ailesinin sahip olduğu, enzimin katalitik aktivitesi için gerekli olan, tüm karakteristik motiflere sahiptir. Bu motifler;

a) Histidin ilmek (histidine loop) enzimde 468 – 476 numaralı aminoasitler arası,

b) Asit dönüş (acid turn) 349 – 352 numaralı aminoasitler arası,

c) Nükleofilik dirsek (nücleophilic elbow) 214 – 220 numaralı aminoasitler arası,

d) Katalitik üçlü (catalytic triad) Ser^{218}, Glu^{351} ve His^{471},

e) Oksianyon boşluk (oxyanion hole) Gly^{136}, Gly^{137} ve Ala^{219}'dur (Claudianos ve ark., 1999; Taşkın, 2002).

Bununla birlikte enzimin 440 ile 450 aminoasitleri arasında bulunan PIYLYRFDFDS dizisi karboksil / kolinesteraz enzim ailesinde sadece MdαE7, LcαE7 ve DmαE7'de korunmuştur (Claudianos ve ark., 1999).

2.5. Mutant Ali-Esteraz Hipotezi

Yukarıda da bahsedildiği üzere, malatyon ve parathion / diyazinona dirençli *M. domestica* ve *L. cuprina* soylarında karboksilesteraz enziminde (MdαE7 ve LcαE7) meydana gelen değişikliklerin bir sonucu olarak enzim organofosfat grubu insektisiti parçalarken, kendi asli görevi olan karboksilesteraz aktivitesinin (metiltiyobütirat, naftil asetat vb. substratlar kullanılarak tayin edilmiştir) bir kısmını kaybetmektedir. Bu durum ilk defa 1960 yılında Oppenhort ve Van Asparen tarafından "Mutant Ali-esteraz hipotezi" olarak rapor edilmiş olup Campbell ve ark., (1997, 1998a,b); Newcomb ve ark., (1997); Caludianos (1997b) tarafından da bu mekanizma moleküler düzeyde açıklanmıştır.

2.6. Çapraz Direnç

Organofosfat grubu insektisitlerin bir kısmının fosfor atomlarına ya 2-methoksi grubu, malatyonda olduğu gibi veya 2-ethoksi grubu, diyazinonda olduğu gibi, bağlanmıştır. Spesifik bir insektisite karşı direnç kazanmış olan organizma sadece uygulanan insektisite karşı değil, aynı etki mekanizmasına sahip, aynı grup ve benzer kimyasal yapılarda olan diğer insektisitlere karşı da direnç gösterebilir. Campbell ve ark., (1997; 1998 a, b) organofosfat grubuna ait değişik insektisitler kullanarak *L. cuprina*'da bu durumu detaylı olarak açıklamışlardır. Buna göre; diyazinona dirençli soylarda organizmanın bu insektisit ile benzer kimyasal yapıya sahip (fosfor atomlarına bağlı 2-ethoksi grubu bulunduran) diğer organofosfat insektisitlerine de yüksek oranda bir direnç geliştirdiğini tespit etmişlerdir. Aynı durum, malatyona dirençli soylarda da incelenmiş ve organizmanın benzer kimyasal yapıya sahip (fosfor atomlarına 2-methoksi bulunduran) insektisitlere karşı yüksek oranda bir direnç geliştirdiği gözlenmiştir. Bu durum çapraz direnç olarak tanımlanmıştır ve organizmaların sahip olduğu potansiyel direnci göstermesi açısından önemlidir.

.

2.7. Model Organizma Olarak Karasinek (*Musca domestica* L.)

Karasineğin taksonomik sınıflandırması:

Phylum: Arthropoda; Subphylum: Mandibulata; Superclass: Hexapoda; Class: İnsecta; Order: Diptera; Suborder: Cyclorrophae; Familya: Muscidae; Genus: Musca; Species: *Musca domestica*

Günümüzde, karasineğin bilimsel çalışmalarda model organizma olarak kullanılmasının avantajları aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

- Pek çok yerde olduğu gibi, tarım alanları içerisinde de yaygın olarak bulunabilmesi,
- Yılın her zamanı doğadan toplanmalarının mümkün olması,
- Göç edebilme yeteneklerinin olması,
- Laboratuarda üretilmelerinin kolay olmasıdır,
- Kısa zamanda fazla sayıda döl verebilmesidir.

2.8. Çalışmanın Amacı

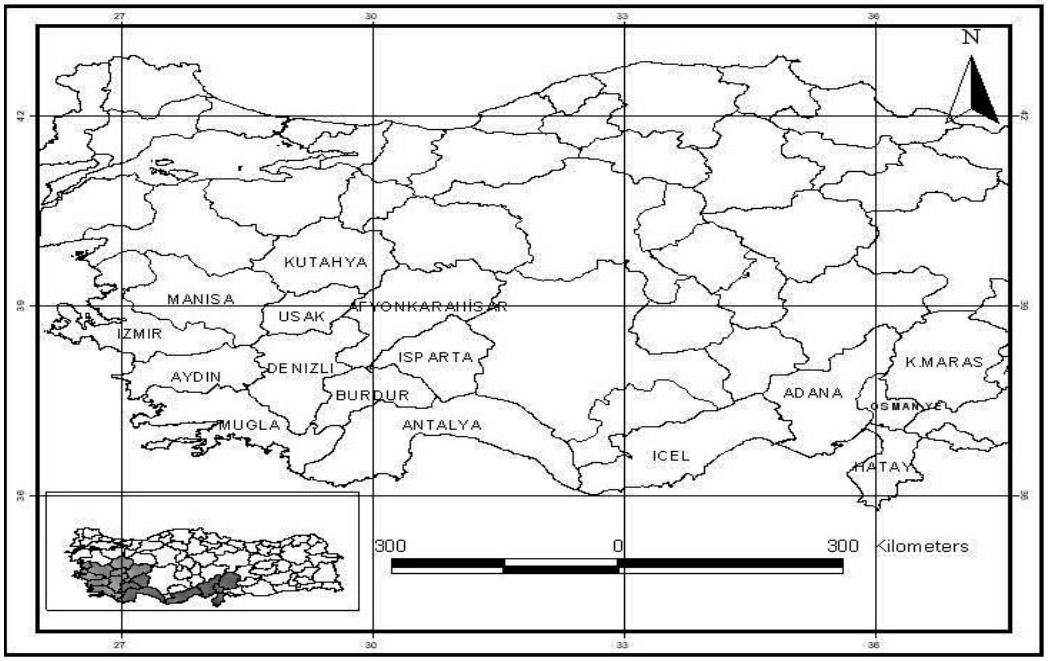
Bu çalışmanın genel amacı, Ülkemizde tarımın yoğun olarak yapıldığı Ege ve Akdeniz Bölgelerinden toplanan *M. domestica* örneklerinde, ürünü organofosfat insektisitlerine karşı direnç gelişiminde önemli bir rol oynayan *MdαE7* geninin kısmi baz dizi analizinin yapılması ve yine bu örneklerdeki, metilthiobütirat substratı kullanarak, spesifik karboksilesteraz enzim aktivitesinin ölçülmesidir. Bu bağlamda çalışmaya ilişkin hedefler şöyledir:

1. Tarımın yoğun olarak yapıldığı bölgelerden uygun sayıda örneklerin toplanması ve laboratuar ortamında çoğaltılarak saklanması,
2. Örneklerden genom DNA'sının elde edilmesi ve uygun primerler kullanılarak PCR yöntemi ile ilgili genin çoğaltılması,
3. Çoğaltılan DNA bantlarının jelden izolasyonu ve baz dizi analizine gönderilmek üzere hazır hale getirilmesi,
4. Baz dizi analizleri yapılan örneklerdeki karboksilesteraz enzim aktivitesinin metilthiobütirat substratı kullanarak belirlenmesi,
5. Populasyonlar arasındaki varyasyonların değerlendirilmesi,
6. Geleceğe dönük insektisit uygulama stratejileri hakkında sonuç ve önerilerin çıkarılması.

3. MATERYAL METOT

3.1. Karasinek Örneklerinin Toplanması

Çalışma alanlarının belirlenmesinde tarımın yoğun olarak kullanıldığı bölgeler göz önünde bulundurulup örnekleme çalışmaları bu alanlardan yapılmıştır. Buna göre, Türkiye'nin iki önemli tarım bölgesi olan Ege ve Akdeniz Bölgeleri örnekleme alanları olarak seçilmiş ve bu bölgelerden toplam 16 ilde (Muğla, Aydın, İzmir, Manisa, Kütahya, Uşak, Afyon, Denizli, Isparta, Burdur, Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye, Kahramanmaraş ve Hatay) 2006 - 2007 yıllarının yaz aylarında tarım alanlarından ve sanayinin yoğun olarak yapıldığı yerlerden örnekleme çalışmaları yapılmıştır (Şekil 3.1.). Ergin bireyler laboratuar ortamında özel kafeslerde süt tozu, su ve şeker ile beslenmiştir. Yumurtalar ise kepek, süt tozu, küspe, maya ve su karışımı ile hazırlanan ortamlarda toplanmıştır. F_1 jenerasyonuna ait bireyler, 4 - 6 günlük iken, laboratuar ortamında CO_2 gazı ile bayıltıldıktan sonra -80^{o}C de dondurularak saklanmıştır. Çalışmamızda Hacettepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden elde ettiğimiz uluslararası standart WHO duyarlı soyu referans soy olarak kullanılmıştır.



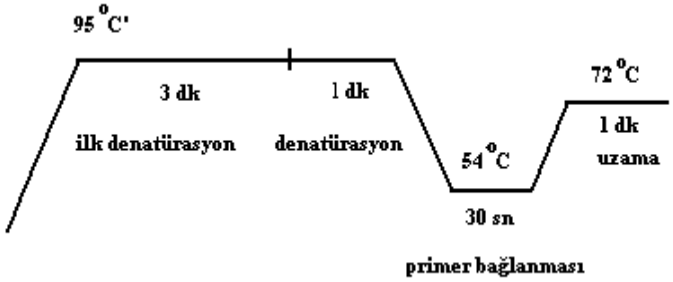
Şekil 3.1. Karasinek örneklerinin toplandığı iller.

3.2. DNA İzolasyonu

Örneklerimizden DNA izolasyonu, Fermantas firmasına ait genomik DNA pürifikasyon kiti kullanılarak yapılmıştır. Bu metoda göre kısaca; 400 µl lysis solüsyonu içerisinde homojenize edilen örnekler 65 ^{o}C'de 10 dk. süre ile inkübe edildikten sonra, 600 µl kloroform ilave edilmiş ve tüpler 10000 rpm'de 2 dk. süre ile santrifüj edilmiştir. Daha sonraki basamakta ise, DNA taşıyan üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve 800 µl presipitasyon solüsyonu eklenmiştir. 10000 rpm'de 2 dk. santrifüjün ardından üst faz uzaklaştırılıp çökeltinin üzerine 100 µl 1,2 M NaCl ilave edilip vorteks yapılmıştır. Tüp içerisinde kalan çökeltiye 300 µl soğuk etanol eklenmiş ve 10000 rpm'de 4 dk. santrifüj edilmiştir. Son basamakta ise elde edilen DNA % 70'lik etanolle yıkandıktan sonra 30 µl ddH_2O eklenerek +4 ^{o}C 'de bir gece bekletilmiş ve örnekler daha sonra % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR döngüleri kısaca; zincirin açılması (ilk denatürasyon) 95 ^{o}C'de 3 dk, reaksiyon döngüsünün ilk adımı olan 95 ^{O}C'de 1 dakika süre ile denatürasyon, primerlerin bağlanması 54 ^{O}C'de 30 saniye, ve son aşama olan sentez (uzama) 72 ^{O}C'de 1 dakikadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. PCR reaksiyon süreleri ve sıcaklıkları

Her PCR reaksiyonu 35 döngüden oluşmaktadır. Reaksiyonlarda MdαE49 (5'-gggattggctttcattaggaattcc-3') ve MdαE50 (5'-cggaggattgtctatacctgaatg-3') primerleri kullanılarak *MdαE7* geninin ekson 3 bölgesinin başından ekson 4 bölgesinin ortasına kadar olan kısmı çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonlarında kullandığımız bileşenlerin konsantrasyonu çizelge (3.1.)'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. PCR reaksiyon karışımı

PCR Bileşenleri	
ddH_2O	5,55µl
dNTP (10 mM)	5µl
PCR Tamponu (10X)	2,5µl
Taq polimeraz (1unit)	0,2µl
DNA (10 ng/ml)	10µl
$Primer_1$ ve $primer_2$ (50 pmol)	0,25µl
$MgCl_2$ (1.5mM)	1,5µl
Toplam reaksiyon hacmi	25µl

3.4. PCR Ürünlerinin Görüntülemesi ve Jelden İzolasyonu

PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan ilgili gen bölgesinin görüntülenmesi amacı ile % 1'lik agaroz jel hazırlanmış ve Vilber Lourmant CN-15 Cabinet marka görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Jelden DNA izolasyonu işlemi için QIAGEN firmasına ait jel ekstraksiyon kiti kullanılmıştır. Bu protokole göre; temiz bir bistüri ile agoroz jelden istenilen DNA bandı kesilmiş ve ağırlığının 3 katı kadar QG tamponu eklenmiştir. 50 ^oC'de 10 dk. süre ile (2-3 dakikada bir örnekler vortekslenerek) jel tamamen eriyinceye kadar su banyosunda inkübe edilmiş ve eriyen jel toplama tüpüne boşaltılıp 13000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Bu işlemden sonra filtrede kalan DNA üzerine 500 µl QG tamponu ilave edilmiş ve 1 dk. süre ile tekrar santrifüj edilmiştir. Boşaltılan tüpe elde edilen DNA'yı yıkamak amacı ile 750 µl PE tamponu eklenip 1 dk. santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilip üzerine 50 µl ddH_2O konulduktan sonra 1 dk.

santrifüj edilip DNA hazır hale gelmiştir ve kullanılıncaya kadar -20 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.5. Baz Dizi Analizi Tespiti

Çalışmamızda, her ilden 4 adet olmak üzere 64 örnek ve 1 adet WHO duyarlı laboratuar soyu ile birlikte toplam 65 birey kullanılmıştır. DNA baz dizi analizleri yerli şirketlerden biri olan Refgen Biyoteknoloji firmasına yaptırılmıştır. Firma bu analizler için A3100 ABI prism cihazını kullanmıştır.

3.6. Karboksilesteraz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Örneklerimizdeki karboksilesteraz enzim aktivitesi Kao ve ark., (1984) tarafından geliştirilen yöntemle belirlenmiştir. Buna göre; 4-6 günlük örnekler +4 ^{o}C'de 250 µl SEKT tamponunda (0.25 M sükroz, 0.001 M EDTA, 0.025 M KCI , 0.05 M Tris, pH = 7.0) homojenize edilmiştir. Homojenatlar 10000 rpm de 20 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatantlar Aydın Adnan Menderes Üniversitesinde bulunan Beckman Coulter ultrasantrifüj kullanılarak 100 000 g de 1 saat süre ile santrifüj edilmiştir. Mikrozomal çökelti 5 ml 0.001 M pH = 8.0 potasyum fosfat tamponunda süspansiyon haline getirilmiştir. 100 µl enzim solusyonuna 100 µl 0.01 M DTNB solüsyonu eklenip, bu karışıma daha sonra substrat olarak 20 µl 0.02M metilthiobütirat ve 1 ml 0.1M potasyum fosfat tamponu (pH = 8.0) eklenerek 3-5 dakika inkübe edildikten sonra aktivite değeri 412 nm de Thermo MultiSkan Spektrofotometre'de 10 dakika süresince ölçülmüştür.

3.7. Örneklerdeki Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Bradford (1976) tarafından önerilen protokol kullanılmıştır.

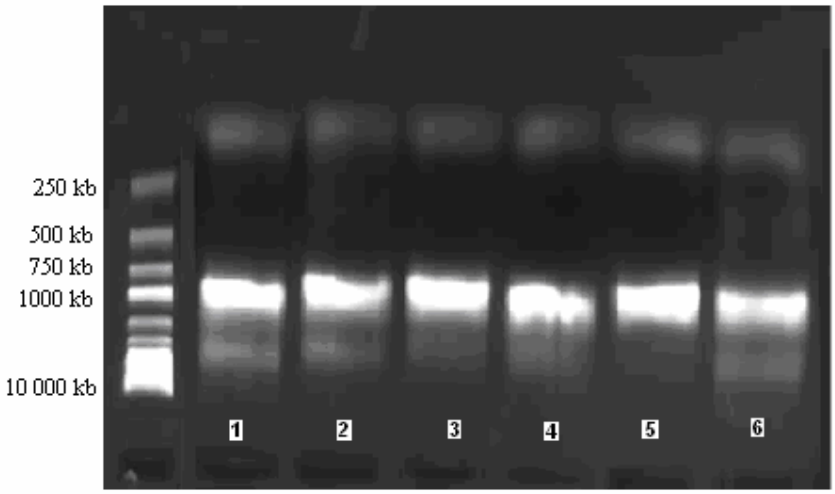
3.8. Bilgisayar Programları

Baz dizi analizlerinin bir araya getirilmesinde ve düzenlenmesinde MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) ve Bioedit (Tom Hall, Ibis Biosciences A subsidiary of Isis Pharmaceuticals, http://www.mbio.ncsu.edu/ BioEdit) programları kullanılmıştır.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İncelenen Örneklerdeki *MdαE7*

Çalışmamızda Türkiye'nin iki önemli tarım bölgesi olan Ege ve Akdeniz Bölgelerinden toplanan karasinek örnekleri kullanılmıştır. Ege bölgesinden 8 il (Muğla, Aydın, İzmir, Manisa, Kütahya, Uşak, Afyon, Denizli), ve Akdeniz bölgesinden 8 il (Isparta, Burdur, Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye, Kahramanmaraş, Hatay) olmak üzere 16 ilin farklı lokasyonlarından toplanan karasinek örneklerinde *MdαE7* geninin ekson 3 bölgesinin başından ekson 4 bölgesinin ortasına kadar, MdαE49 ve MdαE50 primerleri kullanılarak ilgili bölge (yaklaşık 650 baz çifti) PCR yöntemi ile çoğaltılmış (Şekil 4.1.) baz dizi analizleri yapılmış ve bu örneklerde metiltiyobütirat substrat olarak kullanılarak karboksilesteraz enzim aktiviteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.1. Mersin (1 ve 2. örnekler) , Aydın (3. ve 4. örnekler) ve Burdur (5. ve 6. örnekler) illerinin karasinek örneklerinin PCR ürünlerinin agaroz jeldeki DNA bantlarının görünümü.

Böylelikle bu gen açısından bölgeler arası allelik farklılıklar belirlenmiş ve baz dizi değişimlerinin enzim aktivitesinde yarattığı farklılıklar tespit edilmiştir. Her il 4 örnek ile temsil edilmiş olup, toplam 64 örnek ve duyarlı WHO laboratuar soyu ile

birlikte kısmi baz dizi analizi ve karboksilesteraz enzim aktivitesi ölçümü yapılan örnek sayısı 65 olmuştur. İntron 3 bölgesinin uzunluğu çalışılan örneklerde 61 bç ila 63 bç arasında değişiklik göstermiştir.

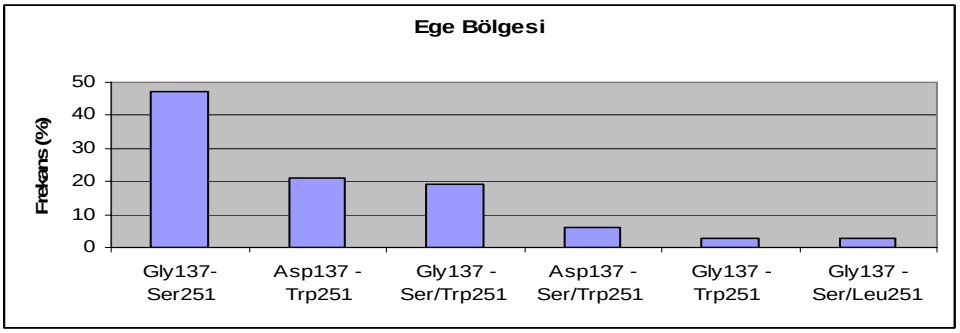
Örneklerden elde edilen allel dağılımının yüzde oranları şöyledir; diyazinon direnç tipi alleler (Asp^{137} - Trp^{251}) yaklaşık % 40 frekansa, malatyon direnç tipi alleller (Gly^{137} - Ser^{251}) 31 % frekansa sahipken, duyarlı kontrol soyu olan WHO tipi alleller (Gly^{137} - Trp^{251}) ise toplam frekansın % 8'ini oluşturmaktadır. 4 örnekte ise (Asp^{137} - Ser^{251} / Trp) gözlenmiştir (Şekil 4.2.). Malatyon tipi direnç alleline sahip olan bireylerin Ege bölgesinde, diyazinon direnç tip alleline sahip bireylerin ise Akdeniz bölgesinde daha yüksek frekansa sahip oldukları gözlenmiştir.

Ege Bölgesi'nde 15 örnekte, malatyon direnç tip alleli olan Gly^{137}- Ser^{251}, 7 örnekte diyazinon direnç tip alleli olan Asp^{137} - Trp^{251}, 6 örnekte Gly^{137} - Ser^{251} / Trp, 2 örnekte Asp^{137} - Ser^{251} / Trp, 1 örnekte duyarlı allel tipi olan Gly^{137} - Trp^{251}, 1 örnekte ise Gly^{137} - Ser^{251} / Leu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1.). Denizli, Kütahya, Aydın'dan çalışılan 3'er örnekte malatyon direnç tip alleli bulunmuştur. Buna karşın Afyon bölgesinden çalışılan 4 örnekten 3'ünde ise diyazinon direnç tip alleli tespit edilmiştir. Aydın ve Uşak 4 numaralı örnekler, Manisa 2, 3 numaralı örnekler, Muğla 2 ve 4 numaralı örneklerinde ise Gly^{137} - Ser^{251} / Trp allelleri bulunmuştur. Uşak 2 numaralı örnek ve İzmir 4 numaralı örneklerde ise malatyon ve diyazinon direnç tip allelerinin kombinasyonu olan Asp^{137}-Ser^{251} / Trp allelleri bulunmuştur. Kütahya 4 numaralı örnekte ise, duyarlı soyun sahip olduğu gibi, 137 ve 251 noktalarında sırasıyla Gly ve Trp aminoasitleri bulunmaktadır. Denizli bölgesinin 4 numaralı örneğinde ise bu gen için iki farklı allel tespit edilmiştir buna göre; her iki allelde enzimin 137 numaralı aminoasidinde Gly, 251 numaralı noktasında ise allellerden biri Ser aminoasidine sahipken diğer allel bu noktada bu aminoasitle yaklaşık aynı büyüklüğe sahip olan Leu aminoasidine sahiptir (Çizelge 4.1.).

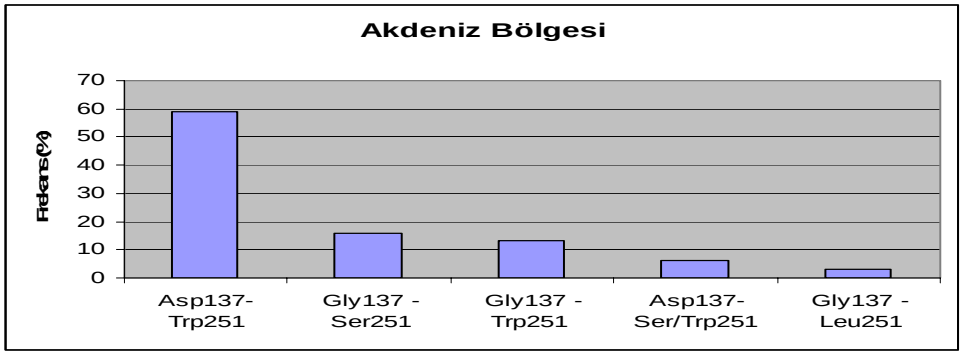
Akdeniz Bölgesi'nde ise çalışılan 19 örnekte Asp^{137} - Trp^{251}, 5 örnekte Gly^{137} - Ser^{251}, 4 örnekte Gly^{137} - Trp^{251}, 2 örnekte Asp^{137} - Ser^{251} / Trp, 1 örnekte Gly^{137} - Leu^{251}, 1 örnekte ise Gly^{137} - Ser^{251} / Trp bulunmuştur (Çizelge 4.2.). Burdur'dan toplanan tüm örnekler diyazinon direnç tip allellerine sahiptir. Hatay ve Osmaniye bölgelerinden çalışılan örneklerin 3'er tanesi diyazinon direnç tip allellerine sahiptir.

Şekil 4.2. Ege ve Akdeniz Bölgelerinden toplanan karasinek örneklerinde tespit edilen *MdαE7* allel frekansları a) Ege Bölgesi'ndeki dağılım b) Akdeniz Bölgesi'ndeki dağılım c) Bu iki bölgenin birleştirilmesinden elde edilen dağılım.

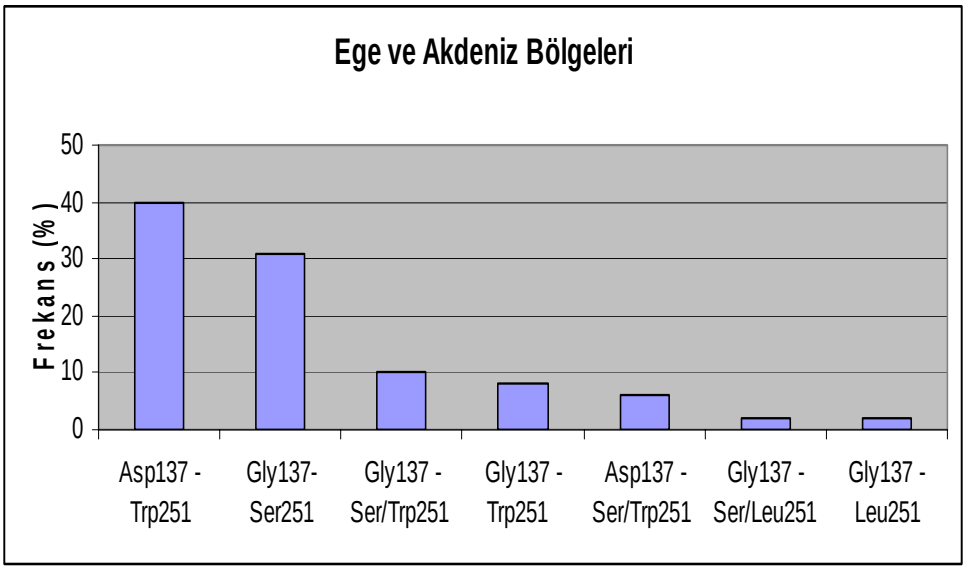
a)



b)

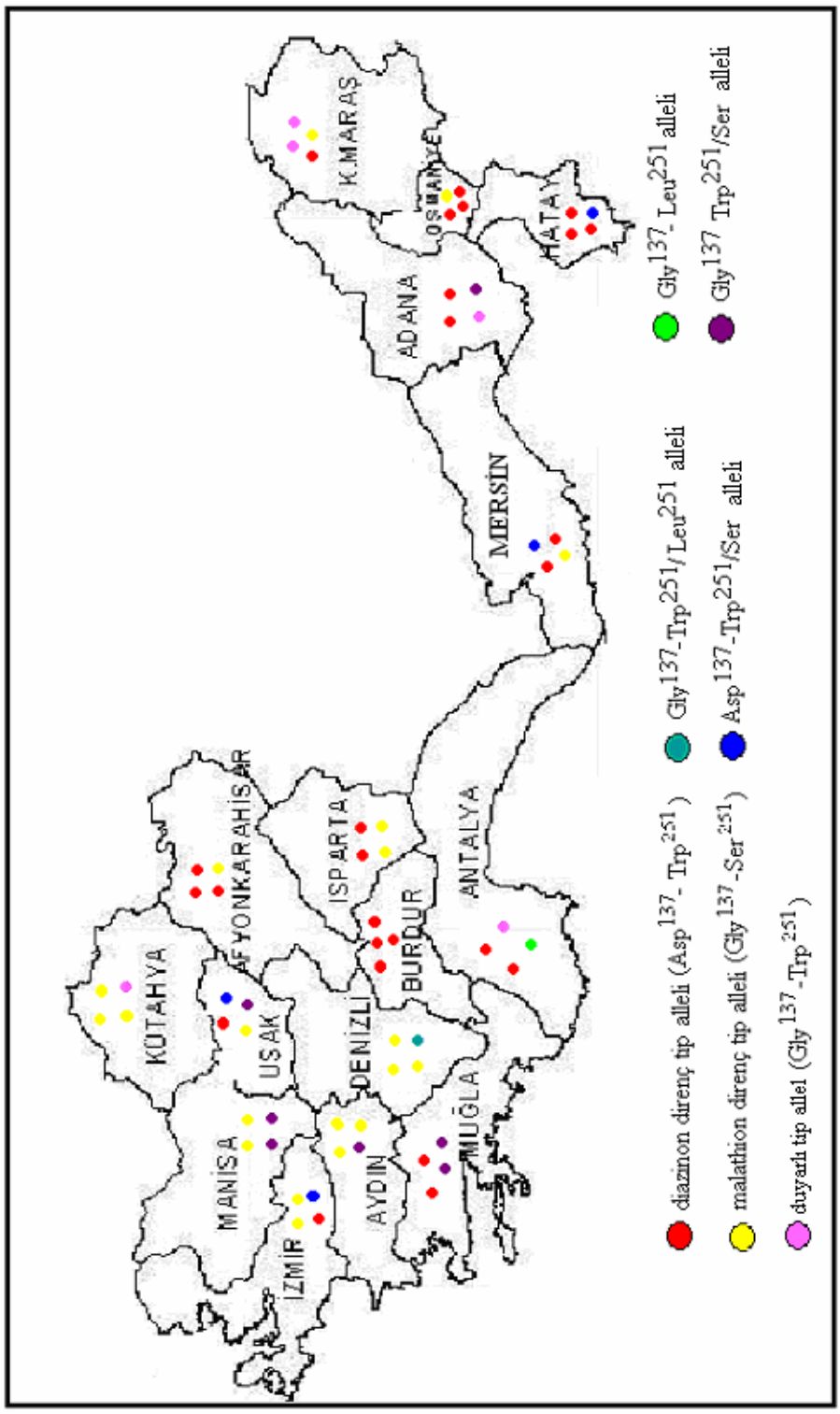


c)

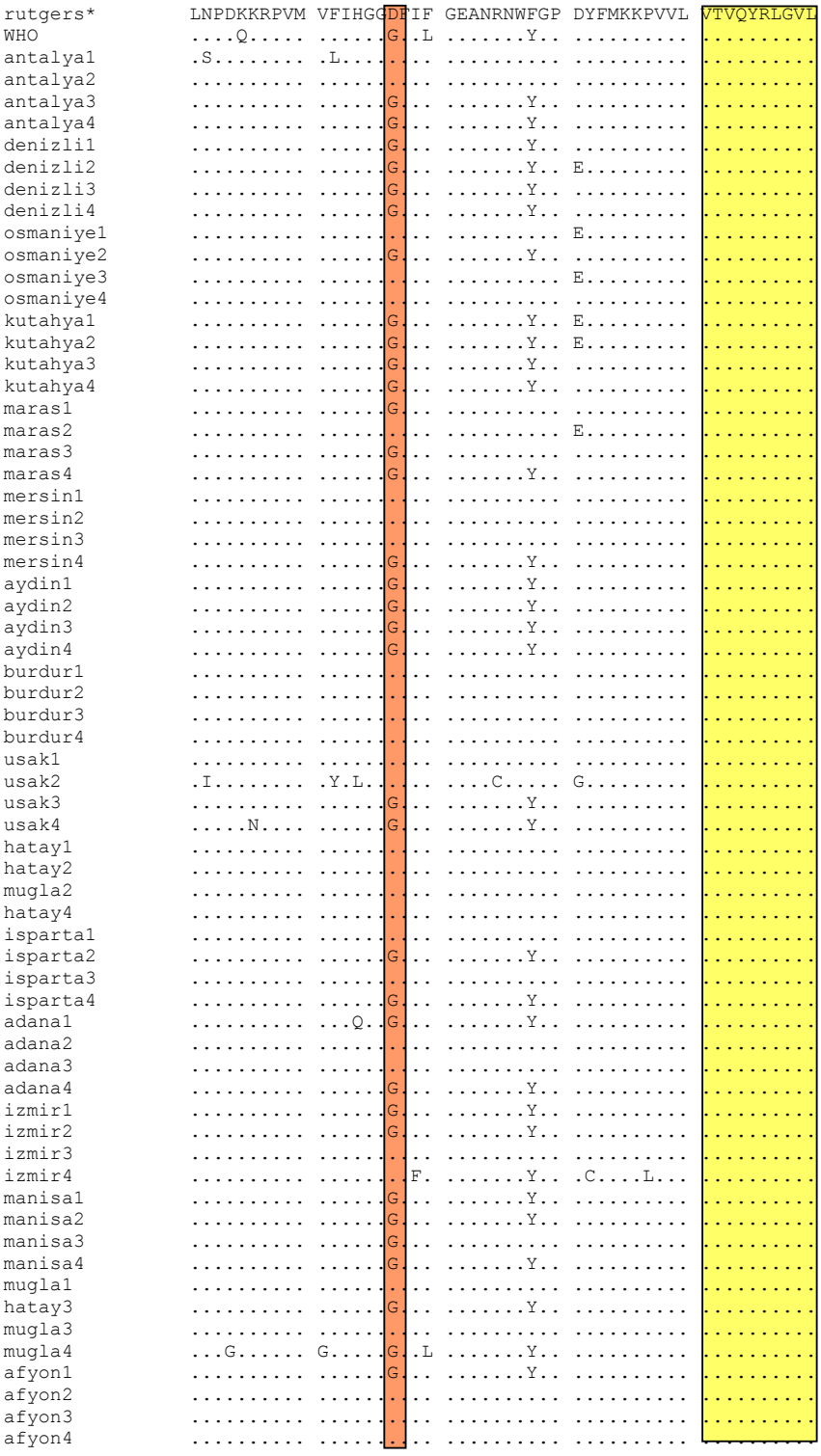


Osmaniye 2 numaralı örnek, Kahramanmaraş 4 numaralı örnek, Mersin 4 numaralı örnek, Isparta 2 ve 4 numaralı örnekler ise malatyon direnç tip allellerine sahiptirler. Bununla birlikte Antalya bölgesinin 4 numaralı örneğinde enzimin 251 numaralı bölgesinde Ser aminoasidiyle yaklaşık aynı büyüklüğe sahip olan Leu aminoasidi bulunmuştur. Mersin 1 numaralı örnek ve Hatay 4 numaralı örnekler de ise Asp^{137} - Ser^{251} / Trp allelleri tespit edilmiştir. Duyarlı laboratuar soyu olan WHO'da ise ilgili enzimde 137 ve 251 numaralı aminoasitler sırasıyla Gly ve Trp'tir. Çalışmamızda, Antalya 3 numaralı örnek, Kahramanmaraş 1 ve 3 numaralı örnekler, Adana 1 numaralı örneği WHO örneğinde olduğu gibi 137 ve 251 numaralı noktalarda Gly ve Trp aminoasitlerine sahiptirler. Adana 4 numaralı örnekte ise Gly^{137} - Ser^{251} / Trp allelleri bulunmuştur (Çizelge 4. 2). Ege ve Akdeniz Bölgeleri'ndeki *MdαE7* allelik dağılımı şekil (4. 3)'de gösterilmiştir.

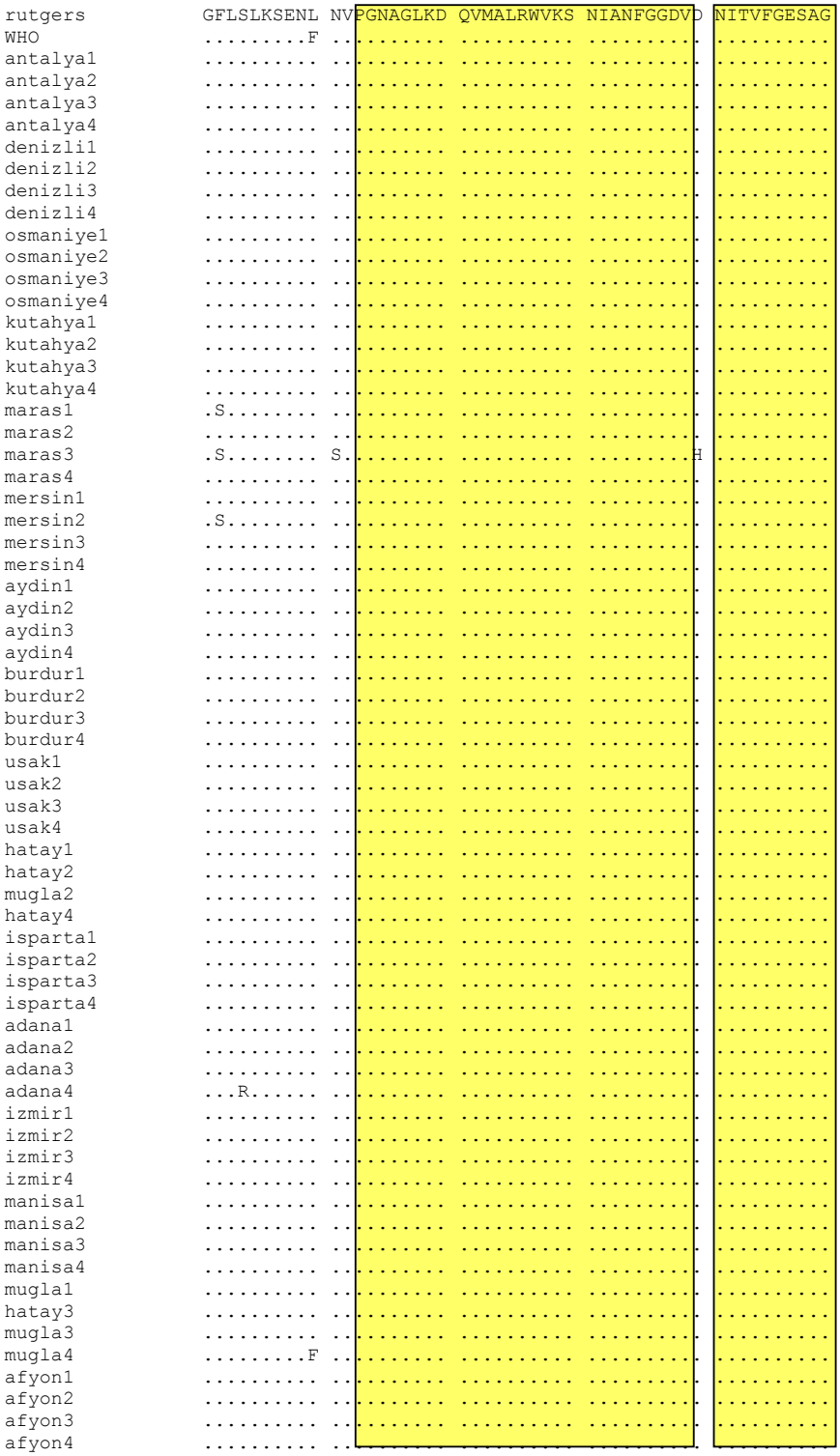
Çalışmamızda baz dizi analizlerini yapmış olduğumuz örneklerden elde edilen aminoasit dizileri (Şekil 4.4.)'te sunulmuştur. Buna göre, elde edilen bölge (121 – 267. aminoasitler arası), karboksil / kolinesterazların, katalitik aktivitesinde önemli rol oynayan, özel bölgelerden biri olan nükleofilik dirsek (nücleophilic elbow) VFGESAG (Şekil 4.3'te, 94 ila 100. aminoasitleri arasında) dizisine sahiptir. Bu dizi içerisinde bulunan 98 numaralı Ser aminoasiti enzimin katalitik üçlüsünden biridir. Şekil 4.4.'te Gly^{16}, Gly^{17} ve Ala^{99} numaralı aminoasitler aynı zamanda enzimin oksianyon boşluğunu (oxyanion hole) oluşturmaktadır ve bütün örneklerde korunmuştur. Baz dizileri bölgesel olarak incelendiğinde ise; 41 - 50, 62 -89 ve 91 - 120 bölgelerinde örneklerimizi diyazinon tipi direnç alleline sahip olan Rutgers soyu ve duyarlı WHO soylarıyla karşılaştırdığımızda herhangi bir aminoasit değişimine rastlanmamıştır. Muhtemeldir ki, bu bölge enzim aktivitesi açısından vazgeçilmezdir. Buna karşın en fazla aminoasit değişimleri, ilginçtir, diagnostik organofosfor direnç mutasyonlarının yer aldığı 137 ve 251 numaralı aminoasit bölgelerinin de içerisinde bulunduğu 11 - 30 ve 121-140 bölgelerinde bulunan aminoasitler arasında meydana gelmiştir.



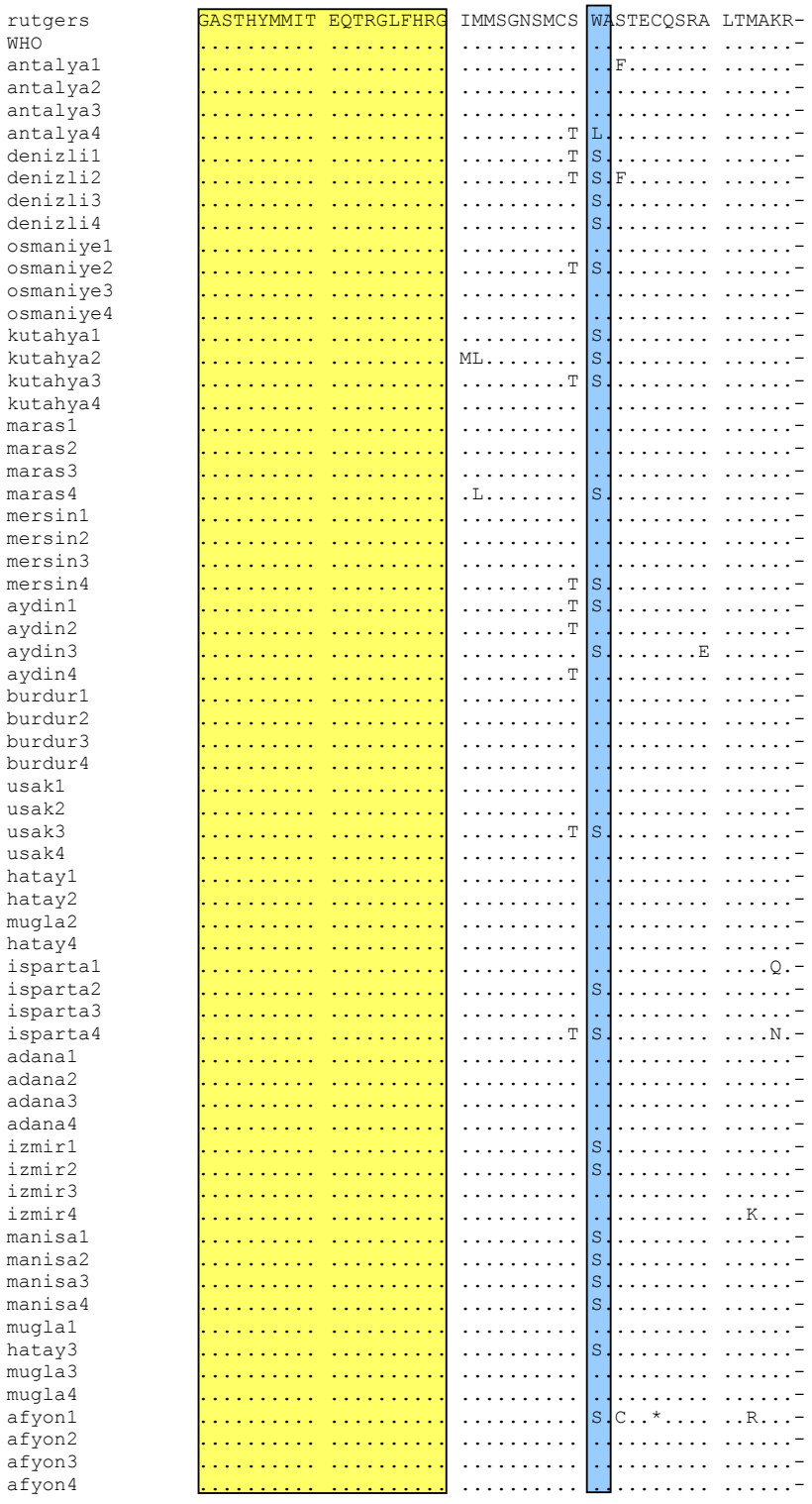
Şekil 4.3. Ege ve Akdeniz Bölgelerindeki *MdαE7* allelik dağılımı.



Şekil 4.4. Baz dizi analizleri yapılan farklı karasinek örneklerinde *αE7* geninden elde edilen aminoasit dizisi. Tipik, diazinon (Gly^{137} → Asp) ve malatyon (Trp^{251} → Ser) direnç mutasyonları sırası ile kırmızı ve mavi, korunmuş bölgeler ise sarı ile gösterilmiştir. *Rutgers baz dizisi Claudianos ve ark. 1998'den alınmıştır.



(Şekil 4.4.'ün devamı)



(Şekil 4.4.'ün devamı)

4.2. Karboksilesteraz Enzim Aktivitesi Sonuçları

Karboksilesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesinde baz dizi analizleri yapılan örnekler kullanılmıştır. Her örnekten 4'er defa alınarak enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Böylelikle her il için 4 farklı aktiviteyle birlikte standart sapma değerleri elde edilmiştir. Karboksilesteraz enzim aktivitesi belirlenirken metilthiobütirat substrat olarak kullanılmıştır. Duyarlı laboratuar soyu ile birlikte toplam 65 aktivite değeri mevcuttur (Çizelge 4.1. ve 4.2.). Bu aktivite değerleri 31,4 ± 3,5 nmol/dk/mg ile 151,3 ± 16,9 nmol/dk/mg arasında değişmektedir. Duyarlı laboratuvar soyu olan WHO'dan elde edilen karboksilesteraz enzim aktivitesi değeri 142,7 ± 4,3 nmol/dk/mg'dır.

Ege bölgesinde Gly^{137} - Ser^{251} alleline sahip olan bireylerde en yüksek aktivite değeri 136,8 ± 36,8 nmol/dk/mg ile Uşak 3 numaralı örnekte ve en düşük aktivite değeri 31,4 ± 3,5 nmol/dk/mg ile Kütahya 2 numaralı örnekte ölçülmüştür. Diyazinon tipi direnç alleline (Asp^{137} – Trp^{251}) sahip olan örneklerde ise aktivite değeri en düşük 77,2 ± 4,6 nmol/dk/mg (Uşak 1 numaralı örnek) ile en yüksek 118,5 ± 22,5 nmol/dk/mg (Afyon 4 numaralı örnek) arasında değişmektedir. Duyarlı tip allele (Gly^{137} - Trp^{251}) sahip olan Kütahya 4 numaralı örnekte ise aktivite değeri 115,9 ± 6,0 nmol/dk/mg olarak bulunmuştur. Asp^{137} - Ser^{251} / Trp allellerini bulunduran Uşak 2 numaralı ve İzmir 4 numaralı örneklerde ise aktivite değerleri sırasıyla 81,7 ± 5,9 nmol/dk/mg ve 77,7 ± 1,1 nmol/dk/mg olarak bulunmuştur. Gly^{137} - Ser^{251} / Trp allellerine sahip olan örneklerde ise aktivite değerleri Uşak 4 numaralı örnekte 47,4 ± 3,8 nmol/dk/mg ile Muğla 4 numaralı örnekte 116,3 ± 8,9 nmol/dk/mg arasında değişmiştir. Gly^{137} - Ser^{251} / Leu alleline sahip olan Denizli 4 numaralı örnekte ise aktivite değeri 101,5 ± 13,8 nmol/dk/mg olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.).

Akdeniz Bölgesinde ise diyazinon direnç allel tipine sahip olan örneklerde karboksilesteraz enzim aktivite değerleri Osmaniye 3 numaralı örnekten elde edilen 33,9 ± 7,1 nmol/min/mg ve Mersin 3 numaralı örnekten elde edilen 109,3 ± 2,2 nmol/min/mg değerleri arasında değişmektedir. Aktif merkezinde Gly^{137}- Ser^{251} aminoasitlerine sahip olan örneklerde ise aktivite değerleri 73,1 ± 12,3 nmol/dk/mg ile Isparta 4 numaralı örnek en düşük, 93,2 ± 11,2 nmol/dk/mg aktivite değeri ile Isparta 2 numaralı örnek en yüksek aktiviteye sahip örnekler olarak bulunmuştur.

Gly^{137}-Trp^{251} aminoasitlerine sahip olan bireylerde ise enzim aktivite değerleri Adana 1 numaralı örnekte 94,6 ± 5,4 nmol/dk/mg ile Kahramanmaraş 3 numaralı örnekte 151,3 ± 16,9 nmol/dk/mg arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Hatay 4 numaralı örnek ve Mersin 1 numaralı örnekte, malatyon ve diyazinona direnç tip allelerinin kombinasyonu olan Asp^{137} - Ser^{251} / Trp allellerine sahip olan, Ali-esteraz enzim aktiviteleri sırasıyla 95,6 ± 6,3 nmol/dk/mg ile 107,7 ± 3,2 nmol/dk/mg'dır. Antalya 4 numaralı örnek enzimin aktif merkezinde Gly^{137}– Leu^{251} bulundurmaktadır ve bu örneğe ait enzim aktivite değeri ise 98,0 ± 23,5 nmol/dk/mg'dır. Gly^{137}-Ser^{251}/ Trp allellerine sahip olan Adana 4 numaralı örnekte ise aktivite değeri ise 90,8 ± 4,2 nmol/dk/mg'dır (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.1. Ege Bölgesinde çalışılan örneklerde MdαE7'de 137. ve 251. noktalarında gözlemlenen aminoasit değişimleri ve bu örneklerdeki karboksilesteraz enzim aktiviteleri.

Iller ve örnek no	**137. aa**	**251. aa**	**K.E. Aktivitesi (nmol/min/mg)**	**Standart sapma**
Denizli				
1	Gly	Ser	114,2	5,4
2	Gly	Ser	68,7	5
3	Gly	Ser	81,2	20,6
4	Gly	Ser/Leu	101,5	13,8
Kütahya				
1	Gly	Ser	53,9	3
2	Gly	Ser	31,4	3,5
3	Gly	Ser	62,6	3,5
4	Gly	Trp	115,9	6
Aydin				
1	Gly	Ser	88,5	5,3
2	Gly	Ser	97,7	3,1
3	Gly	Ser	88,8	17
4	Gly	Trp/Ser	83,5	24
Usak				
1	Asp	Trp	77,2	4,6
2	Asp	Ser/Trp	81,7	5,9
3	Gly	Ser	136,8	36,8
4	Gly	Ser/Trp	47,4	3,8
Izmir				
1	Gly	Ser	63,6	12,9
2	Gly	Ser	95,2	4
3	Asp	Trp	104,9	21,4
4	Asp	Ser/Trp	77,7	1,1
Manisa				
1	Gly	Ser	57,6	13,8
2	Gly	Ser/Trp	96,5	12,4
3	Gly	Ser/Trp	72,3	7
4	Gly	Ser	87,3	14,2
Mugla				
1	Asp	Trp	95,6	6,3
2	Gly	Ser/Trp	104,2	3,4
3	Asp	Trp	89,9	6
4	Gly	Ser/Trp	116,3	8,9
Afyon				
1	Gly	Ser	89,8	6
2	Asp	Trp	92,6	3
3	Asp	Trp	86,8	14,2
4	Asp	Trp	118,5	22,3
Who	Gly	Trp	142,7	4,3

Çizelge 4.2. Akdeniz Bölgesinde çalışılan örneklerde MdαE7'de 137. ve 251. noktalarında gözlemlenen aminoasit değişimleri ve bu örneklerdeki karboksilesteraz enzim aktiviteleri

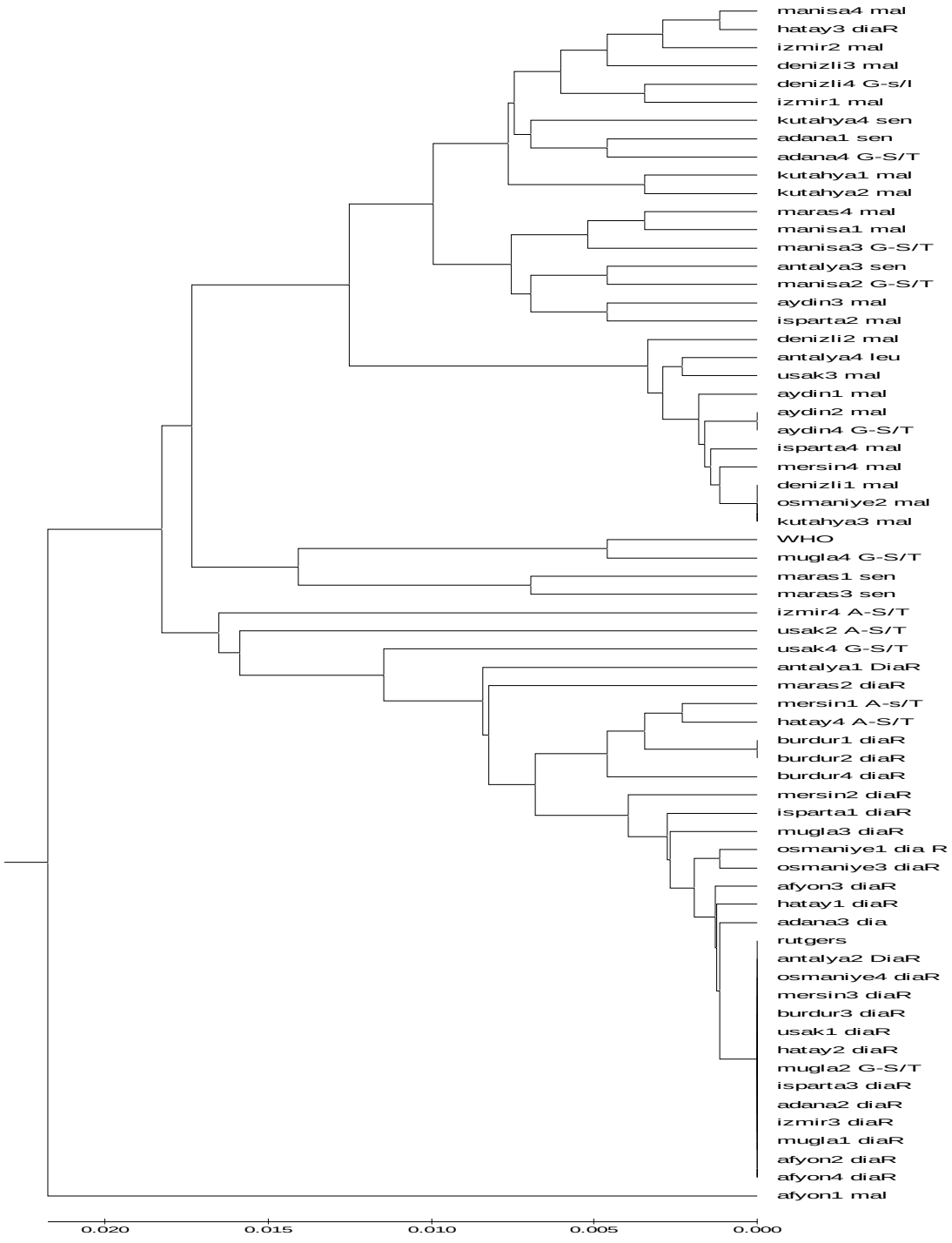
İller ve örnek no	137. aa	251. aa	K.E. Aktivitesi (nmol/min/mg)	Standart sapma
Antalya				
1	Asp	Trp	104,8	4,3
2	Asp	Trp	75,7	8,9
3	Gly	Trp	143,8	41,9
4	Gly	Leu	98	23,5
Osmaniye				
1	Asp	Trp	104,2	4,1
2	Gly	Ser	76,8	4,6
3	Asp	Trp	33,9	7,1
4	Asp	Trp	57,9	14,9
K. Maraş				
1	Gly	Trp	106	20,5
2	Asp	Trp	70,3	5,1
3	Gly	Trp	151,3	16,9
4	Gly	Ser	75	5,3
Mersin				
1	Asp	Ser/Trp	107,7	3,2
2	Asp	Trp	96	14
3	Asp	Trp	109,3	2,2
4	Gly	Ser	88,5	5,3
Burdur				
1	Asp	Trp	68,9	1,4
2	Asp	Trp	63,3	4,6
3	Asp	Trp	56,2	7,5
4	Asp	Trp	53,7	3,5
Hatay				
1	Asp	Trp	54,2	3,4
2	Asp	Trp	89,6	6,8
3	Asp	Trp	91,2	8,7
4	Asp	Ser/Trp	95,6	6,3
Isparta				
1	Asp	Trp	77,9	20,2
2	Gly	Ser	93,2	11,2
3	Asp	Trp	82,4	9,8
4	Gly	Ser	73,1	12,3
Adana				
1	Gly	Trp	94,6	5,4
2	Asp	Trp	63,3	5,8
3	Asp	Trp	82,1	2,1
4	Gly	Ser/Trp	90,8	4,2

Çalışmamızda kısmi baz dizi analizini yapmış olduğumuz 16 ile ait 64 örnek, kontrol grubu olarak WHO duyarlı laboratuar soyu ile birlikte diyazinon tipi direnç alleline sahip Rutgers'a (Claudianos ve ark., 1998'den alınmıştır) ait nükleotid dizileri, alleller arasındaki ilişkiyi daha detaylı bir şekilde anlayabilmek amacı ile filogenetik analizler de (UPGMA, Unweigthed Pair Group Method of Aritmetic Averages, ve Minimum evolution) kullanılmıştır.

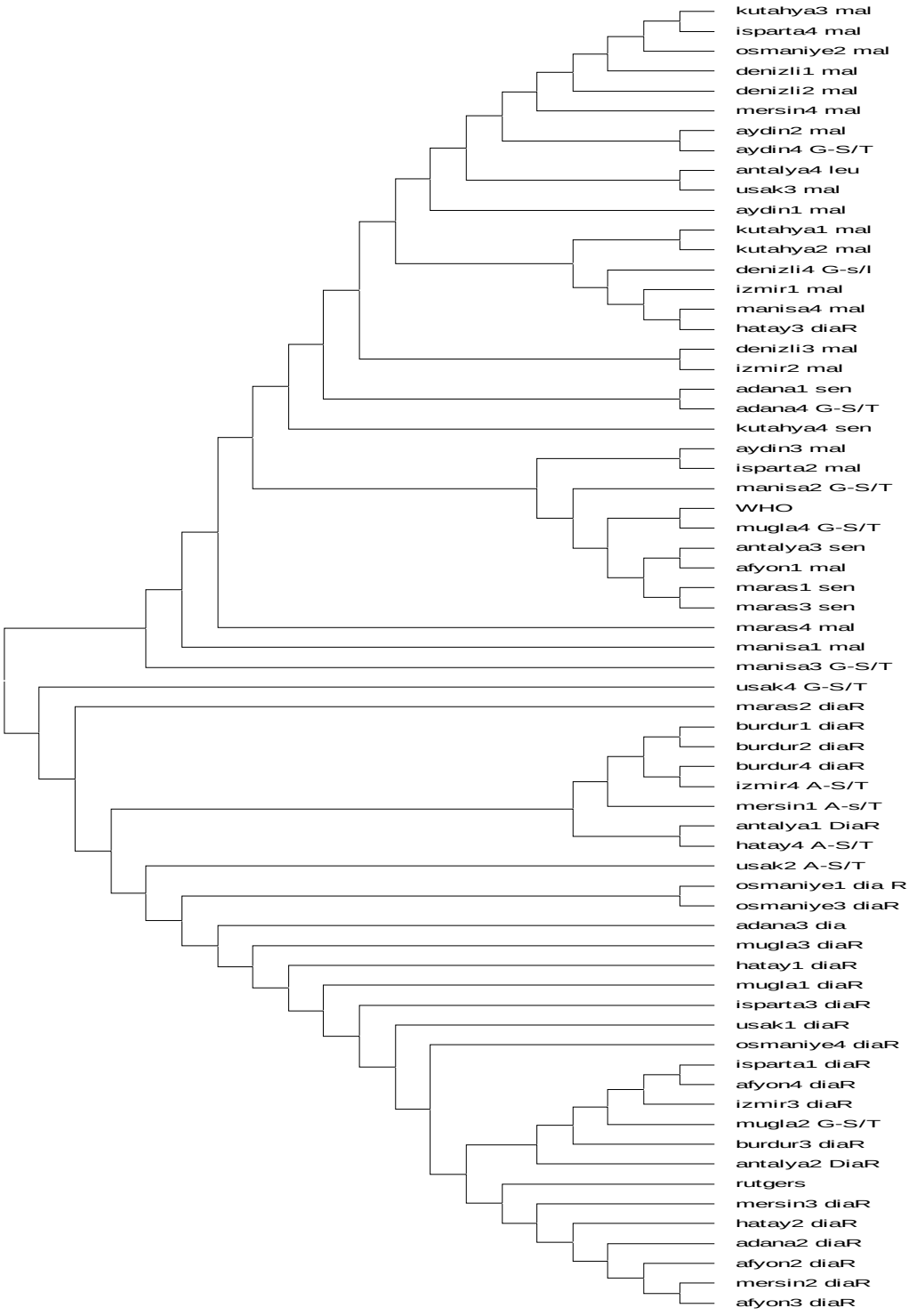
Şekil 4.5.'de DNA dizileri aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup olarak da bilinen UPGMA (Unweigthed Pair Group Method of Aritmetic Averages) ile analiz edilerek temel filogenetik gruplar oluşturulmuştur. Afyon iline ait 1 numaralı örnek ayrı bir kolda yer alırken geriye kalan tüm örnekler diğer grupta toplanmaktadır. Bu 2. grupta kendi arasında iki kola ayrılarak üst kol malatyona dirençli örnekler ve duyarlı referans soyu olan WHO ile aynı allelere sahip olan örnekleri içerirken, alt kol ise diyazinona dirençli bireylerle Asp^{137}- Ser / Trp^{251} allelerine sahip bireyleri kapsamaktadır.

Neighbor Joining filogenetik analizi (Şekil 4.6.) ve Minimum evolution filogenetik analizinden (Şekil 4.7.) elde edilen veriler benzerlik göstermektedir. Her iki filogenetik ağaçta da malatyona dirençli bireylerin üst kısımda, diyazinona dirençli bireylerin ise ağacın alt kısmında toplandığı görülmektedir. Duyarlı allelere sahip olan örnekler, UPGMA analizinden elde edilen sonuçlara paralel olarak, malatyon tipi dirence sahip bireylerin bulunduğu gruba dahil olmuştur.

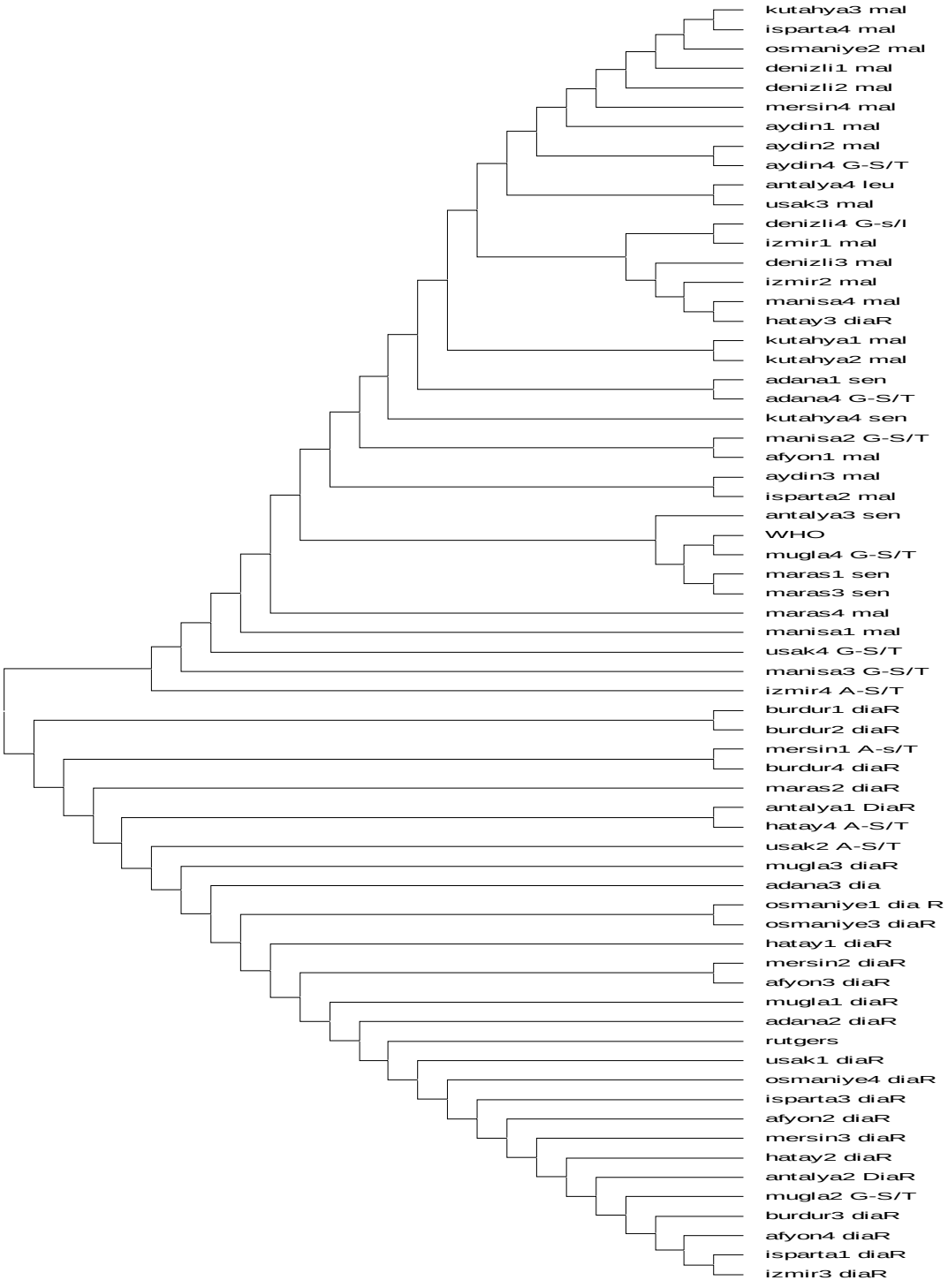
3 farklı analizde de ortak nokta, malatyon direnç tip alleline sahip olan örneklerin, duyarlı allelere sahip olan örneklerle birlikte gruplanması, diyazinon direnç tip allelerine sahip olan örneklerin ise ayrı kolda bir arada bulunmasıdır.



Şekil 4.5. Baz dizi analizi yapılan bireylerin UPGMA analizi ile değerlendirilmesi (mal: malathion direnç tipi alleli; diaR: diazinon direnç tipi alleli; sen: duyarlı allel; A-S/T: Asp^{137}- Ser / Trp^{251} allel; G-S/T: Gly^{137}- Ser^{251} / Trp alleli; Leu : Gly^{137}–Leu^{251} alleli)



Şekil 4.6. Baz dizi analizi yapılan bireylerin Neighbour joining analizi ile değerlendirilmesi



Şekil 4.7. Baz dizi analizi yapılan bireylerin minimum evolution analizi ile değerlendirilmesi

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Ülkemizde tarım alanında bilinçsizce ve yoğun olarak kullanılan insektisitler ciddi çevresel ve ekolojik zararlara yol açmaktadır. Bu oluşan zararların en önemli sonuçlarından biri, doğada birçok böcek türünün bir veya birden çok insektisit grubuna karşı direnç geliştirmesidir. Bu nedenle, doğal populasyonlardaki direnç seviyesinin belirlenmesi, yeni geliştirilecek ilaçlama politikaları için bir zorunluluktur. Ülkemizde, doğadan toplanan sınırlı sayıda karasinek populasyonlarının, bioassay yöntemi kullanarak, değişik grup insektisitlere karşı direnç seviyeleri belirlenmiştir (Taylor 1982; Şişli ve ark., 1983, 1984; Akıner ve Çağlar 2006). Bu çalışmada, Ege ve Akdeniz Bölgesinden toplamış olduğumuz karasinek örneklerinde *MdαE7* geninin kısmi baz dizi analizi yapılmış ve bu örneklerdeki karboksilesteraz enzim aktivitesi ölçülmüştür.

Bazı böcek türlerinde organofosfat insektisit direnç mekanizmaları moleküler düzeyde detaylı olarak aydınlatılmıştır. Diyazinona dirençli *L. cuprina* soylarında, karasinekteki *MdαE7*'nin homoloğu olan, *LcαE7* geninin baz dizi analizi yapılmış ve enzimin aktif merkezinde $Gly^{137}\rightarrow$ Asp mutasyonu, malatyona dirençli soylarında ise yine enzimin aktif merkezinde $Trp^{251}\rightarrow$ Leu değişikliği tespit edilmiştir (Newcomb ve ark., 1997). Malatyona dirençli *Anisopteromalus calandrae* soylarında, *LcαE7'*nin homoloğu olan genin ürününde, $Trp^{220}\rightarrow$ Gly değişikliği belirlenmiş, ve bu değişikliğin *L. cuprina*'da bulunan $Trp^{251}\rightarrow$ Leu değişikliğine benzer olduğu ve organizmadaki yüksek organofosfat hidrolaz aktivitesine yol açtığı öne sürülmüştür (Zhu ve ark., 1999). Buna karşın, esteraz gen ailesi bakımından *L. cuprina* ve *M. domestica* ile yakın akrabalık gösteren *Drosophila melanogaster*'de diyazinon direncinde DmαE7'nin bir görevi olmadığı düşünülmektedir (Newcomb ve ark., 2005).

M. domestica ve *L. cuprina*'da organofosfat insektisitlere karşı direnç kazanılması, yukarıda da belirtildiği üzere, bir karboksilesteraz enziminde (αE7) meydana gelen mutasyonlar sonucunda enzimin bu aktivitesini azaltarak organofosfat hidrolaz ve malatyon karboksilesteraz aktivitesi kazanması temelinde gerçekleşir. Organizma böylelikle stres faktörünün bulunduğu ortamda hayatta kalma şansı elde etmektedir, fakat enzimde meydana gelen bu aktivite kaybı organizmaya stres faktörünün bulunmadığı ortamda bir yaşam maliyeti (fitness cost) yüklenmesine

neden olur. Avustralya ve Yeni Zelanda'da doğal ortamdan toplanan *L. cuprina* popülasyonlarında bu maliyetin azalmasını (nötralize edilmesini) sağlayan tamamlayıcı (modifier) gen tanımlanmıştır. Böylelikle, direnç allelerine sahip bireylerin doğada yaygın hale gelmesi mümkün olmaktadır (Clarke ve McKenzie, 1987; McKenzie ve Game, 1987; McKenzie ve ark., 1992; McKenzie, 1993; 1994). Avustralya'da yapılan bir çalışmada, laboratuar ortamında korunan 22 izogenik *L. cuprina* soyundan 18 tanesinin (% 82) Asp^{137}, % 4'ünün Leu^{251}, % 14'ünün ise duyarlı alleli taşıdığı belirtilmiştir (Newcomb ve ark., 2005). Çalışmamız sonucunda doğada bulunan direnç allelerinin frekansının % 80'in üzerinde olduğu belirlenmiştir, her ne kadar karasinek soyları için tamamlayıcı gen henüz net olarak tanımlanamamış olsa da sonuçlarımız doğadaki bu yaygın durumun gelişmesini sağlayan tamamlayıcı gen(ler)'in olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda duyarlı allelere sahip örneklerin (Gly^{137} - Trp^{251}) tüm populasyondaki oranının yaklaşık % 8 gibi düşük bir oran olduğu (5 / 64) gözlenmiştir. Newcomb ve ark., (2005) *L. cuprina,* Claudianos (1999) ise *M. domestica* soylarını kullanarak yaptıkları bir çalışmada Avustralya'da duyarlı örneklerin ve populasyonda bulunan değişik haplotip sayısının, bu gen açısından, bundan yaklaşık 20 - 40 yıl öncesinde daha yaygın olduğunu gözlemlemişler ve günümüze kadar meydana gelen bu azalmanın nedenini ise, muhtemelen, son yarım asırda doğada insektisite dayalı yoğun seçilim (selective sweep) modeli ile meydana geldiğini belirtmişlerdir. Kısaca bu modelin üç temel varsayımı bulunmaktadır bunlar; a) seçilim baskısının bir gen üzerinde yoğunlaşması, b) seçilim baskısından önce populasyondaki allelik varyasyonun yeterince büyük olması ve c) bu baskı ortadan kalktıktan sonra populasyonda bulunan allelik varyasyonun azalmasıdır (Brownlie, 1996). Karasinek ve koyun etsineğinde yoğun insektisit baskısına rağmen αE7 temelinde gelişen insektisit direncinin sadece iki farklı allel tarafından gerçekleştirilebilir olması (kromozomun o bölgesinin başka stres faktörleri altında olmadığı varsayılmaktadır) ve duyarlı allelerin frekansının çok düşük olması doğadaki seçilimin bu model ile gerçekleştiğini göstermektedir. Çalışmamızda, duyarlı allel tipinin düşük frekansta gözlemlemesinin muhtemel nedeni ise doğada bulunan bu yoğun seçilimdir.

Claudianos (1999) ve Taşkın (2002)'ın yapmış oldukları benzer çalışmalarda dünya genelinde, diyazinon direnç tip alleli olan, Rutgers allelinin diğer allelerle karşılaştırıldığında, çok daha yüksek bir oranda bulunduğunu, duyarlı allelerin ise çok düşük frekanslara sahip olduklarını, buna karşın malatyon direnç allelerinin ise bölgesel ve spesifik malatyon kullanımı sonucu gelişmiş olabileceğini belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmasında Claudianos, insektisitlerin populasyonlara ilk uygulanmaya başlanması ile birlikte direnç açısından öncü allelerin "Pioneer alleles" seçilmeye başlandığını daha sonra bu allelerin yerlerini süper allelere (Rutgers gibi) bıraktığını ve bununda zamanla *MdαE7*'de meydana gelebilecek varyasyonları çok sınırlayacağını öne sürmüştür. Çalışmamızda, ülkemizin bu iki bölgesinde diyazinon direnç tipi alleler yaklaşık % 40 frekansa, malatyon direnç tipi allellerin 31 % frekansa, duyarlı kontrol soyu olan WHO tipi allellerin ise toplam frekansın % 8'ini oluşturduğu bulunmuştur. Sonuçlarımızdaki frekans dağılımına bakıldığında Rutgers'ın, Claudianos'un öne sürdüğü gibi, süper allel olmadığını ve elde edilen diğer allellerin frekansınında düşünüldüğünde doğal popülasyonlar da bu gen açısından varyasyonun halen yüksek olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, sonuçlarımızda malatyon direnç allelerinin frekansının yüksek ve dağılımının da yaygın olduğu görülmektedir, yukarıda belirtildiği gibi malatyon direnç allelerinin bölgesel ve spesifik malatyon kullanımı sonucu gelişmiş olabileceği hipotezi daha fazla örnek kullanarak test edilmelidir.

Her iki bölgeden, toplam 7 örnekte Gly^{137} - Ser^{251} / Trp, 4 örnekte Asp^{137} - Ser^{251} / Trp, 1 örnekte ise Gly^{137} - Ser^{251} / Leu alleleri gözlemlenmiştir. Laboratuarımızdaki kısıtlı imkanlar nedeniyle bu örneklerde *MdαE7* geni açısından bir duplikasyonun olup olmadığını anlayabilmek amacıyla southern blot analizleri yapılamamıştır. Bundan dolayı yukarıda belirtilen örneklerde ki durumun bir duplikasyon sonucu mu yoksa ilgili gen açısından heterozigot bir durumun varlığından mı kaynaklandığı net değildir. Fakat her iki durum için de, organizmaların özellikle Asp^{137} - Ser^{251} / Trp ve Gly^{137} - Ser^{251} / Leu allelerine sahip olduğu ve her iki allelinde eşit oranda ekspres edildiği varsayıldığında bu organizmada organofosfat hidroliz aktivitesinin iki katına çıkması demektir ki bu durum "süper dirençli" organizmaların gelişmesi anlamına gelmektedir (Campbell ve ark., 1998). Bununla birlikte, Gly^{137} - Ser^{251} / Trp genotipine sahip bireylerde ise organizmanın duyarlı bir allele sahip olması onun

bulunduğu ortamdaki yaşam maliyetini (fitness cost) düşürmesi açısından önemlidir (Newcomb ve ark., 2005). Daha önceki bölümlerde, *M. persiace, C. quinquefasciatus, C. pipiens* ve *N. lugens*'de olduğu gibi spesifik bir karboksilesteraz geninin genom içerisindeki kopya sayısının artırılması ile üretilen enzim miktarının da artışı sağlandığı ve bu yolla organizmanın direnç geliştirdiği belirtilmiştir (Hemingway, 2000; Newcomb ve ark. 1996, 1997; Guerro, 2000; Devonshire ve Field, 1991). Örneklerimizde yapılacak olan daha ileri çalışmalarla karasinek için de böyle bir mekanizmanın evrimleşmekte olup olmadığı hakkında daha detaylı bilgi sahibi olunabilir.

Herhangi bir direnç allelinin dünyanın bir bölgesinde uygulanan stres altında seçildikten sonra mı diğer bölgelere yayıldığı yoksa bu direnç allelerinin dünyanın değişik bölgelerinde yakın zamanlarda birbirinden bağımsız olarak mı seçildiği direnç evriminin anlaşılmasında önemli bir problem olarak karşımızda durmaktadır. Antalya 4 numaralı örnekte enzimin aktif merkezinde Gly^{137} - Leu^{251} bulunmuştur. Daha önce Uruguay ve Yeni Zelanda'dan toplanan 2 karasinek örneğinde de MdαE7 enziminin aktif merkezinde bu değişimlerin bulunduğu rapor edilmiştir (Claudianos, 2001, Taşkın 2002). Denizli 4 numaralı örnekte ise Gly^{137} – Ser^{251} / Leu allellinin (heterozigot veya bir duplikasyonun parçası olarak) bulunması, Antalya ve Denizli illerinin coğrafik yakınlığı göz önünde bulundurulduğunda bu tip allelin ülkemizde sadece bu bölgeler ile sınırlı olabileceği düşünülebilir. Bu durum, muhtemelen, direnç evriminde yakın zamanlarda bağımsız bir seçilimin olabileceğine işaret etmektedir.

Türkiye'deki direnç allel frekans farklılığının, dünyanın diğer bölgeleriyle özellikle Avustralya ve Yeni Zelanda ile karşılaştırıldığında, en önemli nedeni muhtemeldir ki ülkemizin Asya, Avrupa ve Ortadoğu bölgeleri arasında bir geçiş ve göç yolu olmasının yanı sıra bilinçsizce ve kontrolsüzce kullanılan insektisit miktarının fazla olmasındandır. Burada diğer önemli bir nokta ise, geçmişte bu bölgeler arasındaki allel havuzlarının (alelic background) farklı sayıda allel kapsıyor olabilme ihtimalinin varlığıdır.

Çalışmamız sonucunda gözlemlediğimiz direnç allelerinin coğrafik dağılımına bakıldığında ise net bir izolasyon görülmemektedir, bütün alleler her iki bölgede de gözlemlenmiştir. Bu durum bize ülkemizdeki karasinek populasyonları arasında bir

gen akışının varlığına işaret etmektedir. Bunda karasineklerin birçok ulaşım yolu ile (karayolu, havayolu, denizyolu vb) uzak mesafelere insanlar tarafından istem dışı olarak taşınmasının da rolü olduğu kesindir.

Yoğun bir seleksiyon baskısı altında bulunan bir lokusta, lokus içi veya lokus yakın çevresindeki varyasyon seçilim ilerledikçe azalma eğilimi göstermektedir ki bu durum ayrılmama etkisi "Hitchhiking effect" olarak tanımlanır. Karasinekte *MdαE7* lokusunda veya yakın çevresinde (α-esteraz cluster) de böyle bir etkinin olup olmadığının anlaşılması direnç evriminin daha geniş bir perspektiften anlaşılması için gereklidir. Örneklerimizden elde edilen baz dizilerinin bu yönde değerlendirilmesi de bu konu hakkında daha fazla bilgi edinilmesi için önemlidir.

Değişik konsantrasyonlarda malatyon ve diyazinona dirençli soylar kullanılarak Newcomb ve ark., (2005) *L. cuprina*'da, Claudianos (1999) ise *M. domestica'*da *αE7* geni için filogenetik analizler yapmışlardır. Her iki organizma içinde malatyon direnç allelinin duyarlı allelden evrimleştiğini fakat diyazinon direnç allelinin ise, muhtemelen, duyarlı allel ile birlikte geçmişte de var olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu konuda net bir yargıya varabilmek için insektaryumlardaki eski yıllarda iğneleme yöntemi ile saklanan örneklerden daha fazla analizler yapılması gereklidir. Çalışmamızda incelediğimiz örneklere ait baz dizilerini MEGA 4.0 programına yükleyerek filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur, Şekil 4.5., 4.6. ve 4.7.'de görüldüğü üzere genel olarak malatyon tipi dirence sahip örnekler WHO ve diğer duyarlı örneklerle bir arada diyazinon tipi dirence sahip örnekler ise ayrı bir kolda toplanmıştır. Sonuçlarımız bu açıdan Claudianos (1999) ve Newcomb ve ark., (2005) tarafından öne sürülen teoriyi destekler niteliktedir. Bununla birlikte, Gly^{137} - Ser^{251} / Trp, ve Gly^{137} - Ser^{251} / Leu alleleri malatyon direnç tipi alleler ile birlikte gruplanmış, Asp^{137} - Ser^{251} / Trp allelleri ise diyazinon direnç tipi alleleri ile birlikte gruplanmıştır. Doğada bulunan Asp^{137} - Ser^{251} / Trp allellinin diyazinon direnç allelinden mi yoksa duyarlı allellerden mi evrimleşerek geliştiğinin anlaşılabilmesi için bu örneklerdeki ilgili genin tamamının baz dizi analizinin ve southern analizlerinin birlikte yapılması ile mümkün olabilir. Bu durum direnç gelişim evrimi açısından çok önemlidir, Brownlie (1996) doğada bulunan direnç allelerinin, duyarlı allelerden gelişebileceğini belirtmiştir. Asp^{137} - Ser^{251} / Trp alleli için gerek bir

duplikasyonun varlığı ve gerekse de ilgili gen için heterozigot bir durumun varlığı karasinek için literatürde bir ilktir.

Örneklerimizdeki karboksilesteraz enzim aktivitesi metiltiyobütrat subsrat olarak kullanılarak ölçülmüştür. Böylelikle enzimin aktif merkezinde meydana gelen aminoasit değişikliklerinin enzim aktivitesini nasıl etkilediği de gözlemlenmiştir. Parathion / diyazinon, ve malatyona dirençli *L. cuprina* soylarında LcαE7'nin mutasyonlar sonucu, gerek organofosfat hidrolaz ve gerekse malatyon karboksilesteraz enzim aktivitesinin nasıl değiştiği yapay (artificial) substratlar kullanılarak detaylı olarak açıklanmıştır (Campbell ve ark., 1997; 1998). Çalışmamız sonucunda, malatyon ve diyazinon direnç tip allellerine sahip olan örneklerde duyarlı WHO soyu ile karşılaştırıldığı zaman enzim aktivitesinin düşük bulunduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra enzimin aktif merkezinde Leu^{251} taşıyan örneklerinde de enzim aktivitesi kontrol soy ile karşılaştırıldığında düşüktür. Dirençli allelere sahip örneklerdeki spesifik alifatik-esteraz aktivite düşüklüğünün, muhtemelen, nedeni daha önce "mutant ali esteraz hipotezi " başlığı altında açıklandığı gibi enzimin aktif merkezinde meydana gelen aminoasit değişimlerinin aktif merkezde yaratmış olduğu değişimlerin bir sonucudur. Çalışmamızda kullandığımız duyarlı soy WHO örneğinde Gly^{137} - Trp^{251} bulunmuştur. Bunun yansıra doğadan topladığımız örneklerde Antalya 3, Kahramanmaraş 1 ve 3, Adana 1 ve Kütahya 4 numaralı örneklerde enzimin aynı noktalarında aynı aminoasit değişimleri gözlemlenmiştir. Bu örneklerin ikisinde (Antalya 3 ve Kahramanmaraş 3 numaralı örnekler) elde ettiğimiz aktivite değerleri sırasıyla 143,8 ± 41,9 nmol/dk/mg ve 151,3 ± 16,9 nmol/dk/mg'dır. Bu sonuçlar duyarlı soydan elde etmiş olduğumuz karboksilesteraz enzim aktivitesine yakın değerlerdir. Buna karşın diğer 3 örnekte ise kontrol soyuna göre düşük aktivite tespit edilmiştir. Bununla birlikte aynı direnç allelerine sahip diğer örneklerde gözlemlenen karboksilesteraz enzim aktivite farklılıkları, muhtemelen, enzimin aktif merkezinin dışında bulunan bölgelerde, örneklerimizde baz dizi analizi yapılmayan bölgelerde, meydana gelen mutasyonların enzimin aktif merkezinin üç boyutlu konfigürasyonunu, diğer bir deyişle proteinin katlanmasını, etkilemesinin sonucudur. Bu nedenle *MdαE7* geninin baştan sona baz dizi analizinin yapılması bu örneklerdeki düşük aktivite değerlerinin açıklanabilmesi için gereklidir.

Populasyonlarda gelişen direncin evrimsel mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için, organizma seviyesinde gerçekleşen birbiri ile bağlantılı kompleks direnç mekanizmalarının daha net olarak aydınlatılması gereklidir. Plapp (1984) yaptığı çalışmasında, karasinekte, belki diğer böcek türlerinde de, II. Kromozom üzerinde bulunan bir gen ürünün metabolik dirençte önemli rol oynayan diğer enzimlerin koordineli bir şekilde ekspresyonunu yönlendirdiğini ileri sürmüştür. Feyereisen (1999) ise, GST genlerinden *MdGST-1* ve *MdGST-3*'ün ve diğer P450 genlerinin koordineli şekilde bir genin ürünü tarafından regüle edilebileceğini öne sürmüştür. Haritalama çalışmaları sonucunda bu genin karasinekte II. kromozom üzerinde bulunan diyazinon direncini sağlayan *MdαE7* lokusunun ürünü olabileceğini belirtmiştir. Geleceğe yönelik olarak, yukarıda da verilen populasyon seviyesindeki önerilerin yanı sıra direnç gelişiminin organizma seviyesindeki koordinasyonu da araştırmaya açıktır.

Gerçekleştirilen bu çalışmada, model organizma olarak doğadan toplanan *M. domestica* populasyonları kullanılmış ve ülkemizde tarımın en yoğun olarak yapıldığı Ege ve Akdeniz bölgelerindeki insektisit direnç allelerinin dağılımı belirlenmiştir. Ege Bölgesinde, muhtemelen, bugüne kadar yoğun malatyon (veya benzer etki gösteren başka bir organofosfat) insektisiti kullanımına bağlı olarak gelişen yüksek bir malatyon tip direnç allel frekansı tespit edilmiştir. Akdeniz bölgesinde ise diyazinon (veya benzer etki gösteren başka bir organofosfat) insektisiti kullanımına bağlı olan yüksek frekansta diyazinon tip direnç allelinin varlığı tespit edilmiştir. Bu durumun, büyük ihtimalle, diğer zararlı böcek populasyonları için de aynı olduğunu düşünülmektedir. Bu iki bölgemizdeki ilaçlama politikaları tekrar gözden geçirilmeli ve zararlılarla mücadeleye farklı grup insektisitler düşük dozlarda uygulanarak tekrar başlanmalıdır. Bunların yanı sıra doğal karasinek populasyonlarında daha önce *MdαE7* geni için rapor edilmemiş yeni allel (veya duplikasyonlar) kombinasyonları tespit edilmiş olması, ülkemizde, organofosfat insektisit direncinde önemli bir rol oynayan, *MdαE7* geni için zengin bir allel havuzu olduğuna işaret etmektedir.

KAYNAKLAR:

Akıner, M..M., 2003. Karasinek, *Musca domestica* L. (Diptera : muscidae)'da insektisitlere karşı direnç düzeyinin tespiti ve alana özgü direnç yönetimi.,yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Akıner, M.. M.. ve Çağlar, S. S. ,2006. The status and seasonal changes of organophosphate and pyrethroid resistance in Turkish populations of the house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), Department of Biology, Faculty of Science, Hacettepe University 06800 Beytepe-Ankara-Turkey.

Ay, R. ve Sökeli, E., 2005, Böceklerde direnç yönetimi,Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 9-1,1-4.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

Brownlie, J. 1996. The evolution of diazinon resistance alleles, and their impact on the genetic diversity of the a-esterase cluster of the common house fly, *Musca domestica.* Honours thesis. Australian National University. Canberra, Australia.

Campbell, P. M., Trott, J. F., Claudianos, C, Smyth, K. A., Russell, R. J., Oakeshott, J. G. 1997. Biochemistry of esterases associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina* with comparisons to putative orthologues in other Diptera. Biochemical Genetics. 35. 17-40.

Campbell, P. M., Newcomb, R. D.5 Russell, R. J., Oakeshott, J. G. 1998a. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina.* Insect Biochemistry and Molecular Biology. 28.139-150.

Campbell, P. M., Yen, J. L., Masoumi, A., Russell, R. J., Batterham, P., McKenzie, J. A., Oakeshott, J. G. 1998b. Cross-resistance patterns among *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) resistant to organophosphorus insecticides. Journal of Economic Entomology. 91(2). 367-375.

Charpentier A. ve Fournier D., 2001, Levels of Total Acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*. Relation to Insecticide Resistance Pesticide Biochemistry and Physiology. 70**,** 100–107.

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 Biochemistry and Molecular Biology. 31:805-816.

Clark, A. G., Shamaan, N. A. 1984. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from thehouse fly is a Gluthation S-transferase. Pesticide Biochemistry and Physiology. 22:249-261.

Clarke, G. M., Mckenzie, J.A. 1987. Developmental stability of insecticide resistant phenotypes in blowfly; a result of canalizing natural selection. Nature. 325: 345-347.

Claudianos, C, Russell, R. J., Oakeshott, J. G. 1999a. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 29: 675-686.

Claudianos, C. 1999b. The evolution of a-esterase mediated organophosphate resistance in *Musca domestica.* PhD. Thesis. The Australian National University. Canberra, Australia.

Claudianos, C, Crone, E. Coppin, C. Russell, R., Oakeshott, J.G. 2002. A genomics perspective on mutant aliesterases and metabolic resistance to organophosphate. Unpublished.

Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A., 2005. Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azaılışı sorunları, Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, 21p.

Devonshire, A. L., Field, L., M. 1991. Gene amplification and insecticide resistance. Annual Review of Entomology. 36: 1-23.

Enayati A. A., Ranson H. , Hemingway J., 2005, Insect glutathione transferases and insecticide resistance, Insect Molecular Biology. 14 (1), 3–8.

Feyereisen, R. 1999. Insect P450 enzymes. Annual Review of Entomology. 44. 507-533.

Gökçimen A., Gülle K., Demirin H. , Bayram D. ,Koçak A.,Altuntaş İ., 2007, Effects of diazinon at different doses on rat liver and pancreas tissues, Pesticide Biochemistry and Physiology. 87 (2007) 103–108.

Guerro, F., H. 2000. Cloning of a horn fly cDNA, *HiaE7,* encoding an esterase whose transcript concentration is elevated in diazinon-resistant flies. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 30. 1107-1115.

Gressel, J., 1986. Genetics, biochemical, and physiological mechanisms of resistance to pesticides. Pesticide Resistance Strategies and Tactics for Management. National Research Council(U.S). National Academy Press Washington, D.C. 45-54 p.

Han Z., Graham D. Moores G.D.,1998. Denholm I., and Devonshire AL. Association between Biochemical Markers and Insecticide Resistance in the Cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover Pestıcıde Bıochemıstry And Physıology. 62, 164–171.

Hemingway, J. 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 30: 1009-1015.

Hemingway, J, 2004. Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H., The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes, Insect Biochemistry and Molecular Biology. 34, 653-665.

Kao, L. R., Motoyama, N., Dauterman, W., C. 1984. Studies on hydrolases in various house fly strains and their role in malathion resistance. Pesticide Biochemistry and Physiology. 22, 86-92.

Keykubat, E., Durmuşoğlu, E., 2005, Emsalden Ruhsatlandırılan Methamidophos'lu Preparatların *Myzus persicae* (Sulzer) (Hom.:Aphididae)'ye Etki Farklarının Laboratuar Koşullarında Araştırılması,Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 2005, 42(2):65-75.

Kiremitçigil, A., 1995. Zararlılarla Savaş. Bakırköy Belediyesi Eğitim ve Kültür Yayınları, 2, İstanbul.

Koçak Ö. , 1998. Zararlı Savaşımı. Hacettepe Üniversitesi Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, İnsektisid Test Üretim Birimi, Ankara.

Kozaki, T., Shono, T., Tomita, T., Kono, Y. 2001. Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the house fly, *Musca domestica* associated with point mutations. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 31: 991-997.

Kristensen M., 2005, Glutathione *S*-Transferase and Insecticide Resistance in Laboratory Strains and Field Populations of *Musca domestica.* Journal Econonomic Entomology. 98(4): 1341-1348.

Lockridge, O., Blong, R. M., Masson, P., Froment, M. T., Millard, C. B., Broomfield, C.A.1997. A single amino acid substitution, Gly-»His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase. Biochemistry. 36: 786-795.

McKenzie, J. A., Game, A. Y. 1987. Diazinon resistance in *Lucilia cuprina:* mapping of fitness modifier. Heredity. 59: 371-381.

McKenzie, J. A., Parker, G. A., Yen, J. L. 1992. Polygenic and single gene responses to selection for resistance to diazinon in *Lucilia cuprina.* Genetics. 130: 613-620.

McKenzie, J., A. 1993. Measuring fitness and intergenic interactions: the evolution of resistance to diazinon in *Lucilia cuprina*. Genetica. 90: 227-237.

McKenzie, J. A. 1994. Selection at the diazinon resistance locus in overwintering populations of *Lucila cuprina* (the Australian sheep blowfly). Heredity. 73:57-64.

McKenzie, J., A. 1996. Ecological and evolutionary aspests of insecticide resistance. Environmental intelligence unit. R. G. Landes / Academic Pres, Austin, Texas, 185p.

Newcomb, R. D., Campbell, P. M., Russell, R. J., Oakeshott, J. G. 1996. cDNA cloning, baculovirus expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus insecticide resistance in *Lucila cuprina.* Insect Biochemistry and Molecular Biology. 27: 15-25.

Newcomb, R. D., Campbell, P. M., Ollis, D. L., Cheah, E., Russell, R. J., Oakeshott, J. G. 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. Proceeding National Academy of Science USA. 94: 7464-7468.

Newcomb R.D., Gleeson D.M., Yong C.G., Russell R. J. , Oakeshott J. G., 2005. Multiple Mutations and Gene Duplications Conferring Organophosphorus Insecticide Resistance Have Been Selected at the Rop-1 Locus of the Sheep Blowfly, Lucilia cuprina. Journal Molecular Evolution. 60:207–220.

Oakeshott, J. G., Van Papenrecht, E. A., Boyce, T. M., Healy, M. J., Russell, R. J. 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. Genetica. 90:239-268.

Plapp, .F.W.Jr., 1984. The genetic basis of insecticide resistance in the housefly: Evidence that a single locus play a major role in metabolic resistance to insecticides. Pesticide Biochemistry and Phsiology. 22,194-201.

Scott, J.G., Zhang, L., 2003. The house fly aliesterase gene (*Md*a*E7*) is not associated with insecticide resistance or P450 expression in three strains of house fly. Insect Biochemistry and Molecular Biology 33 (2003) 139–144.

Sussman, L. J., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C, Goldman, A., Toker, L., Silman, Israel.1991. Atomic structure of Acetylcholinesterase from Torpedo californica: A prototypic acetylcholine-binding protein. Science. 253:872-879.

Şanlı, Y., 1988, Veteriner farmakoloji kemoterapotik ilaçlar, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara ,717p.

Şişli, M.N., Boşgelmez, A., Koçak, O., Porsuk, H., 1983. The effect of malathion, fenitrothion and propoxur on the housefly, *Musca domestica* L (Diptera: Muscidae) populations. Mikrobiyoloji Bulteni 17, 49-62.

Şişli, M.N., Koçak, O., Çağlar, S.S., Eryilmaz, A., 1984. Karasinek *Musca domestica* L.'nin (Diptera:Muscidae) duyarlı ve dirençli populasyonlarında hayat tablosu çalismaları ve Malathion, Fenitrothion ve Propoxur'un bu populasyonlar üzerine etkileri. Ulusal Çevre Sempozyumu Tebliğ Metinleri, 12-15 Kasim 1984 Adana, 817-824.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.

Tao L.,M., Shi M.G., Yuang J.Z., Zuhang P.J., Zhang, C.X., Tang Z.H., 2006. Resistance pattern and point mutations of insensitive acetylcholine sterase in a carbamate-resistant strain of housefly (*Musca domestica*), Pesticide Biochemistry and Physiology. 86, 1-6.

Taşkın, V. 2002. The genetic basis organofosfat malatyon resistance in Turkish house fly (*M. domestica*) strains and the worldwide distributions organofosfat *MdαE7* alleles. PhD thesis. Middle East Technical University, Ankara, Turkey.

Taşkın V. ve Kence M., 2004, The Genetic Basis of Malathion Resistance in Housefly(*Musca domestica* L.) Strains From Turkey, Russian Journal of Genetics, Vol. 40, No. 11, 2004, pp. 1215–1222. From Genetika. Vol. 40, No. 11, 2004, pp. 1475–1482.

Taylor, R.N., 1982. Insecticide resistance in housefly from the Middle East and North Africa with notes on the use of various bioassay techniques. Pesticide Science 13, 415-425.

Ünal, G , Gürkan, M..O., 2001 , İnsektisitler kimyasal yapıları, toksikolojileri ve ekotoksikolojileri, Ethemoğlu ofset matbaacılık, Ankara, 165p.

Walsh B., Dolden T. A.. , Moores G. D., Krıstensen M., Lewıs T., Devonshıre A.. L., Williamson M. S., 2001. Identification and characterization of mutations in housefly *(Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. Biochemical Journal 359, 175-181.

Yamanel, Ş. 2004, Türkiyenin bazı karasinek (*Musca domestica* L.) populasyonlarında sitogenetik analiz ve pestisitlere direnç, yükseklisans tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale.

Yamanel Ş., Çakır Ş., 2004, Türkiye'nin Bazı Karasinek (*Musca domestica* L.) Populasyonlarında Organofosfatlı İnsektisidlerden Metil Paration ve Diazinona Karşı Gelişmiş Direnç, Kırıkkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Türkiye Parazitoloji Dergisi. 28 (4): 210-214.

Yao, H., Chuanling, Q., Williamson, M.S., Devonshire, A.L. 1997. Characterization of the acetylcholinesterase gene from insecticide resistant houseflies *{Musca domestica).* Chinese Journal Biotechnology .13: 177-183.

Zhou, H. A., Syvanen, M. 1997. A complex gluthation transferase gene family in the housefly *Musca domestica.* Molecular and General Genetics. 256. 187-194.

Zhou Y.C., Dowdy A.K., Baker J.E., 1999. Differential mRNA expression levels and gene sequences of a putative carboxylesterase-like enzyme from two strains of the parasitoid Anisopteromalus calandrae (Hymenoptera: Pteromalidae). Insect Biochemical Molecular Biology. 29:417–425.

ÖZGEÇMİŞ

Ferda Gaçar 27.05.1982 tarihinde İzmir Ödemiş'te doğdu. İlk ve orta öğretimini Ödemiş'te tamamladı.
2001 yılında Selçuk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazandı. 2005 yılında lisans öğrenimini tamamladıktan sonra aynı yıl Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek lisans eğitimine başladı.