

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2013-YL-002**

**AKDENİZ VE EGE BÖLGELERİNDE
ANOPHELES MACULIPENNIS KOMPLEKSİNDE
KDR MUTASYONUNA DAYALI İNSEKTİSİT
DİRENCİNİN BELİRLENMESİ**

Fatma BURSALI

**Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Fatih M. ŞİMŞEK**

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Fatma BURSALI tarafından hazırlanan “Akdeniz ve Ege Bölgelerinde *Anopheles maculipennis* kompleksinde *kdr* mutasyonuna dayalı insektisit direncinin belirlenmesi” başlıklı tez, 10.01.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Selim S. ÇAĞLAR	HÜ
Üye : Prof. Dr. Celal ÜLGER	ADÜ
Üye : Doç. Dr. Fatih M. ŞİMŞEK	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN

Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

10/01/2013

Fatma BURSALI

ÖZET**AKDENİZ VE EGE BÖLGELERİNDE
Anopheles maculipennis KOMPLEKSİNDE KDR MUTASYONUNA
DAYALI İNSEKTİSİT DİRENCİNİN BELİRLENMESİ**

Fatma BURSALI

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fatih M. ŞİMŞEK

2013, 83 Sayfa

Bu araştırmada, Akdeniz ve Ege Bölgelerinde *Anopheles maculipennis* kompleksi popülasyonlarında DDT, Deltametrin ve Permetrin insektisitlerine karşı insektisit direnç düzeyinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için, *An. maculipennis* kompleksinin Aydın, Burdur, Muğla, Isparta ve İzmir popülasyonlarından ergin dişi örnekleri toplanmıştır. Popülasyonlardan elde edilen örnekler kullanılarak laboratuvarında Dünya Sağlık Örgütü'nün standart insektisit duyarlılık testleri yapılmıştır. İsektisit duyarlılık testlerinden sonra hem hayatta kalan hem de ölen bireyler kullanılarak 145 örnekten genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Doksan yedi örneğin genomik DNA'sı kullanılarak *kdr* direncini sağlayan *Vssc1* gen bölgesi dizileri elde edilmiş ve proteindeki polimorfizmler saptanmıştır. *Vssc1* gen bölgesi için 1014. pozisyonda, 97 örnekten 59'unda TTG (lösin), 2'sinde TCG (serin) ve 36'sında T(T/C)G (lösin/serin) saptanmıştır. Ayrıca, 107 örnek için *Asetilkolinesteraz 1* geninde, *Alu1* restriksiyon endonükleaz kullanılarak RFLP analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, *Ace-1* geninde insektisit direnciyle ilgili bir mutasyon bulunmamıştır. Bu sonuçların tür düzeyinde geçerliliğini sağlayabilmek için moleküler tür teşhisi çalışmaları yapılmıştır. Genomik DNA'lar kullanılarak 75 örnek için ITS 2 bölgesi dizileri elde edilmiş ve bu dizilerin GenBankası'ndaki dizilerle karşılaştırılmasıyla *An. maculipennis* s.s., *An. melanoon* ve *An. sacharovi* olmak üzere üç tür belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Anopheles maculipennis* kompleksi, insektisit direnci, *kdr*, *Ace-1*, Akdeniz, Ege.

ABSTRACT**DETERMINATION OF INSECTICIDE RESISTANCE BASED ON
THE KDR MUTATION IN *Anopheles maculipennis* COMPLEX
FROM MEDITERRANEAN AND AEGEAN REGIONS**

Fatma BURSALI

M.Sc. Thesis, Department of Biology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK
2013, 83 Pages

In this study, it is aimed to determine the level of insecticide resistance against DDT, Deltamethrin and Permethrin insecticides within the populations of *Anopheles maculipennis* complex in the region of Aegean and Mediterranean. For this purpose, adult female samples of *An. maculipennis* complex were collected from Aydın, Burdur, Muğla, Isparta and İzmir populations. By using the samples obtained from the populations, World Health Organization's standard insecticide susceptibility tests were carried out in the laboratory. After the insecticide susceptibility tests, genomic DNA isolation were done for 145 samples by both the dead and the surviving individuals. By using genomic DNA of 97 samples, *Vssc1* gene region sequences which provides *kdr* resistance were obtained and polymorphisms in proteins were determined. For *Vssc1* gene region, TTG (leucine) in 59, TCG (serine) in 2 and T(T/C)G (leucine/serine) in 36 of 97 samples was determined at 1014th position. Moreover, RFLP analysis was carried out on *Asetilcolin esterase 1* gene by using *AluI* restriction endonuclease for 107 samples. As a result of analyses, no mutation correlated with insecticide resistance was found in *Ace-1* gene. In order to confirm the validity of these results at species level, molecular species identification studies were done. By using genomic DNAs, ITS 2 region sequences were obtained for 75 samples and based on comparisons of the ITS 2 sequences with those in GenBank, three species as *An. maculipennis* s.s., *An. melanoon* ve *An. sacharovi* were determined.

Key words: *Anopheles maculipennis* complex, insecticide resistance, *kdr*, *Ace-1*, Mediterranean, Aegean.

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın planlanan hedeflerine ulaşacak şekilde sürdürülerek tamamlanmasında yararlı önerileriyle destek olan Yüksek Lisans Tez danışmanım Doç. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK'e,

Çalışmamda kullandığım moleküler teknikler konusunda bilgi ve tecrübeleriyle yol gösterici olan Prof. Dr. Celal ÜLGER'e, Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI'ya,

Hem laboratuvar çalışmalarında, hem de verilerin değerlendirilmesi aşamalarındaki katkıları nedeniyle Dr. Can YILMAZ'a,

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için maddi kaynak sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne (Proje no: ADÜ-BAP-FEF-12004) teşekkürlerimi sunarım.

Hem lisans hayatım, hem de tez çalışmam boyunca sunduğu sevgi ve hoşgörüsüyle her zaman yanımda olan, en zorlu zamanlarımda bana cesaret veren ve destek olan değerli eşim Engin BURSALI'ya teşekkür ederim.

Lisans hayatıma başladığım günden bu güne, her zaman yanımda olduklarını bildiğim, bu günlere gelmem için maddi manevi tüm imkânları sağlayan, annem Azime GÜNERKAN ve babam Ali GÜNERKAN'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1. İnsektisit Direnci	6
2.2. İnsektisit Direncinin Çeşitleri	7
2.2.1. Vigor Toleransı	7
2.2.2. Davranış Direnci	7
2.2.3. Fizyolojik Direnç	8
2.2.4. Çapraz Direnç.....	8
2.3. İnsektisit Direnç Mekanizmaları	8
2.3.1. Hedef Bölge Direnç Mekanizmaları	9
2.3.1.1. Asetilkolinesterazın değiştirilmesi	9
2.3.1.2. DDT ve piretroidlere karşı nöron duyarlılığının azaltılması	12
2.3.1.3. Klorlanmış siklodienlere karşı nöron duyarlılığının azaltılması	16
2.3.2. Detoksifikasyon / Metabolik Direnç Mekanizmaları	16
2.4. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi	18
2.5. İnsektisit Direncinin Genetiği	19
2.6. Pestisitler: İnsektisitler	20
2.6.1. İnsektisitlerin sınıflandırılması.....	21
2.6.1.1. Organoklorlu insektisitler.....	22
2.6.1.2. Organofosforlu insektisitler.....	22
2.6.1.3. Karbamat grubu insektisitler	22
2.6.1.4. Piretroid insektisitler	23
2.7. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksinin Sistematığı ve Önemi.....	24
2.8. Ülkemizde Sivrisineklerin İnsektisit Direnci Üzerine Yapılan Çalışmalar..	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1. Araştırma Alanı	29
3.2. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksi Populasyonlarının Örneklenmesi	30

3.3. Laboratuvar Çalışmaları	32
3.3.1. Morfolojik Tür Teşhisleri	32
3.3.2. Dünya Sağlık Örgütü İnsektisit Duyarlılık Testleri.....	33
3.3.3. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksi Örneklerinin Moleküler Tür Teşhisi	35
3.3.4. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksi Örneklerinin <i>Vssc1</i> Gen Bölgesinin PZR Yöntemiyle Çoğaltılması.....	37
3.3.5. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksi Örneklerinden <i>Ace-1</i> Gen Bölgesinin PZR Yöntemiyle Çoğaltılması.....	39
3.3.6. <i>Ace-1</i> Gen Bölgesinin <i>Alu 1</i> Restiriksiyon Enzimi İle Kesilmesi.....	39
3.3.7. <i>Ace-1</i> Geninin Kodladığı Amino asit Dizisinin Belirlenmesi İçin RNA İzolasyonu ve Elde edilen RNA'lerden cDNA Sentezi	40
3.3.8. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforeziyle Kalitesinin İncelenmesi ve Görüntülenmesi	42
3.3.9. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması İşlemi	43
3.3.10. rDNA ITS2, <i>Vssc1</i> ve <i>Ace-1</i> Bölgelerine Ait DNA Dizi Verilerinin Elde Edilmesi ve Analizi.....	44
4. BULGULAR	45
4.1. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksi Populasyon Örnekleri.....	45
4.2. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksi Yumurtalarının İncelenmesi.....	45
4.3. İnsektisit Duyarlılık Testleri	47
4.4. Genomik DNA İzolasyonu	49
4.5. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksi Örneklerinin Moleküler Tür Teşhisi ..	49
4.6. <i>Vssc1</i> Geninde <i>Kdr</i> Mutasyonunun Belirlenmesi.....	51
4.7. <i>Ace-1</i> Geninde Mutasyonun Taraması.....	53
4.8. <i>Ace-1</i> Geninin <i>Alu 1</i> Enzimi ile Kesimi.....	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	83

SİMGELER DİZİNİ

μ l	Mikrolitre
AChE	Asetilkolinesteraz enzimi
Bç	Baz çifti
DDT	Dikloro Difenol Trikloroethan
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtBr	Etidium Bromür
GABA	Gama Amino Butirik Asit
GST	Glutasyon-S-Transferaz
<i>kdr</i>	Knock-down resistance
mA	Mili amper
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	Ribozomal DNA
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TBE	Tris-Borik Asit EDTA
UV	Ultraviolet
<i>Vssc1</i>	Voltaj Duyarlı Sodyum Kanal Geni
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Voltaj duyarlı sodyum kanalı.....	12
Şekil 2.2. Yaygın olarak kullanılan insektisit sınıfları arasındaki çapraz direnç ilişkisi.....	23
Şekil 3.1. Örneklemelokaliteleri	29
Şekil 3.2. Belevi köyü ahır lokalitesi (no: 2)	31
Şekil 3.3. Kapıkargın köyü ahır lokalitesi (no: 3)	31
Şekil 3.4. Uylupınar köyü'nde (No:4) ağız aspiratörü ile örneklemelokaliteleri.....	31
Şekil 3.5. Ergin dişilerin yumurtlatma kapları ve bırakılmış yumurtalar....	32
Şekil 3.6. Test tüplerine örneklerin konulması	33
Şekil 3.7. DDT testi için hazırlanmış test tüpleri	33
Şekil 3.8. Deltametrin ve permetrin testi için hazırlanmış test tüpleri.....	34
Şekil 3.9. Test tüplerinde insektisitli kağıtlarda bekletilen örnekler.....	34
Şekil 4.1. <i>Anopheles melanoon</i> yumurtaları	46
Şekil 4.2. <i>Anopheles maculipennis</i> s.s. yumurtaları	46
Şekil 4.3. <i>Anopheles sacharovi</i> yumurtaları	46
Şekil 4.4. Kapıkargın köyü lokalitesi örneklerine ait DNA'ların jel görüntüsü	49
Şekil 4.5. Uylupınar lokalitesi örneklerinden elde edilen ITS 2 bölgesi PZR ürünlerinin jel görüntüsü.....	50
Şekil 4.6. ITS 2 bölgesi dizilerine göre belirlenen türlerin oranı.....	51
Şekil 4.7. <i>Kdr</i> mutasyonunun belirlenmesi için yapılan 1. PZR ürünlerinin jel görüntüsü.....	51
Şekil 4.8. <i>Kdr</i> mutasyonunun belirlenmesi için yapılan 2. PZR ürünlerinin jel görüntüsü.....	52
Şekil 4.9. <i>Ace-1</i> geninden elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	55
Şekil 4.10. <i>Alu I</i> enzimi ile yapılan RFLP reaksiyonu sonucu elde edilen kesim sonuçları	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Böceklerde voltaj duyarlı sodyum kanallarında değişimlere neden olan nokta mutasyonları	14
Çizelge 2.2. Araştırmalarda kullanılan bazı restriksiyon endonükleaz enzimleri ve tanıma dizileri	18
Çizelge 3.1. <i>Anopheles maculipennis</i> kompleksi türlerinin örnekleme lokaliteleri.....	30
Çizelge 3.2. <i>Anopheles maculipennis</i> kompleksi türlerinin rDNA ITS 2 bölgesinin PZR ile amplifikasyonunda kullanılan bileşenler	36
Çizelge 3.3. rDNA ITS 2 gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan PZR programı.....	37
Çizelge 3.4. <i>Anopheles maculipennis</i> kompleksi türlerinde <i>kdr</i> mutasyonunun belirlenmesi için yapılan 1. PZR reaksiyonu için kullanılan bileşenler.....	37
Çizelge 3.5. <i>Anopheles maculipennis</i> kompleksi türlerinde <i>kdr</i> mutasyonunun belirlenmesi için yapılan 2. PZR reaksiyonu için kullanılan bileşenler.....	38
Çizelge 3.6. <i>Vssc1</i> gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan 1. PZR programı.....	38
Çizelge 3.7. <i>Vssc1</i> gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan 2. PZR programı.....	38
Çizelge 3.8. <i>Anopheles maculipennis</i> kompleksi türlerinde <i>Ace-1</i> gen bölgesinin PZR ile amplifikasyonunda kullanılan bileşenler ..	39
Çizelge 3.9. <i>Ace-1</i> gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan PZR programı.....	39
Çizelge 3.10. <i>Ace-1</i> geninin <i>Alu 1</i> enzimi restriksiyon kesim reaksiyonu	40
Çizelge 3.11. cDNA sentezi için kullanılan master mix bileşenleri ve konsantrasyonları	42
Çizelge 4.1. <i>Anopheles maculipennis</i> kompleksi populasyonlarından elde edilen örneklerin lokaliteler göre dağılımı.....	45
Çizelge 4.2. WHO'nun standart insektisit duyarlılık testleri sonuçları.....	48
Çizelge 4.3. Lokalitelere göre <i>Anopheles maculipennis</i> kompleksi örneklerinin moleküler tür teşhisi	50
Çizelge 4.4. <i>Kdr</i> mutasyonunun belirlenmesi için gerçekleştirilen reaksiyonların lokalitelere göre dağılımı.....	52

Çizelge 4.5. <i>Vssc1</i> geninde <i>kdr</i> mutasyonu yönünden belirlenen genotip dağılımı.....	52
Çizelge 4.6. <i>Vssc1</i> geninde <i>kdr</i> mutasyonu yönünden belirlenen genotiplerin lokalitelere göre dağılım.....	53
Çizelge 4.7. <i>Kdr</i> mutasyonunun belirlenmesine yönelik dizi analizi sonucu 1014. pozisyondaki amino asit eğişiklikleri.....	54
Çizelge 4.8. <i>Ace</i> mutasyonunun belirlenmesi için gerçekleştirilen reaksiyonların lokalitelere göre dağılımı.....	55
Çizelge 4.9. <i>Alu 1</i> enzimi ile gerçekleştirilen kesim reaksiyonlarının lokalitelere göre dağılımı.....	56

1. GİRİŞ

Sivrisinekler, Insecta sınıfının Diptera takımında yer alır ve Diptera'nın 130 familyasından biri olan Culicidae familyasını oluştururlar. Tür sayısı açısından büyük ve çeşitliliği yüksek olan Culicidae familyası, Anophelinae ve Culicinae alt familyaları altında dünya genelinde 113 cinsle bağlı 3523 türü kapsayan bir gruptur (Harbach ve Kitching, 2005; Harbach, 2007, 2011). Bu büyük böcek grubunun günümüzde geçerli kabul edilen mevcut cinslerinden *Anopheles*, *Aedes*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Culiseta*, *Ochlerotatus*, *Orthopodomyia* ve *Uranotaenia* olmak üzere sekiz cins ülkemizde bulunmaktadır. Bu cinsler kapsamında, son yıllarda ülkemizde yapılan morfolojik ve moleküler sistematik çalışmalarla belirlenen sekiz tür ile birlikte, Türkiye sivrisinek faunası *Anopheles* (10 tür), *Aedes* (3 tür), *Culex* (13 tür) *Culiseta* (6 tür), *Ochlerotatus* (20 tür), *Coquillettidia* (1 tür), *Orthopodomyia* (1 tür), *Uranotaenia* (1 tür) cinslerinde yer alan 55 türden oluşmaktadır (Parrish, 1959; Merdivenci, 1984; Kasap vd., 1997; Ramsdale vd., 2001; Aldemir vd., 2010; Şimşek vd., 2011). Bu türlerden, *An. maculipennis* s.s., *An. melanoon* ve *An. sacharovi* türleri, Paleartik Bölge'de 11 türü kapsayan *An. maculipennis* kompleksinin ülkemizdeki üyeleridir (Şimşek vd., 2011, Sevgili ve Şimşek, 2012). *Anopheles maculipennis* kompleksi, Paleartik Bölge'de günümüzde ve geçmişte sıtmanın yayılımında oldukça etkili olan *An. atroparvus*, *An. labranchiae* ve *An. sacharovi* gibi önemli vektörleri içeren bir tür kompleksi olması nedeniyle halk sağlığı açısından çok önemlidir. Ayrıca, kompleksin *An. maculipennis* s.s. ve *An. messeae* türlerinin de sıtmanın taşınmasında zaman zaman belirli bölgelerde etkili olduklarından şüphelenilmektedir. *Anopheles atroparvus*, Kıyı Avrupa, *An. labranchiae*, Batı Akdeniz ve *An. sacharovi*, Doğu Akdeniz'de sıtmanın başlıca vektörleridir. *Anopheles maculipennis* s.s., *An. becklemishievi*, *An. messeae* ve *An. melanoon* türleri ise sıtma taşınımında diğerlerine göre daha düşük öneme sahiptir. Fakat *An. maculipennis* s.s. ve *An. messeae* Avrupa'da hayvancılığın az olduğu bölgelerde populasyon yoğunluklarına bağlı olarak sıtma taşınımından sorumludurlar (Becker, 2003).

Anopheles türlerinin sıtma vektörlüğünü her zaman ön planda olmakla birlikte diğer sivrisinek türleri, sarıhumma, dengeu humması, lemfatik filariasis ve çeşitli ensefalitler gibi oldukça tehlikeli hastalıklara sebep olan bazı arbovirüsler, bakteriler, protozoonlar ya da nematodların vektörlüğünü yapabilirler (Becker, 2003). Bu özellikleri nedeniyle, insanlara çok sayıda hastalık etkeni bulaştırabildiklerinden etkili bir biyolojik vektör olarak kabul edilen sivrisinekler,

insan sağlığı açısından oldukça önemlidirler. İnsanlarda görülen vektörel hastalıklar açısından bir değerlendirme yapıldığında, geçmişte ve günümüzde mortalite ve morbitideye sebep olan çeşitli patojenlerden en önemlileri sivrisinekler tarafından bulaştırılmaktadır. Ayrıca, olumsuz evre koşullarında bile uzun süre canlı kalabilmeleri, dünyanın tüm zoocoğrafik bölgelerinden bulunabilmeleri, hızlı üreme yetenekleri, iyi uçucu olmaları, pek çok canlı grubundan kan emebilmeleri, hemen hemen tüm sucul habitatlarda üreyebilmeleri, insektisitlere karşı hızla direnç kazanabilmeleri gibi birçok özellikleriyle mücadeleleri oldukça zordur. Bu nedenle de kan emici diğer böceklere göre hem halk sağlığı hem de ekonomik ve çevresel açıdan çok daha önemli bir yere sahiptirler. Dünya nüfusunun yarısından fazlası sivrisineklerin vektörlük yaptığı hastalıklarla enfekte olma riskiyle karşı karşıyadır. Örneğin, sivrisineklerin biyolojik vektörlüğünü yaptığı en tehlikeli hastalık olan sıtmanın, dünyada her yıl 500 milyon yeni olgusu ortaya çıkmakta ve çoğunluğu ocuk yaklaşık 2,5 milyon insanın ölümüne neden olmaktadır. Dünya nüfusunun yaklaşık % 20'si *Anopheles* türü sivrisineklerinin vektrlğyle yayılan *Plasmodium*'ların endemik olduğu bölgelerde yaşamaktadır. Sıtma, halk sağlığı açısından önemli bir endemik hastalık olarak ülkemizde de yıllarca etkisini sürdürmüştür. 1957 yılında uygulanmaya başlanan ulusal sıtma mücadele programıyla sıtma vakalarında azalma görülmesine rağmen, 1990 ve 2000'li yıllarda özellikle Güneydoğu Anadolu Projesi kapsamındaki şanlıurfa, Diyarbakır, Mardin ve Siirt illerinde sıtma vakalarında tekrar artışlar olmuştur (WHO, 2000a, b). 2005 yılından başlayarak sıtma eradikasyon çalışmaları daha kapsamlı olarak uygulanmaya başlanmış ve bu bölgelerimizden 2008 yılında 166'sı yerli, 49'u yurtdışı kaynaklı toplam 215 sıtma vakası bildirilmiştir (WHO, 2009). Ancak, yerli vaka sayılarında son yıllarda önemli oranda azalma olsa da, yıllardır hem resmi hem de özel kuruluşlar tarafından sıtma mücadele çalışmaları yapılmasına rağmen, sıtma eradikasyonu sağlanamamıştır. Ayrıca, Güneydoğu Anadolu bölgesinden her yıl binlerce tarım işçisinin yaptığı mevsimsel g hareketleriyle özellikle de, Akdeniz ve Ege bölgelerimizde olası bir sıtma epidemisi riski de devam etmektedir.

Gerek insanlar açısından önemli gerekse de tarımsal ya da hayvancılık açısından önemli olan vektörlerin kontrolündeki genel amaç, vektörün insan ve hayvan barınaklarına girmesini önlemek, vektörün konakları ile ilişkisini kesmek ve vektör popülasyonlarının küçülmesini sağlamaktır. Son yıllarda özellikle de sivrisinekler gibi vektör türlerinin mücadelesinde gen teknolojilerinden

yararlanılarak yeni kuşak mücadele yöntemleri geliştirme çalışmaları yapılıyor olsa da, günümüzde vektör ya da zararlı kontrolünde yaygın olarak fiziksel, kimyasal, biyolojik ve kültürel mücadele olmak üzere dört temel yöntem kullanılmaktadır. Sivrisineklerin ve vektörlüğünü yaptıkları hastalıkların kontrolünde en iyi strateji ise zamansal ve mekânsal olarak uygun olan tüm kontrol yöntemlerini birlikte kullanabilmektir. Sıtma gibi vektörel hastalıkların mücadelesinde elde edilecek olan başarı oranında ise sosyolojik, kültürel ve çevresel faktörler gibi birçok faktör etkili olmakla birlikte, başarı oranını doğrudan etkileyen iki faktör vardır: ilki, mücadelesi yapılacak olan vektör türlerin tespitinin doğru yapılmasıdır. Çünkü, ikiz türler olsalar bile, birçok vektör tür biyolojik, ekolojik ve davranışsal farklılıklar sergilemekte ve bu farklılıklar da belirli bir bölgedeki vektör mücadelesini etkilemektedir. İkincisi ise tespiti yapılan tür ya da türlere karşı yürütülecek olan mücadelenin stratejisi ve mücadele de uygulanacak olan yöntemlerdir. Ülkemizde yapılmış olan sıtma eradikasyon çalışmaları genel olarak değerlendirildiğinde, vektör kontrolüne yönelik farklı düzeyde etki ve mekanizmalara sahip birçok yöntem uygulanmıştır. Ancak, uygulama kolaylığı, etki hızının yüksekliği, sorunu kısa sürede çözebilmesi, her ihtiyaç duyulduğunda kolay elde edilebilmesi ve yerel çözümler sağlaması nedeniyle kimyasal insektisit ya da pestisitler kullanmaya dayalı vektör kontrolü daha yaygın bir yöntem olarak tercih edilmiştir. Bu durumda, sıtmanın kontrolünde vektör tür tespitinin doğru yapılması ve mücadelede kullanılacak olan insektisitlere karşı vektör türün duyarlılık ya da direnç özelliklerinin bilinmesi önemli olmaktadır.

Vektör ya da zararlıların kontrol çalışmalarında kimyasal ajanların kullanımı milattan öncesine dayanmakla birlikte, modern organik sentetik pestisitlerin vektör kontrolünde kullanılmaları, ilk kez üretildikleri 1940'lı yıllardan başlayarak 1960'lı ve 1970'li yıllara kadar hızla artmıştır. 1980'li yıllara gelindiğinde en yüksek noktasına ulaşan pestisit kullanımı, 1990'ların ikinci yarısından itibaren ise azalmaya başlamıştır (Pedigo, 1996). Buna rağmen, son yıllarda kullanılan pestisit aktif madde sayısı 1342 olup, bunlardan 1000'e yakını insektisit özelliği taşımaktadır ve bu aktif maddelerden binlerce onaylanmış ticari formülasyon üretilmiştir (Tomlin, 1997). Diğer taraftan, kimyasal pestisitlerin yaygın ve oldukça yüksek oranda kullanımı, hedef organizmalarda yüksek seçim baskısı oluşturmaktadır. Buna bağlı evrimsel süreçlerin bir sonucu olarak da, zararlı popülasyonlarında kullanılan kimyasallara karşı direnç gelişimi ortaya çıkabilmektedir. İnsektisit direncinde görülen bu mikro-evrim her geçen yıl birim

alanda daha fazla kimyasal kullanımına neden olmakta ve bu da hedef olmayan türler üzerinde olumsuz etkiye ve çevresel kirlenme gibi ciddi ekolojik problemlere sebep olmaktadır (Cluck vd., 1990). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) insektisit direncini “bir popülasyondaki bireylerin çoğunu öldürdüğü tespit edilen zehirli bir maddenin belirli bir dozuna karşı, aynı türün diğer popülasyonundaki bireylerin tolerans kazanma yeteneğinin gelişmesi” şeklinde tanımlamaktadır (Brown, 1958). Bir zararlı böcek popülasyonuna karşı bir insektisit veya insektisit grubunun uzun süre devamlı olarak kullanılması halinde seçim veya mutasyon yoluyla hedef böcek popülasyonunda kullanılan insektisite karşı direnç gelişebilmektedir (Giray, 1977). Günümüzde 500’den fazla arthropod türünün bir veya daha fazla insektisite karşı direnç geliştirdiği belirlenmiştir (Plapp, 1984). Bu türlerden yarısının birden fazla insektiside karşı direnç geliştirdiği, bazılarının ise tüm insektisit gruplarına karşı direnç geliştirdiği saptanmıştır (Georghiou, 1986; Floate, 2001). Böceklerin insektisitlere karşı geliştirdikleri direnç mekanizması çevresel değişimlere ve özellikle dikkate değer hızlı seçilime karşı gelişen evrimsel adaptasyonların en iyi göstergesidir (Karunaratne, 1998). Bazı zararlı türleri için bilimsel olarak geçerli ve ekonomik olarak kabul edilebilen direnç yönetim programlarının tasarlanması, karmaşık ve zor bir iş gibi görünmektedir. Direncin devam eden bir sorun olduğu çoğu zararlı türünde, çeşitli direnç yönetim senaryoları ile direncin gelişim sürecini doğru bir şekilde önceden tespit etmemizi sağlayacak popülasyon genetiği ve popülasyon ekolojisi ile ilişkili göreceli olarak az bilgi vardır. Çoğu durumda, direnç bazı alanlarda iyi ve yaygın bir şekilde gelişmedikçe direnç genetiğinin spesifik detayları çok iyi anlaşılabilir. Buna ek olarak hem göç hem de popülasyon büyüme özellikleri direncin evrim hızını etkilemektedir (Roush, 1989).

İnsektisitlerin yaygın ve bilinçsiz kullanımı sonucunda hedef organizmalarda çeşitli tiplerde direnç mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar: özel direnç ya da yapısal direnç, davranışsal direnç, fizyolojik direnç ve çapraz dirençtir (Yu, 2008). Piretroid grubu insektisitlere (Deltametrin, Permetrin gibi) karşı oluşan direncin önemli bir tipi böceğin sinir sisteminin hassasiyetinde belirgin bir biçimde azalma ile karakterize edilmektedir ve sadece piretroidlere değil ayrıca benzer etki mekanizmasına sahip organoklorlu insektisit grubuna (DDT gibi) da direnç geliştirmektedir. Bu mekanizma çapraz direnç adını almaktadır ve ilk olarak DDT-dirençli karasineklerde (*Musca domestica*) tanımlanmıştır ve “knock-down resistance” ya da *kdr* adını almıştır (Milani, 1954). *Kdr* direncine dayalı insektisit

direnci böcek populasyonlarında özellikle de sivrisineklerde oldukça yaygın olmasına ve birçok vektör türün kontrolünde sorun oluşturmalarına karşılık ülkemizde bu kapsamda sivrisinekler için sadece tek bir moleküler çalışma yapılmıştır. Adana bölgesinden örneklenen ve WHO'nun standart insektisit testleriyle piretroid dirençli oldukları tespit edilen, *kdr* direnci ile ilgili gen bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemiyle çoğaltılan 12 *An. sacharovi* örneğinin 4 tanesinin, Afrika sıtma vektörü *Anopheles gambiae* türündeki *kdr* allele analog bant oluşturduğu tespit edilmiştir (Lüleyap vd., 2002). Ülkemizde sivrisineklerin insektisit direnç durumunun tespitine ve direncin biyokimyasal mekanizmalarının belirlenmesine yönelik yapılan diğer bir çalışmada da, Trakya Bölgesi *Anopheles maculipennis* kompleksi populasyonlarında direnç oluşumunun genel esterazlardan ve glutatyon S-transferaz (GST)'lerden kaynaklandığı gösterilmiştir (Çağlar ve Skavdis, 2008; Akıner vd., 2011). Günümüzde, insektisit direncinin vektör böceklerin kontrolünü etkileyen önemli bir faktör olduğu iyi bilinmektedir. Bu nedenle, zararlı böcek populasyonlarında insektisitlere karşı oluşan direncin genetik özelliklerinin araştırılarak, direnç mekanizmalarının belirlenmesi ve bu bilgilere dayanarak da populasyonların direnç durumlarının açıklanabilmesi önemlidir. Bu doğrultuda planlanan Yüksek Lisans Tez çalışmasında, ülkemizin Akdeniz ve Ege bölgelerinin Burdur, Isparta, Muğla, Aydın ve İzmir illeri kapsamında belirlenen beş lokalitede *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerine ait populasyonlardan örnekleme çalışmaları yapılmıştır. Örneklenen populasyonların DDT, Deltametrin ve Permetrin insektisitlerine karşı insektisit direnç düzeyleri WHO'nun standart test yöntemlerine göre belirlenmiştir. Direnç düzeyi belirlenen her bir populasyonda, *kdr* ve *Ace-1* mutasyonlarına dayalı olarak, insektisit dirençli bireylerin olup olmadığının tespiti için moleküler yöntemlerle analizler yapılmıştır. Böylece, araştırma bölgelerindeki *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinin populasyonlarında hem DDT, Deltametrin ve Permetrin insektisitlerine karşı insektisit direncinin mevcut durumunu hakkında hem de insektisit direncini sağlayabilen *kdr* ve *Ace-1* mutasyonlarına dayalı mekanizmalar kapsamında yararlı olabilecek veriler elde edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. İnsektisit Direnci

İnsektisitler, önemli hastalıklara vektörlük yapan sivrisinek, tatarcık, pire, bit, çeçe sineği gibi böceklerin kontrolünde önemli bir rol oynarlar (Hemingway ve Ranson, 2000). Günümüze kadar gelen süreçte organoklorlu, organofosforlu, karbamatlı ve piretroid olmak üzere dört ana sınıfa dâhil pek çok sentetik insektisit üretimi devam etmiş ve kullanımı süregelmiştir (Floate, 2001). 1940'larda başlayan modern sentetik zehirlerin üretimiyle, pestisit kullanımı 1960 ve 1970'li yıllarda hızla artmıştır. Özellikle de, zamansal, mekânsal ve miktar açısından uygun olmayan şekillerde insektisitlerin yıllarca yaygın ve yoğun kullanımı, günümüzde zararlı böceklerin mücadelesinde en ciddi sorunlardan biri olarak kabul edilen böceklerde insektisitlere karşı direnç gelişimine neden olmuştur. İnsektisit direnci, böcek popülasyonlarında oluşan rastgele mutasyonlara bağlı olarak kazandıkları özelliklerle az sayıdaki bireyin öldürücü insektisit dozlarına rağmen, sağ kalmasını sağlayan öncü bir adaptasyon olarak tanımlanmaktadır (Kuyucu, 2007). İnsektisit direnci, temel evrimsel süreçler sonucu meydana gelmektedir ve genetik kökenli olması sebebiyle sonraki kuşaklara da aktarılmaktadır. (Georghiou, 1986). Direnç hızlandırılmış evrim olarak da tanımlanabilmektedir. Doğal habitatlarında canlı popülasyonları çeşitli çevresel koşulların oluşturduğu seçim baskısı altında varlıklarını sürdürürler. Sonuçta ortamdaki yeni yapay seçim kaynağına göre zararlı popülasyonlarının allel frekansları değişim gösterecek ve pestisitlere karşı daha dirençli fenotipik yapıyı oluşturan genotiplerin (allelerin) popülasyon içi frekansları artacaktır (Kuyucu, 2007).

Böceklerde insektisit direnci ilk olarak 1946 yılında, *Musca domestica*'da bildirilmiş ve bu canlının günümüze kadar gelen süreçte tüm sentetik insektisitlere karşı direnç geliştirdiği tespit edilmiştir (Keiding, 1999). II. Dünya Savaşı'ndan sonra sentetik kimyasalların hızla üretilmesine paralel olarak insektisit ya da diğer pestisitlere karşı direnç gelişimi artmış ve yaygınlaşmıştır (Kence, 1988). Bu durumun sonucunda da vektör canlılar dışında diğer birçok organizmada sentetik insektisitlere karşı direnç gelişimi ortaya çıkmıştır. Georghiou ve Lagunes–Tejeda, (1991)'a göre, 504 böcek ve kene türünde (% 69 tarım zararlısı, % 38 halk sağlığı ve hayvan zararlısı, % 3 faydalı tür), 100 bitki patojeninde, 28 zararlı ot türünde, 2 nematod ve 5 memeli türünde uygulanan insektisitlere karşı direnç gelişmiştir.

Önemli halk sağlığı sorunlarına neden olan vektör böcek popülasyonlarındaki insektisit direncinin mücadele çalışmalarının insektisitlerin uygulanma sıklıklarına ve miktarına bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Ancak, insektisit direncinin beklenildiği şekilde hızla gelişmediği vektör böcek türleri de vardır. Örneğin; *Glossina palpalis* (Çeçe sineği) ile mücadelede DDT ile spreyleme geniş çaplı kullanılmasına rağmen bu türde DDT direnci hiçbir zaman gelişmemiştir. Başka bir örnek olarak *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) cinsinin pek çok türünde de insektisitlere karşı gelişen direnç ya çok azdır ya da hiç yoktur. Her iki durumda da insektisit direnç gelişimini etkileyen ana faktör, böceklerin yaşam döngüsü özellikleridir. Triatomidler (*Rhodnius*)'in uzun yaşam döngüsünün olması, çeçe sinekleri'nin de oldukça az sayıda yumurta ile az sayıda larva oluşturabilmeleri insektisit direncinin gelişmemesinde önemli etkenlerdir. Bunun tam aksine sivrisinekler kısa yaşam döngüleri ve oldukça fazla sayıda kuşak oluşturmaları sebebiyle direnç gelişimi için tüm karakteristik özelliklere sahiptirler (Hemingway ve Ranson, 2000). Bu nedenle, 100'den fazla sivrisinek türünde bir ya da daha fazla insektisite karşı direnç gelişimi belirlenmiştir (WHO, 1992).

2.2. İsektisit Direncinin Çeşitleri

Böceklerde ya da vektör böceklerde genel olarak dört farklı insektisit direnci sıklıkla tespit edilmektedir: (1) Vigor toleransı, (2) Davranış direnci, (3) Fizyolojik (metabolik) direnç ve (4) Çapraz dirençtir (Yu, 2008).

2.2.1. Vigor Toleransı

Özel bir direnç genine sahip olmaksızın, kullanılan insektisidin popülasyon üzerindeki baskısının artmasına bağlı olarak direncin artmasıdır. Bu durum, kalın kutikula, büyük vücutluluk, artan yağ oranı gibi mevsimsel varyasyonlar sonucu olabilmektedir ve bu mekanizmanın canlıya daha fazla oranda direnç sağlama işlevi olduğu düşünülmektedir.

2.2.2. Davranış Direnci

Genellikle hedef organizmanın davranış özellikleriyle insektisitlerden kaçınmalarıdır. Bu direnç tipinde önemli olan, irritantlara, kullanılan kimyasallara karşı gösterilen tepkiyle uzak kalma, temas süresini azaltma gibi davranışsal özelliklerin ortaya çıkmasıdır (Georghiou, 1986; Çağlar ve Skavdis, 2008).

2.2.3. Fizyolojik Direnç

İnsektisitlerin toksik etkilerinin böceğin enzimleriyle azaltılarak ortadan kaldırılmasıyla, hedef bölgesinin düzenlenmesi veya insektisit yağ dokuda depolanmasıyla ortaya çıkan direnç şeklidir (Çağlar ve Skavdis, 2008). En önemli direnç mekanizmalarından biri olup, büyük oranda sentetik insektisitlerin ya da pestisitlerin yaygın kullanımı ile ortaya çıkmaktadır (Çakır ve Yamanel, 2005).

2.2.4. Çapraz Direnç

Bir grup insektiside karşı seçilime uğramış böcek popülasyonlarının dirençli soylarının sahip olduğu direnç mekanizmalarıyla, bu gruptan diğer insektisitlere ve hatta farklı gruptan insektisitlere karşı da dirençli olma ya da direnç geliştirmeleridir.

2.3. İnsektisit Direnç Mekanizmaları

Böcek popülasyonlarının, özellikle de devamlı olarak insektisit seçim baskısı altında bulunan vektör ya da tarım zararlısı böcek popülasyonlarının pek çoğunda insektisitlere karşı direnç gelişimi olmasına karşın, insektisit direnç mekanizmaları oldukça azdır. Farklı mekanizmaların mevcut olmasında, böcek popülasyonunun insektisite maruz kalma şekli ve etkileşim biçimi belirleyici olsa da, temel olarak insektisitlere karşı direnç gelişimini sağlayan üç mekanizma yaygın olarak bilinmektedir: 1) İnsektisit vücut içerisine girişinin azaltılması (kutiküler direnç), 2) Esteraz, karışık oksidazlar, glutatyon S-transferaz (GST) gibi enzimler ile insektisit metabolizasyonunun hızlandırılarak detoksifikasyonun sağlanması, 3) İnsektisit hedef bölgesinin duyarlılığının değiştirilmesini sağlayan mekanizmalardır (Mutero vd., 1994). İnsektisit direncinde sıklıkla karşılaşılan bu üç temel mekanizma da genetik-biyokimyasal temelde işlemektedir ve pek çok direnç durumunda birbirleriyle bağlantılı olarak bir mekanizmanın diğer mekanizmayı indüklediği ana bir mekanizmasının paralelinde çoklu direnç olarak bilinen durumun olduğu görülmektedir (Gressel, 1986; Cygler vd., 1993; Çağlar ve Skavdis, 2008). Genetik-biyokimyasal temelde işleyen insektisit direnç mekanizmalarından hedef bölge mekanizmalarıyla, detoksifikasyon mekanizmaları çok önemlidir. Pek çok böcek popülasyonunda belirlenen bu insektisit direnç mekanizmalarından hangilerinin böcek popülasyonunda insektisit direncini sağladığının bilinmesi, alternatif insektisitlerin seçimini kolaylaştırır,

dirençli populasyon bölgelerinin detaylı haritalanmasına imkân sağlar ve çapraz direnç spektrumunu belirlemeye yardım eder (Cygler vd., 1993).

2.3.1. Hedef Bölge Direnç Mekanizmaları

Hedef bölge direnç mekanizmalarında, sinir sistemindeki çeşitli düzenlemelerle insektisitlerin organizmadaki hedef bölgelerine bağlanması engellenmektedir. Yapısal genlerindeki değişimsiz mutasyonlar hedef bölge direnç mekanizmasıyla insektisit direncinin oluşmasını sağlayan en önemli etkidir. Bu değişikliklerin oldukça spesifik olması gereklidir, bu sebeple büyük çoğunluğu hedef bölgenin protein dizisindeki tek bir amino asit yer değişimi ile gerçekleşmektedir. Meydana gelen amino asit değişimi hedef bölgenin temel fonksiyonunda herhangi bir kayba sebep olmadan insektisidin bağlanmasını azaltmaktadır. Bu nedenle meydana gelebilecek amino asit yer değişimleri çok sınırlı olduğundan dirençle ilişkili benzer mutasyonlar genellikle oldukça farklı taksonlarda bulunmaktadır (Hemingway ve Ranson, 2000).

Bu kapsamda insektisit direncini sağlayan üç hedef bölge mekanizması önemlidir:

1. Asetilkolinesteraz değişimi (Asetilkolinesterazlar)
2. DDT ve piretroidlere karşı nöron duyarlılığında azalma (Sodyum kanalları)
3. Klorlanmış siklodienlere karşı nöron duyarlılığında azalma (Gama Amino Butirik Asit reseptörleri)

Böceklerdeki sodyum kanalı ve Gama Amino Butirik Asit (GABA) kanal genlerinin dizileri kopyalanmış, dirençli ve hassas böceklerde karşılaştırılmıştır. Asetilkolinesteraz enzimi (AChE) temelli direnç *Drosophila*'da açıklanmıştır fakat bu mekanizmanın sivrisineklerde moleküler düzeyde kanıtlanması daha zorlu bir süreçtir (Fournier vd., 1993).

2.3.1.1. Asetilkolinesterazın değiştirilmesi

Asetilkolinesteraz enzimi, merkezi ve periferik, kolinerjik ve adrenerjik sinir ve kas dokusunda, eritrositlerde ve plasental dokuda yaygın olarak bulunmaktadır. AChE, post-sinaptik sinir membranındaki uyarıcı bir nörotransmitter olan asetilkolini hidrolizleyen özelleşmemiş bir enzimdir. Asetilkolin sinir impulslarının sinapslardan geçişini kolaylaştıran, organofosforlu ve karbamat grubu insektisitlerin sinir sinapsislerindeki hedef bölgesini oluşturan nörotransmitter bir maddedir (Yorulmaz ve Ay, 2010). Bu mekanizmanın

metabolik dirence eşlik ettiği ve diğer mekanizmalarla birlikte yüksek direnç oluşumuna katkı sağladığı düşünülmektedir.

Karbamat ve organofosfat grubu insektisitlere karşı gelişen insektisit direnci oldukça yaygın bir direnç mekanizması olan duyarlı AChE ile sağlanmaktadır (Fournier ve Mutero, 1994). İsektisitler, kolinerjik sinapslarda AChE'nin geri dönüşümsüz olarak inhibisyonuyla sinir impulslarının iletimini engellemekte, bu da böceğin ölümüne neden olmaktadır (Ahoua Alou vd., 2010). Sivrisineklerdeki *Ace-1* geni sinir sistemindeki AChE1 (Asetilkolinesteraz enzimi)'i kodlamaktadır (Weill vd., 2002). *Ace-1* genindeki *Ace-1R* ya da *Ace-1^R* mutasyonu olarak adlandırılan tek bir nokta mutasyonu bu direnç mekanizmasını meydana getirmektedir. Bu mutasyon ile AChE'nin 119. amino asit pozisyonunda Glisin'in Serin'e dönüşümü (G119S, GGT→ AGC) gerçekleşmekte ve karbamat ve organofosfat grubu insektisitlere çapraz direnç oluşumuna sebep olmaktadır (Alout vd., 2008, Ahoua Alou vd., 2010). G119S mutasyonu çeşitli sivrisinek türlerinde AChE'nin duyarlılığından sorumludur (Weill vd., 2004a) ve Güney Fransa'daki *Culex pipiens*'in doğal popülasyonlarında oldukça kapsamlı şekilde çalışılmıştır (Raymond vd., 2001; Labbe vd., 2007). Ayrıca, G119S mutasyonu Afrika'daki ana sıtma vektörü olan *An. gambiae* s.s.'un da dahil olduğu çok sayıda sivrisinek türünde birbirlerinden bağımsız olarak tanımlanmıştır (Weill vd., 2003, Bourquet vd., 2004 Weill vd., 2004b, Djogbenou vd., 2008). *Anopheles* cinsi içinde de *An. albimanus* (Ayad ve Georghiou, 1975), *An. atroparvus* ve *An. sacharovi* türlerinde belirlenmiştir (N'guessan vd., 2003). Çeşitli dirençli türlerin gösterdiği AChE'deki duyarlılık oldukça değişkendir; çünkü bir çok farklı mutasyon direnç gelişimini sağlayabilmekte ve farklı genler AChE'nin hedef bölgesini kodlayabilmektedir (Weill vd., 2003). *Drosophila*'da bu durum oldukça basittir çünkü genomunda sadece tek bir *Ace* geni (*Ace-2*) bulunmaktadır. Diğer böcek türlerinde (*Aphis gossypii*, *Nephotettix cincticeps*, *Helicoverpa armigera*), bazı Diptera türlerinde (*Cx. tritaeniorynchus*, *Cx. pipiens*), *Drosophila*'daki *Ace-2* genine eş olan gen, direnç ile ilişkili değildir (Malcolm vd., 1998; Menozzi, 2000; Tomita vd., 2000; Mori vd., 2001; Ren vd., 2002). Başka bir *Ace* geni (*Ace-1*)'nin *An. gambiae* ve *Cx. pipiens*'in dirençli soylarında AChE duyarlılığından sorumlu olduğu gösterilmiştir (Weill vd., 2002, 2003). Bu iki *Ace* geninin varlığının, Artropodların ortaya çıkmasından daha önce meydana gelen bir duplikasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak, *Ace-1* geni olan türlerde neden *Ace-2*'nin

var olduğu ve bu genin fonksiyonunun ne olduğu bilinmemektedir (Weill vd., 2004b).

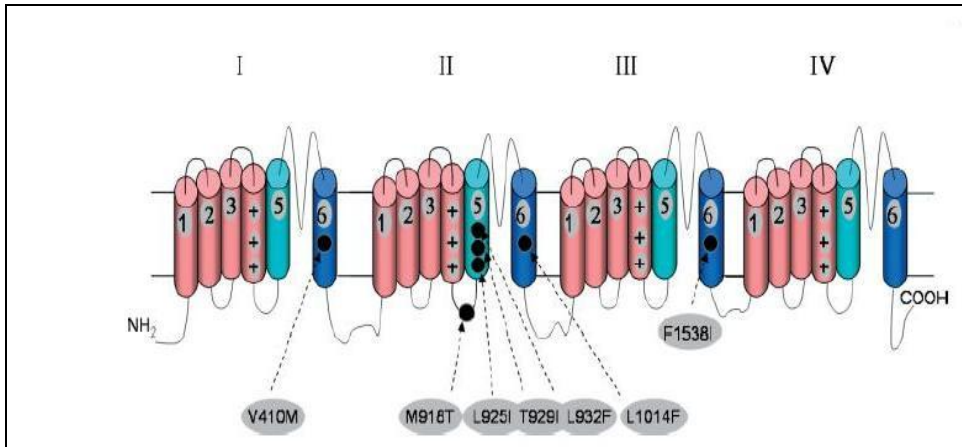
Lüleyap ve Kasap (2000), yaptıkları iki basamaklı çalışmada insektisit uygulamasının yoğun olduğu Tabaklar ve Herekli köyleri ile nispeten daha az insektisit kullanılan Menekşe köylerinden toplanan *An. sacharovi* dişileriyle ve *An. sacharovi*'nin laboratuvar kolonisi dişileriyle hem insektisit duyarlılık testleri hem de AChE ve GST enzimleri ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Çalışılan enzimlerde saptanan aktivite değerlerinin, dirençli örneklerde duyarlılara göre daha yüksek olduğu, gonoaktif dönemdeki örnekler de, yağlanmış sezondaki örneklere göre daha yüksek olduğu ve yoğun insektisit kullanılan lokalitelerdeki enzim aktivitesinin insektisitlerin az ya da hiç kullanılmadığı lokalitelere göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Hassasiyet test sonuçları ve enzim aktiviteleri arasında yüksek uyumluluk bulunmuştur.

Ahoua Alou vd. (2010) Fildişi Sahili'ndeki *Anopheles gambiae* populasyonlarındaki duyarsız AChE mekanizmasının coğrafik yayılımını ve buna bağlı karbamat ve organofosfat grubu insektisitlere karşı gelişen direnç düzeyini araştırmışlardır. Yaptıkları denemelerle *An. gambiae* s.s.'nin test edilen tüm populasyonlarının karbamat grubu insektisitlere direnç geliştirdiğini, ek olarak 2'si hariç (Toumadi ve Tiassale) test ettikleri 6 populasyonda organofosfatlara karşı direnç geliştiğini göstermişlerdir. *An. gambiae* türünün moleküler M ve S formlarıyla yapılan çalışmalarda, hem M hem de S formlarında sıklığı % 30.9-35.2 arasında değişen oranlarda G119S mutasyonu ve buna bağlı duyarsız asetilkolinesteraz (AChE1) fenotipleri tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Djogbénu ve arkadaşları (2010), laboratuvar koşullarında *Anopheles gambiae*'nin 2 farklı soyunun *Ace-I* gen lokusu ve G119S mutasyonunun var olup olmaması açısından homozigotluk durumunda değişiklik gösterdiğini bulmuşlardır.

Başkurt vd. (2010) Ege ve Orta Anadolu'da 16 farklı lokaliteden topladıkları karasinek örneklerinden elde ettikleri *Ace-I* geninde, 3 amino asit pozisyonunda 13 farklı kombinasyon meydana geldiğini göstermişlerdir. Ancak, araştırmacıların elde ettikleri veriler değişken olup, moleküler analizleri yapılan karasineklerin direnç fenotipleri ile moleküler genetik geçmişleri arasında kesin bir ilişki bulunmamıştır. Moleküler ve biyokimyasal seviyede bu çalışma kapsamında elde edilen veriler sahada / arazide direnç gelişimi ve yönetimi ile ilgili ciddi kontrol problemleri olduğunu göstermektedir.

2.3.1.2. DDT ve piretroidlere karşı nöron duyarlılığının azaltılması

Böcek sinir sisteminin *para* voltaj-duyarlı sodyum kanalı (Na_v) ilk olarak 1980'lerin sonunda *Drosophila melanogaster*'dan izole edilmiş ve kanalın 2108 amino asit içerdiği belirlenmiştir. Bu nedenle, adını *Drosophila*'nın X kromozomunun *para* lokusu içindeki yerleşiminden almıştır (Loughney vd., 1989). *Drosophila*'daki Na_v kanalının yapısal ve fonksiyonel olarak memeli Na_v kanalının α -alt ünitesine homolog olduğu bulunmuştur. α -alt ünitesini biçimlendiren por, her biri 6 adet transmembran sarmal segmentinden (S1–S6) meydana gelmiştir (Catterall, 2000). Akson zarı ile birlikte S5 ve S6 segmentleri merkezi bir iyon iletili poru meydana getirirken, S1 ve S4 segmentleri kanalın “voltaj-duyarlı” kısmını oluşturmaktadırlar (Şekil 2.1). Voltaj duyarlı sodyum kanalı proteinleri sinir hücrelerinin zarlarında bulunmakta ve sodyum iyonlarının iletiminden ve zar potansiyelindeki değişikliklere cevap olarak açılıp kapanmasından sorumludurlar. Bu kanalların düzgün işlevi sinir impulslarının normal iletimi için gereklidir. İnsektisitlerin bağlanması sonucu bozulan bu işleyiş sonucu böceklerde paraliz ve ölüm meydana gelmektedir. Voltaj duyarlı sodyum kanalı genlerindeki proteinlerin amino asit dizilimini değiştiren çok sayıda kalıtsal nokta mutasyonunun bir çok tarımsal zararlıda ve hastalık vektörlerinde DDT ve piretroid grubu insektisitlere karşı direnç gelişimini sağladığı gösterilmiştir (Davies vd., 2007; Dong, 2007).



Şekil 2.1. Voltaj duyarlı sodyum kanalı (*kdr* ve süper *kdr* insektisit direnci ile ilişkili olan bazı mutasyonların yeri ve adları • ile gösterilmiştir, Davies vd., 2008).

DDT ve piretroid grubu insektisitlere karşı gelişen bu direncin temelinde, bu insektisitlerin hedef bölgesi olan voltaj duyarlı sodyum kanal geninin (*Vssc1*) ürünü olan kanal proteininin amino asit dizisinde değişimlere neden olan mutasyonlar bulunmaktadır (Çizelge 2.1). *Kdr* olarak bilinen bu tip direnç pek çok böcek türünde gösterilmiştir. *Kdr* ile ilgili çalışmaların çoğunda model organizma olarak karasinek (*Musca domestica*) tercih edilmiştir (Soderlund ve Knipple, 1999). Karasinekte *kdr* direnci ilk olarak 1951 yılında tanımlanmış ve bunun DDT'nin ilkin paralitik etkisine karşı olduğu görülmüştür (Busvine, 1951, Milani 1954). Aksonal sodyum kanalının insektisit bağlanma bölgesinde tek bir amino asit değişikliği *kdr* mutasyonuna bu da DDT ve piretroidlere çapraz direnç gelişimine yol açmaktadır (Soderlund ve Bloomquist, 1990; Miyazaki vd., 1996; Williamson vd., 1996; Soderlund, 1997, Çakır ve Yamanel, 2005). DDT ve piretroidlerin etkilerini sinir sisteminin voltaj duyarlı sodyum kanallarının fonksiyonunu değiştirerek gösterdikleri bilinmektedir (Sattelle ve Yamamoto, 1988; Bloomquist, 1993; Soderlund, 1995; Narahashi, 1996). Bu insektisitler kanalın kapılma kinetiklerini değiştirerek inaktivasyonun yavaşlamasına ve dolayısı ile membran depolarizasyonu ile ilişkili olan sodyum akışının devam ettirilmesine sebep olmaktadır. Bu da aksiyon potansiyelinin kontrol edilememesine, kontrolsüz patlamalara ve ölüme sebep olmaktadır. Bu yüzden, *kdr* direncinin altında yatan mekanizmayı anlama çalışmaları öncelikle voltaj duyarlı sodyum kanallarının farmakolojisi ya da ekspresyonlarının değişikliklerine dayalı olarak yapılmıştır (Soderlund ve Bloomquist, 1990; Bloomquist, 1993; Soderlund, 1997, Soderlund ve Knipple, 1999).

Karasineklerle yapılan daha sonraki çalışmalarda, *Vssc1* genindeki iki nokta mutasyonunun *kdr* direncine sebep olduğu belirlenmiş ve bu genin kısmi ve tam dizilerinin karşılaştırılması ile duyarlı, *kdr*'li ve süper-*kdr*'li fenotipler belirlenmiştir (Famham vd., 1987; Ingles vd., 1996; Williamson vd., 1996). *Kdr* ve süper-*kdr* fenotiplerinde belirlenen iki nokta mutasyonundan ilki 1014. amino asit pozisyonundaki Lösin'in Fenilalanin'e değişimini sağlayan mutasyondur ve bu mutasyon hem *kdr*, hem de süper-*kdr* fenotiplerinde bulunmaktadır. İkincisi ise 918. amino asit pozisyonundaki Metionin'in Treonin'e dönüşmesine sebep olan mutasyondur ve sadece süper-*kdr* fenotipine sahip soylarda görülmektedir (Ingles vd., 1996). Karasineklerde Lösin-Fenilalanin değişimi belirlenmişken, aynı noktada *Heliothis virescens*'te Lösin-Histidin değişimi, Çin'deki *Culex pipiens*

soyları ile Kenya'daki *Anopheles gambiae* soylarında Lösın–Serin değişimi belirlenmiştir (Soderlund ve Knipple, 1999).

Çizelge 2.1. Böceklerde voltaj duyarlı sodyum kanallarında değişimlere neden olan nokta mutasyonları

Türler	Tanımlanmış mutasyonlar	Kaynaklar
<i>Anopheles gambiae</i>	L1014F L1014S	Martinez–Torres vd., (1998) Ranson vd., (2000)
<i>Bemisia tabaci</i>	M918V; L925I	Morin vd. (2002)
<i>Blattella germanica</i>	L1014F ^b ; L1014F+D59G+E435K+C785R +P1999L ^b	Miyazaki vd. (1996); Dong, (1997); Liu vd. (2000)
<i>Boophilus microplus</i>	F1538I	He vd., (1999)
<i>Culex pipiens</i>	L1014F; L1014S	Martinez–Torres vd. (1999a)
<i>D. melanogaster</i>	I253N; A1410V; A1494V; M1524I	Pittendrigh vd., (1997)
<i>Helicoverpa armigera</i>	D1549V + E1533G	Head vd. (1998)
<i>Heliothis virescens</i>	L1014H V410M D1549V + E1533G	Park ve Taylor, (1997) Park vd., (1997) Head vd., (1998)
<i>L. decemlineata</i>	L1014F	Lee vd., (1996)
<i>Musca domestica</i>	L1014F; L1014F+M918T	Ingles vd. (1996b); Miyazaki vd., (1996) Williamson vd. (1996)
<i>Myzus persicae</i>	L1014F	Martinez–Torres vd., (1999b)
<i>Pediculus capitis</i>	T929I + L932F	Lee vd., (2000b)
<i>Plutella xylostella</i>	L1014F+T929I	Schuler vd., (1998)
<i>Hematobia irritans</i>	L1014F + M918T	Guerrero vd., (1997)

Kdr, DDT ve piretroid insektisitlerine karşı sinir duyarsızlığı sağlayan bir hedef – bölge direnç mekanizmasıdır. *Musca domestica*’da para-tip sodyum kanal geninin moleküler olarak çoğaltılması sonucu *kdr* ve süper-*kdr* direnç fenotipleri ile ilişkili iki amino asit mutasyonu bulunmuştur. Bu mutasyonların diğer böcek türlerinde de mevcut olup olmadığını belirlemek için Martinez–Torres vd. (1997) sodyum kanalının Domain II bölgesinden korunmuş dizileri temel alarak dejenere primerler dizayn etmişler ve elde ettikleri bu primerleri, 4 farklı böcek takımından 8 böcek türünün insektisit–duyarlı soylarında Domain II bölgesinin PZR ile çoğaltılmasında kullanmışlardır. Primerler her bir böcek türünün para-tip sodyum kanalı dizisi ile % 85 oranında amino asit uyumu göstermiştir. Direncin moleküler

temelini araştırmak için, karasineğin *para*-tip sodyum kanal geninin 6.3 kb'lık tüm kodlama dizisini kopyalayarak duyarlı, *kdr*'li, *süper-kdr*'li soyların karşılaştırmalı dizileme çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Karasinekle yapılan çalışmalardan elde edilen tüm dizilerin *kdr* ve *süper-kdr* direnç fenotipleri ile ilişkili olan pozisyonlarda “duyarlı” Lösin ve Metiyonin dizilerini içerdiğini göstermişlerdir.

Martinez-Torres vd. (1998) Afrika'da sıtmanın en önemli vektörü olan *Anopheles gambiae* s.s.'da piretroid direncini belirlemeye yönelik yaptıkları moleküler çalışmalarla, piretroid direncinin oluşmasıyla ilgili önemli bir mekanizma olan voltaj duyarlı sodyum kanal proteinlerindeki bir modifikasyon ile *para*-tip sodyum kanal genleri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmışlardır. *An. gambiae* s.s.'nin piretroid dirençli olan örnekleriyle yaptıkları çalışmada sivrisineklerin genomundan PZR-temelli diagnostik bir test yöntemini kullanarak araştırma bölgesinden elde edilen 7 *An. gambiae* s.s. örneğinin 6 tanesinde direnç mutasyonunu bulmuşlardır. Bu test ile doğal sivrisinek populasyonlarında heterozigot durumda bile, *kdr*-benzeri allellerin hızlı bir şekilde tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

Williamson vd. (2003) *Drosophila*'nın *para* sodyum kanalının ilgili bölümüyle %99 oranında amino asit benzerliği gösteren *Msc* olarak adlandırılan karasinek sodyum kanal geninin ilgili kısmını içeren cDNA kopyalarının çoğaltmışlardır. Böcek DNA'sından Sourthern Blot yöntemini kullanarak, duyarlı, *kdr*'li ve *süper-k dr*'li karasinek soylarında *Msc* lokusundaki polimorfizmleri belirlemişler ve direnç ile polimorfizmler arasında sıkı bağlantı olduğunu, bunun da sodyum kanalı ile yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Kazanidou vd. (2009) voltaj duyarlı sodyum kanalı ve *Ace-1* genindeki 5 nükleotit polimorfizmini eş zamanlı belirleyebilmek için yeni bir multipleks PIRA-PZR methodu geliştirmişlerdir. Yöntem *kdr* ve *Ace-1* lokusunu eş zamanlı genotipleme için tek basamaklı bir PZR reaksiyonunu, bunu takiben gerçekleştirilen 2 restriksiyon kesim reaksiyonunu ve agaroz jel elektroforeziyle görüntülemeyi kapsamaktadır. İki primer seti multipleks PZR reaksiyonu için birleştirilmiştir. İlk primer seti *Ace-1* genini kısmi olarak çoğaltmakta ve *Alu-1* enzimi ile kesim sonrası elde edilen bant büyüklüğü ve sayısına göre dirençli ve duyarlı allellere sahip bireyler belirlenebilmektedir. İkinci primer seti *kdr* lokusuna ait kısmi çoğaltmaktadır, çoğaltılan DNA'nın enzimlerle kesimi sonucu 3 tip *kdr*

allelinin belirlenmesini sağlamaktadır. Geliştirdikleri bu yöntem önemli bir sıtma vektörü olan *An. gambiae*'de insektisit direnci ile ilişkili olan iki lokusun eş zamanlı belirlenmesini sağlayan ilk yöntemidir.

Syafruddin vd. (2010) Endonezya'nın çeşitli bölgelerinden yakalanan 95 *Anopheles* örneğini kullanarak, voltaj duyarlı sodyum kanalı geninin mutasyonla ilgili kısmına ait dizileri elde etmişler ve *kdr* allelinin varyasyonunu belirlemişlerdir. Çalışma alanı içinde yer alan bölgelerden sadece, Güney Lampung bölgesindeki *An. sudaicus*, *An. acanitus*, *An. subpictus* ve *An. vagus* türlerinde 1014F allelinin varlığı gösterilmiştir.

2.3.1.3. Klorlanmış siklodienlere karşı nöron duyarlılığının azaltılması

GABA reseptörleri, nikotinik asetilkolin reseptörlerini de kapsayan nörotransmitter reseptörlerine ait süper ailede yer alan reseptörlerdir. GABA, merkezi sinir sisteminde sinaptik köprülerde birincil nörotransmitter inhibitörüdür (Hemingway ve Ranson, 2000). Klorlanmış siklodienler GABA inhibitör etkisini engelleyerek ölüme sebep olmaktadır. Hedef bölgedeki değişiklikler sebebiyle siklodienlere karşı gelişen direnç *Drosophila*'da (ffrench-Constant & Roush, 1991; Steichen ve ffrench-Constant, 1994), *Ae. aegypti*'de (Thompson vd., 1993), *Blattella germanica*'da (Kadous vd., 1983), *Tribolium castaneum*'da (Lin vd., 1993; Andreev vd., 1994), *Musca domestica*'da (Anthony vd., 1991) ve *Bemisia tabaci*'de (Anthony vd., 1995) gösterilmiştir. GABA-reseptör klorür iyon kanal protein geni kopyalanmış ve insektisit duyarlı *D. melanogaster* soylarıyla yapılan çalışmalarla (ffrench-Constant vd., 1991) dizisi çıkartılmıştır. Kanalda meydana gelen bir mutasyon ile ortaya çıkan tek bir amino asit yer değişiminin (Alanin → Serin) duyarlı ve dirençli soylar arasındaki tek belirgin fark olduğu gösterilmiştir (ffrench-Constant vd., 1993b). Böcek GABA reseptörü avermektin ve siklodien gibi piretroidlerin de etki yeri olarak gösterilmektedir (Hemingway ve Ranson, 2000).

2.3.2. Detoksifikasyon / Metabolik Direnç Mekanizmaları

Bu direnç mekanizması insektisitleri hedef bölgelerine ulaşmadan metabolize eden ya da ayıran enzimleri içermektedir. Ana ksenobiyotik metabolizması enzimlerini kodlayan genlerin aşırı ekspresyonu sivrisineklerdeki insektisit direncinin en yaygın sebebidir. İsektisitlerin hedef bölgeye ulaşmadan parçalanması esasına

dayanan bu mekanizmada insektisitlerin ya metabolizasyon hızlarının artırılması, ya da daha az toksik olan öncü bileşiklere dönüştürülmesi gözlenir. İnsektisit metabolizasyonunun artırılması da; ya farklı enzim formlarının bulunuşu ya da duyarlı bireylerde az bulunan enzim miktarının artırılması şeklinde olur (Hemingway ve Ranson, 2000).

Organoklorlu, organofosfatlı, karbamat ve piretroid grubu insektisitlere karşı metabolik olarak dirençten sorumlu 3 ana enzim grubu bulunmaktadır. Bunlar; Esterazlar, GST'ler ve Monooksijenaz'lardır (Hemingway and Ranson 2000). Esteraz enzimleri feromon ve hormon metabolizması, sindirim sistemi ve sinir iletimi, insektisitlere direnç gibi birçok mekanizmada rol oynamaktadır (Yorulmaz ve Ay, 2010). Organofosfat grubu insektisitler fosforik asit esterleridir ve bu mekanizma organofosfatlara karşı olan ana mekanizma olarak gösterilmektedir (Karunaratne, 1998). Organofosfatlı insektisitlerin esterazların inhibitörü olduğu bilinmektedir (Çakır ve Yamanel, 2005). Gen amplifikasyonu ile miktarlarını arttırarak direnç oluşumuna yol açmaktadırlar (Akıner, 2009). Daha yaygın olarak organofosfat ve karbamat grubu insektisitlere karşı oluşan direnç mekanizması içinde yer alırken, nadir oranda da piretroid grubu insektisitlere karşı gelişen dirençte etkili olmaktadır. Esteraz geninin çoklu amplifikasyonu ile direnç oluşumu, *Cx. tarsalis*, *Cx. tritaeniorhyncus* gibi önemli vektör sivrisinek türlerinde tespit edilmiştir ve yaygın olarak biyokimyasal ve moleküler seviyede *Culex*'lerde ve afid *Myzus persicae*'da çalışılmıştır. Çeşitli *Anopheles* ve *Aedes* türlerindeki farklı esteraz direnç mekanizmaları ile ilgili çalışmalar süregelmektedir (Hemingway ve Ranson, 2000).

Oksidatif metabolizmanın artırılması, klorlanmış siklodienler hariç, insektisit grupları için en büyük ve en genel direnç mekanizmalarından biridir (Ranson vd., 2000). Enzim düzenlenmesiyle oksidatif metabolizma artışı, CytP₄₅₀ bağımlı mikrozomal monooksijenazlarla olur (Çağlar ve Skavdis, 2008). Bu enzim grubu böceklerdeki detoksifikasyon enzim sistemlerinin üzerinde en yoğun olarak çalışılan grubudur ve böceklerde gelişme, büyüme, beslenme, bitki toksinlerine tolerans ve insektisit direnci gibi pek çok fonksiyona sahiptir (Scott, 1999). Monooksijenazlar; piretroid metabolizmasında, ksenobiyotik metabolizması, endojen metabolizmasında, organofosforlu insektisitlerin aktivasyon ya da de-aktivasyonunda, daha nadir olarak da karbamat grubu insektisitlere direnç mekanizması içinde yer almaktadırlar.

Glutatyon-S-transferazlar, oldukça geniş oranda ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan dimerik çok yönlü enzimlerdir. Bu enzimler, lipofilik bileşiklerin elektrofilik merkezlerindeki indirgenmiş Glutatyon'un nükleofilik atağını katalizlemektedirler. Çok sayıda böcekte yapılan çalışmalarla direnç ile artan GST aktivitesi gözlenmiştir (Ranson vd., 2000; Che-Mendoza vd., 2009) *Aedes aegyptii* ve *An. gambiae*'deki insektisit direnç mekanizmasında GST'lerin rol oynadığı bildirilmiştir (Hemingway ve Ranson, 2000).

2.4. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi

Restriksiyon endonükleaz enzimleri DNA moleküllerinin hassas ve tekrar edilebilir bir biçimde kesilmesini sağlayan ve 1968 yılında keşfedilmiş bakteri enzimleridir (Linn ve Arber, 1968; Meselson ve Yuan, 1968). Restriksiyon endonükleazlar DNA üzerindeki bazı özel dizileri tanır ve DNA'yı bu dizilerden keserler (Çizelge 2.2). Her bir enzim DNA molekülünü kestiği spesifik bir tanıma dizisine sahiptir. Farklı bakteri suşlarından, farklı sayıda bazdan oluşan ve farklı tanıma dizisine sahip, farklı enzimler elde edilebilmektedir. DNA üzerindeki restriksiyon tanıma dizilerinde oluşan herhangi bir nükleotit değişimi restriksiyon enziminin o bölgeyi tanıyarak kesmesini ya da kesmemesini sağlar. Böylece, aynı restriksiyon enzim kullanılarak kaynağı farklı DNA molekülleri kesildiğinde, farklı uzunlukta DNA parçaları oluşabilmektedir (Bardakçı vd., 2009).

Çizelge 2.2. Araştırmalarda kullanılan bazı restriksiyon endonükleaz enzimleri ve tanıma dizileri

Enzim	Organizma	Tanıma Dizisi
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	AGATCT
<i>PvuI</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CGATCG
<i>PvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGCTG
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	AAGCTT
<i>HinI</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	GANTC
<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	GATC
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGTC
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA

Restriksiyon uzunluk polimorfizmi metodu (RFLP), restriksiyon endonükleazlar kullanılarak DNA'nın kesimine dayanır. Restriksiyon sindirimi, orijinal molekülde endonükleaz için tanıma dizilerinin kesim pozisyonlarına bağlı olarak çeşitli sayıda DNA parçalarıyla sonuçlanmaktadır. RFLP kesim ürünlerinin analizi genellikle agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi ile yapılmaktadır. Kesim ürünleri jel elektroforezinde yürütüldüğünde bir kesim profili (görüntüsü) ortaya çıkmaktadır. Jel profilinde oluşan farklılıklar, tanıma bölgelerindeki nükleotit polimorfizmlerinin varlığını belirtmektedir. Bu yöntem, dolaylı olarak nükleotid değişiminin varlığını gösterir ve PZR ile çoğaltılmış belirli bir gen bölgesi, tanımlanmış özel mutasyonlara karşı uyumlu restriksiyon enzimi ile taranabilmektedir. Analiz edilen gen bölgesi, jel profilindeki bantların sayılarına, büyüklüklerine bakılarak genotiplenebilmekte ve lokusa ait genotip/allel sıklıkları belirlenebilmektedir.

2.5. İnsektisit Direncinin Genetiği

İnsektisit direnç genetiği ile ilgili çok sayıda hipotez bulunmakla beraber bunlardan iki tanesi ön plana çıkmaktadır. Neo – Darwinian Hipotezi, çok sayıda mutasyon oluşumunu ve bunların birikmesi ile değişim meydana geldiğini öngörmektedir (Moore, 1984). Fakat doğal populasyonlarda insektisit direnci, tek bir ana genin değişmesiyle oluşan bir mekanizma olduğu için, direnç gelişiminde bu hipotezin geçerli olmadığı görülmektedir.

Düzenleyici gen hipotezi ise, yapısal genin ifadesi ile zamanını ve doğasını kontrol ettiği çok sayıda gen, direnç gelişiminde uyumsal çeşitliliğe genetik temel sağlamaktaymış gibi görünmektedir (Levin, 1984). Düzenleyici genlerdeki değişimler üzerine genetik ve biyokimyasal veriler insektisit direncinde önemli bir noktadır.

Karasineklerle yapılan çalışmalarda dört ana gen grubu tanımlanmıştır:

1. *pen*- İnsektisit alımını azaltan gendir ve 3. kromozomda bulunur. Resesif olarak kalıtılmaktadır ve yüksek oranda direnç oluşturmaz. Bu genin diğer direnç genlerini düzenleyici öneme sahip olduğu düşünülmektedir.
2. *kdr*- DDT ve piretroidlere karşı direnç sağlamaktadır ve 3. kromozomda *pen* lokusundan farklı olarak resesif olarak kalıtılmaktadır.
3. *dld-r*- Dieltrin ve diğer siklodien grubu insektisitlere direnç sağlamaktadır. 4. kromozomda lokalize olmuştur ve tamamen resesif olarak kalıtılmaktadır.

4. *AChE-R*- Asetilkolinesterazın değiştirilmesinden sorumlu olan gendir. Organofosfat ve karbamat grubu insektisitlere karşı direnç sağlamaktadır. 2. kromozomda konumlanmıştır ve kodominant olarak kalıtılmaktadır. Çok sayıda alleli farklı seviyelerde direnç oluşturmaktadır (Oppenorth, 1982).

2.6. Pestisitler: İnektisitler

Kimyasal mücadelede kullanılan maddeler geniş anlamıyla pestisitler olarak adlandırılmıştır. Pestisitler, özellikle de tarımsal üretimde sıklıkla kullanılan önemli kimyasal maddelerdir. Bu kapsamda kullanılan maddeler çoğu zaman uygulama yapılacak olan hedef organizmaya göre de farklı şekillerde sınıflandırılabilmekte ve bu ana başlık altında farklı şekillerde adlandırılmaktadır; zararlı bitkilerin mücadelesinde kullanılanlar herbisitler; mantarlara karşı yapılan uygulamalarda kullanılanlar fungusitler gibi. İnektisitler ise zararlı böceklerle mücadele kullanılan kimyasal maddelerdir (Güler ve Çobanoğlu, 1997). Bu grubun içine inhibitörler, aktivatörler, sinerjistler, kemosterilantlar, hormonal ajanlar, uzaklaştırıcılar girmektedir. Bunların içinde en başarılı sentetik insektisit ise nöro-inhibitörlerdir (Karunaratne, 1998). Kimyasal mücadele içerisindeki payları % 40 kadar olup özellikle de sanayileşme, tarımda makineleşme ve bu kimyasalların sentetik olarak üretilmesiyle çok yaygın bir biçimde kullanılmaya başlanmışlardır. Bu yaygın kullanıma paralel olarak, bilinçsiz kullanımın da etkisiyle, insektisitlerin ekosistemler üzerindeki etkileri her geçen gün artmış, doğal dengenin bozulması, çevre kirliliği, yararlı böceklerin olumsuz etkilenmesi ve zararlıların da direnç kazanması gibi pek çok olumsuzluğu da ortaya çıkartmıştır.

Pestisitlerin kullanımı, 1940'lı yıllardan itibaren modern sentetik kimyasalların üretilmesinden bu yana, devamlı artış göstererek 1980'li yıllarda maksimum kullanım seviyesine ulaşmıştır. Bu dönemden itibaren yeni aktif madde üretiminin azalması ve entegre mücadele tekniklerinin daha yaygın bir şekilde kullanılmaya başlamasından dolayı tüketimi azalışa geçmiş ve gelecekte de azalacağı yönünde işaretler ortaya çıkmıştır (Georghiou, 1986).

İnektisitler; etkilerinin hızlı olması, mevcut problemi kısa süre içerisinde çözmesi, lokal çözümler sağlayabilmesi ve her ihtiyaç duyulduğunda kolayca ulaşılabilmemesi nedeniyle çeşitli avantajlara sahiptirler (Çağlar, 1991). Ayrıca kısa sürede etki göstermesi, kimyasal mücadeleyi diğer zararlı mücadele

tekniklerine göre daha ekonomik yapmaktadır. Fiyat/fayda çerçevesinde harcanan her birime karşılık, daha fazla oranda fayda sağlayarak bunu daha da arttırabilmektedir. Kullanımının kolay oluşu ve uzun süreç alan spesifik bir eğitim içermemesi, pek çok tarımsal aktivite yanında diğer zararlılara karşı da insektisit kullanımını yaygınlaştırmaktadır (Dent, 2000). Ancak, insektisit kullanımının avantajlarının yanında, önemli dezavantajları da vardır. İnsektisit direnci, zararlıların yeniden ortaya çıkışı ve tekrar zararlı hale gelmeleri, bu bileşiklerin daha fazla oranda kullanılmaları sonucunu doğurur. Bu nedenle insektisitlerin kullanımıyla artan oranda bir etkisizlik durumu ortaya çıkar. Aşırı oranda ve tekrarlı olarak kullanım, hedef olmayan canlılar üzerinde negatif etki ve çevresel sorunları da beraberinde getirir. Diğer önemli bir dezavantajı da, kullanıcılar için risk oluşturmasıdır. Pek çok insektisit yüksek oranda toksik etkiye sahiptir ve uygunsuz kullanım durumlarında insan ve diğer canlılarda zarar oluşturabilmekte veya ölüme neden olabilmektedir (Çağlar, 1991; Pedigo, 1996).

2.6.1. İnsektisitlerin sınıflandırılması

İnsektisitler etki şekillerine veya kimyasal bileşenlerine göre birkaç kategoride sınıflandırılmaktadırlar. Örneğin, etkilerine göre genel olarak mide zehirleri, temas zehirleri ve fumigantlar olarak gruplara ayrılırlar (Pedigo, 1996). İnsektisitler ayrıca doğalarına ve yapılarına göre de sınıflandırılmaktadırlar. Günümüz modern insektisitlerin çoğu organikdir ve kendi içinde doğal ve sentetik olarak ayrılabilirler. Doğal olanlar bitkilerden üretilen bitkisel insektisitler ve petrolden üretilen mineral yağlardır. Bitkisel kökenli olanlar yoğun olarak kullanılmaktayken, petrol kökenli olanlar ise bitki zararlısı olmayan canlılar ve sivrisinek larvaları üzerinde sınırlı kullanım alanına sahiptirler (Akıner, 2003; Emden ve Helmut, 2004). Günümüzde en yaygın ve yoğun olarak basit bileşiklere kimyasal eklemeler yapılarak üretilen sentetik insektisitler kullanılmaktadır ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaktadır. Bazı bileşik grupları ise aktif içerik yapısına göre isimlendirilmektedir. Böceklerle mücadelede Organoklorlu, Organofosforlu, Karbamat ve Piretroid olmak üzere 4 temel insektisit grubu yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak gelişim düzenleyiciler (juvenil hormon analogları) ve biyolojik preparatlar da iki ayrı grup insektisit olarak sınıflandırılmaktadır (Alten ve Çağlar 1998; Çakır ve Yamanel, 2005).

2.6.1.1. Organoklorlu insektisitler

Organoklorlu insektisitlerin birinci derecede etki yerleri böceklerin sinir sistemidir (Yavuz ve Şanlı, 1999). Bu insektisitler ATP'azları da inhibe edebilmektedirler. Bu gruptan, DDT en iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılmış olan bir insektisittir. İlk defa 1946 yılında kullanılmıştır ve 1947'de ilk DDT direnci *Aedes tritaeniorhynchus* ve *Aedes sollicitans*'da görülmüştür (Brown, 1986). DDT kullanımından sonra dieldrin, aldrin, lindan gibi çok sayıda klorlu insektisit türü geliştirilmiş ve satışa sunulmuştur (Yavuz ve Şanlı, 1999; Ayad vd., 1975).

1970'ten sonra DDT ve birçok klorlu hidrokarbon bileşiklerinin doğada kabul edilemeyecek kadar uzun kalmaları ve biyolojik yükseltgenmeleri nedeniyle kullanımları yasaklanmış ya da sınırlandırılmıştır (Davies vd., 2007).

2.6.1.2. Organofosforlu insektisitler

Bu gruptaki insektisitler hedef enzim niteliğindeki kolinesteraz enzimi ile yapısal bütünleşme konumunda olmalarıyla karakteristiktirler fakat aslında kolinesteraz enziminin doğal substratı konumundaki asetilkolini taklit etmektedirler (Yavuz ve Şanlı, 1999). Çoğu, memeliler için toksik etkiye sahip olmakla birlikte kalıcılıkları organoklorlulara göre daha az olduğu için doğada daha az zararlıdır (Edwards, 1987). Malation, paration, diklorvas, diazinon organofosforlu insektisitlerden bazılarıdır (Yavuz ve Şanlı, 1999).

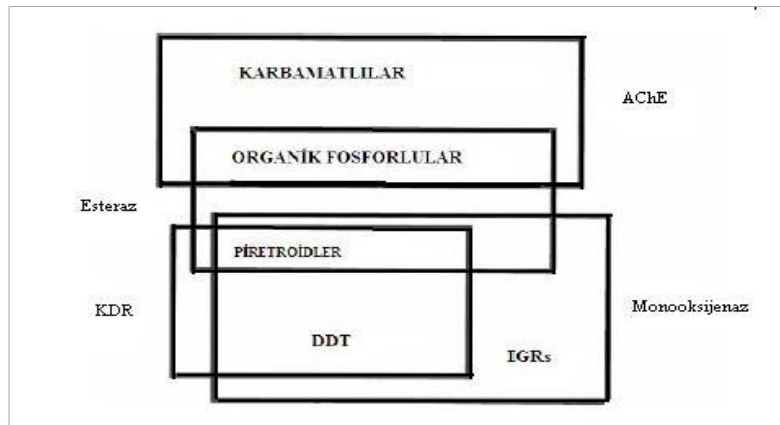
2.6.1.3. Karbamat grubu insektisitler

Karbamik asitten üretilen bu grup insektisitlerin kalıcılığı organofosfatlara yakındır. Organofosfatlar gibi asetilkolinesteraz üzerine etkili olup genellikle temas ve mide yoluyla etkili olan bu grubun üyelerinden birkaçı ise sistemik etkilidir (Çağlar ve Skavdis, 2008). Organofosfat grubu insektisitlere karşı direnç geliştiren türlerde karbamatlar etkin olarak kullanılabilirler ancak onlardan iki yönüyle farklılık göstermektedirler (Matsumura, 1985; Pedigo, 1996). Birinci fark, kolinesteraz enziminin anyonik yanı ile kompleks oluşturabilen kuaterner veya bazik nitelikli bir azot grubuna sahip olmasıdır. Organofosforlu insektisitler hiçbir zaman bazik pH'lı olamazlar. Çünkü bu durumda iyonize olabilecekleri için böceklerin kutikulasına ve sinirlerin kılıfına geçiş yetenekleri önemli ölçüde azalmaktadır. İkinci fark ise, karbamat grubu insektisitlerin kolinesteraz

inhibisyonu esasına dayanan etkilerinin belirgin derecede dönuşümlü olmasıdır. Karbaril ve karbafuran bu gruba örnek insektisitlerdendir (Yavuz ve Şanlı, 1999).

2.6.1.4. Piretroid insektisitler

Piretroidler nörotoksik insektisitlerin ana sınıfıdır. Bu insektisit gurubu *Chrysanthemum cinerariifolium*'un çiçeklerinde bulunan ve doğal olarak oluşan Krisantemik asit (piretrin I) ve Pteritik asit (piretrin II)'in sentetik analoglarıdır (Davies vd., 2007). İlk olarak 1949 yılında Cinerin 1 (Pirethrum olarak bilinen bitkisel kökenli insektisit)'in insektisit özelliğinin iki katına çıkarılması ile ilk sentetik piretroid olan Allethrin üretilmiştir. Bu insektisitlerin en önemli özellikleri, az miktarda kullanıldıklarında bile, yüksek toksik etkilerinin yanı sıra hem kovucu etki göstermeleri hem de hızlı öldürücü etkiye sahip olmalarıdır (Çağlar ve Skavdis, 2008). Voltaj duyarlı sodyum kanalı üzerine etki gösteren bu insektisitlerin kalıcılıkları azdır ve pek çoğu memelilere karşı düşük toksisite göstermektedir (Elliott vd., 1978). Piretroid grubu insektisitler, Tip-I (permetrin, tetrametrin, piretrinler vb.) ve Tip-II (spermetrin, deltametrin vb.) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Tip I grubu piretroidler knock-down etkinliği ısıyla ters ilişkili olan sinirsel boşalmalara yol açmaktadırlar ve DDT'ye benzer insektisidal etki göstermektedirler. Tip II grubu piretroidler ısı ile orantılı olarak öldürücü ve sinirsel iletimi engelleyici yönde etki yapmaktadırlar. Tip I piretroidler Ca-Mg ATP'azı Tip II'ye göre daha etkin bir biçimde inhibe etmektedirler (Yavuz ve Şanlı, 1999). Şekil 2.2'de insektisit sınıfları ve bunlar arasındaki direnç ilişkisi durumu gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Yaygın olarak kullanılan insektisit sınıfları arasındaki çapraz direnç ilişkisi (Brodgon ve McAllister, 1998).

2.7. *Anopheles maculipennis* Kompleksinin Sistematığı ve Önemi

Pek çok hastalık etmeninin vektörü olmaları sebebiyle sivrisinekler tüm dünyada entomolojik araştırmaların merkezinde yer almaktadırlar. Çok sayıda öldürücü ve salgın hastalık etmenini taşımaları nedeniyle, kan emen böcekler arasında sağlık ve ekonomi yönünden önemli bir yer işgal etmektedirler (Şahin, 1984). Her yıl milyonlarca insan sivrisineklerin vektörlük yaptığı hastalıklara yakalanmakta ve çok sayıda insan ölmektedir (WHO, 1995). Sivrisineklerin vektörlükleri insan hastalıkları açısından değerlendirildiğinde dünyanın en yaygın ve önemli hastalığı, *Anopheles* türü sivrisineklerin vektörlüğünü yaptığı sıtma. Sıtma 100 kadar ülkede endemiktir ve her yıl çok sayıda insanın ölümüne neden olmaktadır. Ülkemizde de endemik bir hastalık olarak sıtma yıllarca etkisini sürdürmüştür. 2005 yılında 2036'sı yerli *Plasmodium vivax* sıtması, 48'i dış kaynaklı (16'sı *P. vivax*, 32'si *P. falciparum*) toplam 2084 sıtma vakası bildirilmiştir. Günümüzde vaka sayısı daha önceki yıllara göre oldukça azalmış ve 2008 yılında 166'sı yerli, 49'u yurtdışı kaynaklı toplam 215, 2009 yılında da 84 sıtma vakası bildirilmiştir. Bugün, sıtma vakaları önemli oranda azalmış, ancak tam kontrol sağlanamadığından riskler ortadan kaldırılamamıştır (WHO, 2009; Dogan vd., 2010; Şimşek vd., 2010, Özbilgin vd., 2011).

Insecta sınıfının Diptera takımının Culicidae familyasının *Anopheles* cinsinde yer alan *Anopheles maculipennis* kompleksi, 1927 yılında van Thiel tarafından tanımlanmış olan ilk sivrisinek tür kompleksidir. Bu tür kompleksi, Paleartik Bölge'de yayılış gösteren *Anopheles artemievi*, *An. atroparvus*, *An. beklemishevi*, *An. daciae*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis* s.s., *An. martinius*, *An. melanoon*, *An. messeae*, *An. persiensis* ve *An. sacharovi* türlerini kapsamaktadır (White, 1978; Proft vd., 1999; Sedaghat vd., 2003; Nicolescu vd., 2004; Kampen, 2005; Linton vd., 2007).

Ülkemizde *Anopheles maculipennis* kompleksi ile ilgili yumurta morfolojisi kullanılarak yapılan çalışmalarda, komplekse ait *Anopheles maculipennis* s.s., *An. sacharovi*, *An. subalpinus*, *An. melanoon* ve *An. messeae* türlerinin varlığı bildirilmiştir (Parris, 1959; Merdivenci, 1984). Türkiye Anophelinae faunası üzerine Postiglione vd. (1973)'nin yaptıkları morfolojiye dayalı taksonomik çalışmada, daha önceki çalışmalarda Türkiye'den kaydı verilen *An. messeae* ve *An. melanoon* türlerinin hatalı teşhise dayandığı belirtilmiş ve daha önce *An. elutus* olarak bildirilen *An. sacharovi*'nin varlığı desteklenmiştir. Ayrıca araştırmacılar,

An. subalpinus'un da *An. melanoon*'un alt türü olarak Göller bölgesi, Marmara ve Orta Karadeniz bölgesinde sınırlı habitatlarda bulunduğunu ifade etmişlerdir. Ramsdale vd. (2001) ise yine yumurta morfolojisine dayanarak, komplekse ait yalnızca *Anopheles maculipennis* s.s., *An. sacharovi*, *An. subalpinus* (*An. melanoon*'un sinonimi) türlerinin ülkemizde bulunduğunu kabul etmektedir. Oysa sıtmanın tehlikeli bir sorun olduğu ülkemizde komplekse ait hangi türlerin hangi bölgelerimizde bulunduğunun bilinmesi (birçoğu sıtma vektörüdür) oldukça önemlidir. Çünkü ikiz türler olsalar da, beslenme davranışları, sıtma parazitine karşı duyarlılıkları ve buna bağlı olarak da vektör kapasiteleri oldukça farklılık göstermektedir (Jetten ve Takken, 1994). Bu nedenle, son yıllarda hem diğer ülkelerde hem de ülkemizde *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinin net bir şekilde tespit edilebilmesi için kompleks türlerinde orta ve yüksek değişkenliği olan genom bölgelerinin dizi analizlerinin yapıldığı DNA çalışmaları oldukça artmıştır. Bu çalışmalarda, çoğunlukla, nükleer rDNA ITS 2 (second internal transcribed spacer) ve Mitokondriyal sitokrom-c oksidaz geni (COI) dizileri kullanılmış ve *Anopheles maculipennis* kompleksi ile ilgili pek çok taksonomik sorun çözülmüştür (Romi vd., 2000; Linton vd., 2001; Linton vd., 2002; Boccolini vd., 2003; Nicolescu vd., 2004; Linton vd., 2007; Şimşek vd., 2011; Sevgili ve Şimşek, 2012). Böylece *Anopheles maculipennis* kompleksi türleri arasındaki farklılıkların saptanabilmesi mümkün olmuştur ve bu çalışmalarla tür komplekslerindeki taksonomik sorunların çözümünde önemli başarılar elde edilmiştir. Diğer ülkelerde yapılan bu çalışmaların sonuçlarına göre, ülkemizde *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinin hangilerinin bulunabileceğine dair önemli öngörüler oluşturulmuş ve son olarak Şimşek (2011) ve Sevgili ve Şimşek (2012)'in nükleer rDNA ITS 2 dizi analizlerine dayanarak yaptıkları çalışmalar sonucunda, ülkemizde bu kompleksin *Anopheles maculipennis* s.s., *An. melanoon* ve *An. sacharovi* olmak üzere üç türünün bulunduğu tespit edilmiştir.

Bugün Paleartik bölgede 11 türden oluştuğu kabul edilen *Anopheles maculipennis* kompleksi önemli bir tür grubu olarak genel bir kabul görmüştür. Çünkü, kompleks türlerinden *An. atroparvus*, *An. labranchiae* ve *An. sacharovi*'nin Paleartik bölgede günümüzde ve geçmişte oldukça etkili sıtma vektörleri oldukları bilinmektedir. Ayrıca, *An. maculipennis* ve *An. messeae* türlerinin de sıtmanın taşınmasında zaman zaman belirli bölgelerde etkili olduklarından şüphelenilmektedir. Avrupa, Kuzey Afrika ve Orta Doğu coğrafyasında en önemli sıtma vektörleri *An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An.*

pharoensis, *An. sacharovi*, *An. sergentii*, *An. stephensi* ve *An. superpictus* olarak bilinmektedir. Bu türlerden *An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. sacharovi* *An. maculipennis* kompleksi türleridir. Bu üç türün haricinde yine kompleks türlerinden *An. messae* ve *An. maculipennis* s.s'nun kümes hayvancılığının ve çiftlik hayvancılığının çok az yapıldığı alanlarda yüksek yoğunlukta bulunmaları durumunda sıtma taşınımından sorumlu olabilecekleri belirtilmektedir (Becker vd., 2003). Ülkemizin de bulunduğu Doğu Akdeniz havzasında da en önemli sıtma vektörü tür *An. sacharovi* olup, ikincil derecede önemli oldukları kabul edilen türler *An. superpictus*, *An. maculipennis* s.s. ve *An. melanoon* olarak belirtilmektedir (Kasap, 1987; 1990; Alten vd., 2000).

2.8. Ülkemizde Sivrisineklerin İnsektisit Direnci Üzerine Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde sivrisineklerin insektisit direnciyle ilgili olarak yapılan ilkin çalışmaların önemli bir kısmında WHO'nun klasik test yöntemleri kullanılmış ve sıtma vektörü olması nedeniyle *An. sacharovi* türü bu çalışmaların hedef türü olmuştur. *An. sacharovi*'de organoklorlu insektisitlere karşı ilk direnç gelişimi 1959'da belirlenmiştir (Zulueta, 1959). Bu tespit ile zamanla malation organoklorlu insektisitlerin yerini almıştır (Curtis, 1962; Kasap, 1989). Malation'a karşı direnç gelişimi ise ilk olarak 1974'te kaydedilmiş (Ramsdale, 1975) daha önceleri kapalı alanlarda hiç kullanılmamış olmalarına rağmen organofosforlu ve karbamat insektisidine karşı çapraz direnç gelişimi de belirlenmiştir (Ramsdale vd., 1980; Davidson, 1982). *An. sacharovi* ile yapılan diğer çalışmalarda, türün 1992 (Kasap vd., 1992) ve 1996 yıllarında (Lüleyap, 1996) pirimifosmetil'e karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Ramsdale vd. (1980) Orta Anadolu, Ege, Güneydoğu Anadolu ve Karadeniz bölgelerinden elde ettikleri *Anopheles* örneklerinde insektisit direncini belirlemek için WHO'nun insektisit duyarlılık testlerini uygulamışlardır. Araştırmada özellikle araziden toplanmış kan emmiş dişi sineklere ait örnekler olsa da, ülkemizin değişik yerlerinden toplanmış ve laboratuvar kolonileri oluşturulmuş türlerle de çalışılmıştır. 1974 yılında toplanmış *An. sacharovi*, *An. hyrcanus* ve *An. maculipennis* kompleksi türlerinin hem laboratuvar hem de arazi örneklerinde yapılan testler sonucunda organofosfat ve karbamat grubu insektisitlere karşı direnç geliştirdiği görülmüştür.

Hemingway (1985), sıtma kontrolünde 13 yıl önce DDT'nin yerini malation almış olmasına rağmen 1984 yılında toplanan *An. sacharovi* populasyonunda DDT direncinin hala görüldüğünü bildirmiştir. Ayrıca Çukurova'da bu türe ait populasyonlarda organofosfat ve karbamat insektisitlerine karşı direnç gözlemlenmiştir. 1989–1990 yıllarında toplanan *An. sacharovi* örneklerinde, 1984'de gözlemlenen değerlere göre daha düşük frekansta olmasına rağmen yine de DDT, organofosfat ve karbamatlara karşı direnç oluşumu bildirilmiştir (Lüleyap, 1996; Hemingway, 1992).

Kasap vd. (2000) *Anopheles sacharovi*'nin hem laboratuvar soylarını hem de Adana, Adıyaman, Antalya, Aydın ve Muğla'nın sıtmalı bölgelerinden toplanan arazi örneklerini kullanarak 12 farklı insektisitle WHO'nun insektisit duyarlılık testlerini yapmışlardır. Adana, Adıyaman ve Antalya'dan toplanan *An. sacharovi* örnekleri malation ve pirimifosmetil'e duyarlı çıkarken, Aydın'dan toplanan örneklerin hem bu insektisitlere hem de dieldrin, λ -cyhalothrin, etofenprox'a duyarlı olduğu, Muğla'dan toplanan örneklerin malation ve pirimifosmetil gibi, dieldrin, fenitrothion, λ -cyhalothrin, cyfluthrin ve etofenprox'a karşı duyarlı olduğunu bildirilmişlerdir.

Lüleyap vd. (2002) Adana bölgesinde toplamış oldukları yaklaşık 100 *An. sacharovi* örneğini kullanarak WHO'nün duyarlılık testleri yapmışlar ve test sonucunda canlı kalan 12 bireyin piretroid dirençli olduğu sonucuna varmışlardır. Araştırmacılar daha sonra, *Anopheles gambiae*'nin voltaj duyarlı sodyum kanalı geninin çoğaltılmasında kullanılan spesifik Agd1, Agd2, Agd3 ve Agd4 primerlerini kullanarak, piretroid dirençli olduğunu düşündükleri *An. sacharovi* örnekleri için de aynı genomik bölgeyi çoğaltmışlardır. Elde edilen sonuçlar, *kdr* mutasyonu ile ilişkili olan gen bölgesi çoğaltılan 12 örnekte 4'ünde, *kdr* mutasyon noktasında serin (TCG), lösin (TTG) ve fenilalanin (TTT) olmak üzere 3 farklı amino asit bulunduğunu ortaya koymuştur. *An. gambiae*'de ise lösin → fenilalanin ve lösin → serin tipinde 2 *kdr* mutasyonu bulunmuştur.

Aldemir ve Ege (2005), temephos aktif maddeli iki insektisidin (Tambro 500 EC ve Ekolarv 500 EC) laboratuvar ve doğal ortamlarda *An. sacharovi* ve *Culex pipiens* larvaları üzerindeki etkinliklerini araştırmışlar ve Ankara'nın Mogan Gölü populasyonlarıyla ve laboratuvar koşullarında yapılan denemelerde her iki türün de bu insektisitlere karşı duyarlı olduklarını belirlemişlerdir.

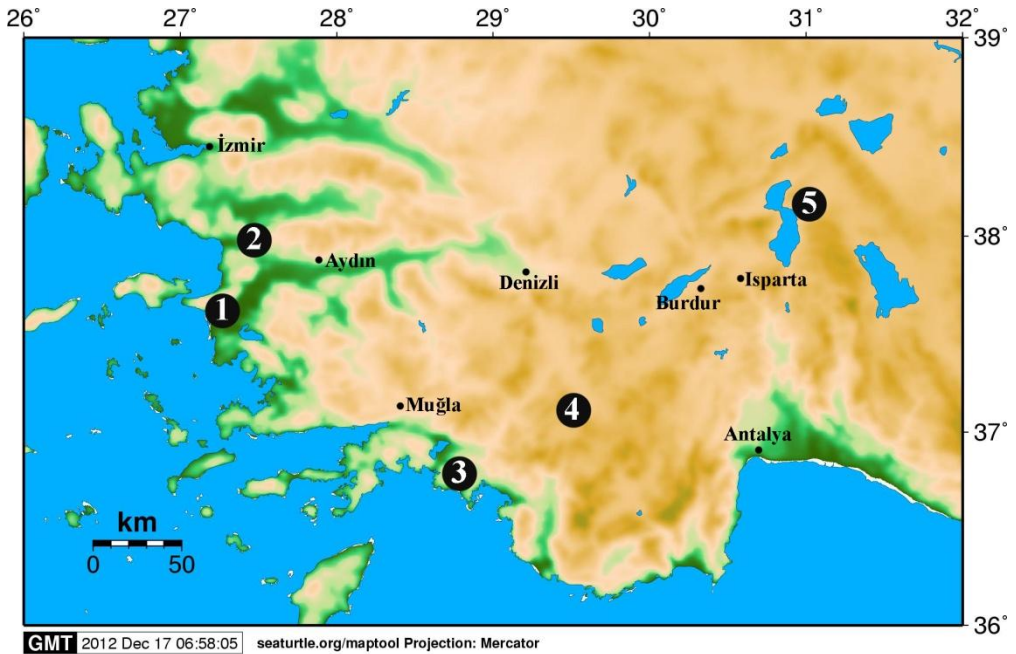
Akner vd. (2009) Birecik, Çankırı, Antalya, Viranşehir, Mersin, Ankara popülasyonlarından örneklenen *Cx. pipiens* türünde, Temephos, Fenthion, *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), *Bacillus sphaericus* (*Bs*) ve DDT, malathion, deltametrin, permetrin insektisitlerinin etkinliğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda fenthion'a karşı Birecik, Çankırı ve Antalya soylarında direnç gözlenirken, temephos'a karşı Birecik, Viranşehir, Mersin, Ankara, Antalya soylarında direnç gözlemlenmiştir. Tüm soylarda DDT'nin öldürücü dozuna karşı düşük ölüm oranı gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Öldürücü doz deneylerinde ise DDT 30 yıldır Türkiye'de sivrisinek mücadelesinde kullanılmamasına rağmen, tüm popülasyonlarda DDT direnci görülmüştür. Sonuçlar, *Bti* ve *Bs* larvisidlerinin larva kontrolünde çok etkili olduğunu, permetrin ve deltametrinin ise ergin kontrolünde etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Akner vd. (2008) ve (2011) yıllarında gerçekleştirdikleri çalışmalarda Türkiye'nin önemli tarımsal alanlarını seçerek, AChE, iAChE enzimlerinin metabolik aktivitesini ve insektisit direnci ile ilişkili olan Non-spesifik Esteraz (NSE), Karışık Fonksiyonlu Oksidaz (MFO) ve GST enzimlerinin metabolik aktivitesini belirlemeye yönelik araştırmalar gerçekleştirmişlerdir. AChE ve iAChE enzimleri ile yapılan çalışmada, *An. maculipennis* s.l., NSE, MFO ve GST ile yapılan moleküler ve biyokimyasal çalışmalarda *An. maculipennis* s.l ve *An. sacharovi* türlerine ait popülasyonları kullanılmışlardır. Test edilen örneklerin hepsi çalışılan her enzim için belirgin derecede farklı değerler sergilemiştir. Elde edilen veriler hem enzimler, hem de türler yönünden ek çalışmalar yapılması gerektiğini göstermiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Alanı

Bu çalışmada, Akdeniz ve Ege bölgelerinde *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinin farklı populasyonlarında DDT, Deltametrin ve Permetrin insektisitlerine karşı direnç gelişiminin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle, sosyolojik, coğrafik ve kullanım faaliyetleri açısından mümkün olduğu kadar birbirinden farklı olabileceği öngörülen Aydın, Burdur, Muğla, Isparta ve İzmir illerinin herbirinde birer adet olmak üzere beş adet örnekleme lokalitesi seçilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Örnekleme lokaliteleri (1. Tuzburgazı, 2. Belevi, 3. Kapıkargın, 4. Uylupınar, 5. Gelendost)

Bu lokalitelerden ilki, Aydın ili kapsamında, Söke ilçesinin Tuzburgazı köyüdür. Bu lokalite, Büyük Menderes Nehri havzasında, tarımsal faaliyetlerin fazla olduğu dolayısıyla da pestisit ya da insektisitlerin yoğun olarak kullanıldığı bir bölgede yer almaktadır. İkinci lokalite, İzmir ilinin Selçuk ilçesi kapsamında yer alan Belevi köyüdür. Bu lokalite, Küçük Menderes havzasında, tarımsal faaliyetlerin yanı sıra turizm faaliyetlerinin de fazla olduğu ve bu nedenle de hem tarımsal hem

de halk sağlığı alanında farklı insektisitlerin kullanıldığı bir bölgedir. nc lokalite, Muğla ilinin Dalaman ilçesinde, Kapıkargın köyüdür. Bu lokalitede hem tarım hem de turizm faaliyetleri vardır. Dördüncü lokalite, Burdur ili, Glhisar ilçesinin Uylupınar köyüdür ve Glhisar Gölü kenarında yer almaktadır. Bu lokalitede hayvancılık faaliyetleri ön plana çıkmakta olup, daha önce belirtilen üç lokaliteye (deniz seviyeleri) göre daha fazla bir yüksekliğe (1000 m kadar) sahiptir. Beşinci lokalite de dördüncü lokaliteye benzer özelliklere sahip olup, Isparta ili, Gelendost ilçesi kapsamında yer almaktadır ve hayvancılık faaliyetlerinin fazla olduğu yüksek irtifalı (1250m) bir bölgedir.

3.2. *Anopheles maculipennis* Kompleksi Populasyonlarının rnekleme

Akdeniz ve Ege bölgelerinde, *Anopheles maculipennis* kompleksi populasyonlarının örnekleme 2011-2012 yıllarının Temmuz-Ekim aylarında yapılmıştır. Örnekleme bölgeleri olarak belirlenmiş olan 5 lokalitede ahır ya da evlerden ağız aspiratörleri aracılığıyla ergin dişi *Anopheles maculipennis* kompleksi örnekleri yakalanmıştır (şekil 3.2-3.4). Yakalanan rnekler kağıt bardaklara aktarıldıktan sonra buzluklar içinde Adnan Menderes Üniversitesi Vektör Böcekler Araştırma Laboratuvarı'na taşınmıştır. Örnekleme çalışmalarının yapıldığı lokalite bilgileri izelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinin örnekleme lokaliteleri

Bölge	No	Lokalite	Koordinat (Kuzey-Doğu)	Yükseklik (metre)	zellik
Aydın	1	Tuzburgazı	37° 37' - 27° 13'	10 m	Tarım alanı
İzmir	2	Belevi	38° 00' - 27° 26'	120 m	Turizm ve tarım
Muğla	3	Dalaman	36° 42' - 28° 47'	5 m	Turizm ve tarım
Burdur	4	Uylupınar	37° 06' - 29° 37'	985 m	Dağlık, hayvancılık
Isparta	5	Gelendost	38° 05' - 30° 58'	1250 m	Dağlık, hayvancılık



Şekil 3.2. Belevi Köyü ahır lokalitesi (no: 2)



Şekil 3.3. Kapıkargın Köyü ahır lokalitesi (no: 3)



Şekil 3.4. Uylupınar Köyü'nde (no: 4) ağız aspiratörü ile örnekleme

3.3. Laboratuvar Çalışmaları

3.3.1. Morfolojik Tür Teşhisleri

Anopheles maculipennis kompleksi türlerinin tamamının birbirinden ayrımını sağlamasa da, ülkemizdeki *An. maculipennis* kompleksi türlerin ayrımında kullanılabilen yumurta morfolojisine ait yüzgeç yapısı, desen şekli, bantlanmanın olup olmaması gibi karakterler bu çalışmada da kullanılmıştır. Bu nedenle araştırma bölgeleri kapsamında örneklemeleri yapılarak laboratuvar ortamına taşınan dişi bireylerin mümkün olduğu sürece öncelikle yumurta bırakmaları için çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda lokalitelerden yakalanarak laboratuvara getirilmiş dişi sivrisineklerden kan emmiş ya da gravid dişi bireyler, diğer dişilerden ayrılarak her biri teker teker içerisinde 100 ml distile su bulunan, 200 ml'lik silindirik kağıt yumurtlatma kaplarına alınarak yumurta bırakmaları sağlanmıştır (Şekil 3.5). Daha sonra, elde edilen yumurtaların morfolojik özellikleri Leica S8 marka mikroskop ile incelenerek yumurta bırakan dişinin tür teşhisi yapılmış, tür ayrımını sağlayan yumurta örnekleri de fotoğraflanarak bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Ayrıca, *An. sacharovi* türünün dişi morfolojik karakterleriyle kompleksin diğer türlerinden ayrılabilmesi nedeniyle, laboratuvara getirilen örnekler aynı zamanda morfolojik karakterleri açısından da incelenmiş ve örneklerden *An. sacharovi* türüne ait olanlar diğer *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinden ayrılmıştır.



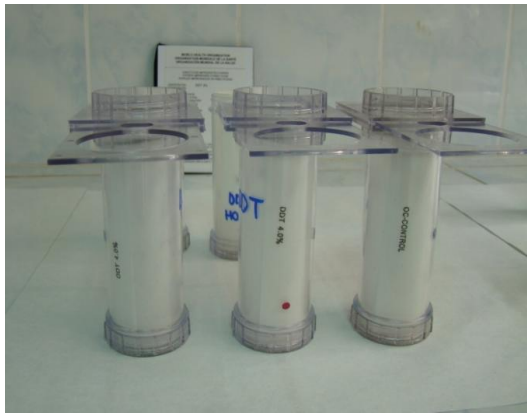
Şekil 3.5. Ergin dişilerin yumurtlatma kapları ve bırakılmış yumurtalar

3.3.2. Dünya Sağlık Örgütü İsektisit Duyarlılık Testleri

Anopheles maculipennis kompleksi populyasyonlarının örneklendiği 5 lokaliteden yakalanarak laboratuvar ortamına (70 ± 5 nispi nem ve 26 ± 2 °C) taşınan ergin dişiler ile Dünya Sağlık Örgütü tarafından standardize edilmiş (WHO, 1998) olan insektisit duyarlılık testleri yapılmıştır. Araştırmanın *kdr* üzerine olması nedeniyle yapılan testlerde sadece *kdr*'nin geliştiği organoklorlu gruptan DDT (% 4), piretroid gruptan da Deltametrin (% 0.025) ve Permetrin (% 0.75) insektisitleri için WHO tarafından standart olarak hazırlanmış olan insektisit emdirilmiş test kağıtları kullanılmıştır. Testlerin uygulanmasında lokalitelerden elde edilen örnek sayısına bağlı olarak her insektisit ve kontrol tüpü için test tüpüne 10 ya da 20 sivrisinek konulmuştur (Şekil 3.6-3.9).



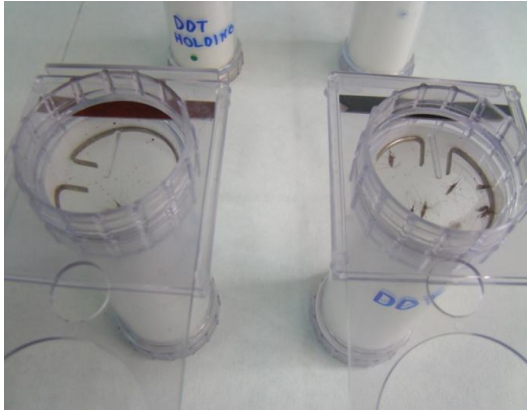
Şekil 3.6. Test tüplerine örneklerin konulması



Şekil 3.7. DDT testi için hazırlanmış test tüpleri



Şekil 3.8. Deltametrin ve permetrin testi için hazırlanmış test tüpleri



Şekil 3.9. Test tüplerinde insektisitli kağıtlarda bekletilen (1 saat) örnekler

Her bir testin başlangıç zamanından sonraki 1. saat sonunda insektisit emdirilmiş kağıtların bulunduğu tüp bölümüne konulmuş olan sivrisinekler dinlenme tüpüne aktarılmışlar ve 1. saat sonundaki ölüm oranları kaydedilmiştir. Birinci saat sonuçlarının kaydedilmesinden sonra 24. saat sonunda dinlenme tüpündeki sivrisinekler yaşayan ve ölen bireyler olarak iki gruba ayrılarak 24. saat sonundaki % ölüm oranları hesaplanmıştır. Benzer şekildeki kayıtlar kontrol tüpleri için de tutulmuş ve testler sonucunda ölen ya da canlı kalan örnekler olacak şekilde içinde % 95 etil alkol bulunan küçük kaplara aktarılıp etiketlenmiş ve +4° C’de koruma altına alınmıştır.

3.3.3. *Anopheles maculipennis* Kompleksi Örneklerinin Moleküler Tür Teşhisi

Anopheles sacharovi türü gerek yumurta korionundaki özelliklerle gerekse de ergin karakterleriyle *Anopheles maculipennis* kompleksinin diğer türlerinden ayrılabilse de araştırma bölgelerimizde varlıkları bilinen *An. maculipennis* s.s. ve *An. melanoon* türleri (Şimşek vd., 2011, Sevgili ve Şimşek, 2012) morfolojik özellikleriyle tür düzeyinde ayırlanamamaktadır. Bu nedenle, özellikle de bu iki türün dağılım yaptığı bölgelerden yakalanarak insektisit testlerinde kullanılan örneklerin moleküler tür teşhislerinin de yapılması gerekmiştir. Ayrıca, diğer bölgelere göre daha az sayıda örnekle olsa da, sadece *An. sacharovi* popülasyonlarının bulunduğu belirlenmiş olan bölgelerden yakalanan örnekler için de moleküler tür teşhisi yapılmıştır. Böylece, hem klasik hem de moleküler yöntemler kullanılarak yapılan tür teşhisleriyle insektisit direnç testlerinden elde edilecek sonuçların güvenilirliği sağlanmıştır. Moleküler tür teşhislerinde Paleartik'te dağılım gösteren *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinin ayırımında kullanışlı olan nükleer rDNA ITS 2 bölgesine ait dizileri kullanılmıştır (Marinucci vd., 1999; Linton vd., 2007). Bu amaçla öncelikli olarak moleküler tür teşhisi yapılacak örneklerin DNA izolasyonları yapılmıştır. Örneklerden genomik DNA izolasyonunda İnvitrogen PureLink genomik DNA izolasyon kiti kullanılmış ve izolasyonda aşağıda verilen protokol izlenmiştir. + 4° C'de eppendorf tüplerde koruma altına alınmış olan örneklerden DNA'sı izole edilecek olanlar kurutma kâğıdı üzerinde alkolünün uçması için birkaç dakika bekletilmiştir. Daha sonra eppendorf tüplere (1,5 ml'lik) alınarak üzerine 180 µl PureLink genomik parçalama tamponu eklenmiş ve steril makas yardımıyla mekanik olarak parçalanmıştır. Elde edilen bu karışıma 20 µl Proteinaz K (20 mg/ml) eklenmiş ve çok az vortekslenerek elde edilen karışım tüpü, 55°C'ye ayarlanmış sıcak su banyosuna yerleştirilerek parçalanmanın sağlanması için 3 ile 5 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tam olarak parçalanmamış büyük doku parçacıklarından uzaklaştırmak için örnekler maksimum hızda 3 dakika süreyle santrifüjlenmiştir ve süpernatant temiz bir eppendorf tüpe alınmıştır.

Elde edilen ürünlere, önce 20 µl RNaz A (20 mg/ml) eklenmiş, hafifçe 2-3 saniye vortekslenmiş ve 2 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Daha sonra, 200 µl genomik parçalama/bağlama tamponu eklenerek elde edilen yeni ürün vortekslenmiştir ve üzerine 200 µl % 96-100'lük etil alkol eklenerek tekrar hafifçe vortekslenmiştir.

Parçalama ve homojenizasyon sonrası elde edilen ve yaklaşık olarak 640 µl olan karışım, PureLink Genomik DNA kitinin toplama tüpü içerisindeki kolona yüklenmiştir. Yükleme yapılan kolon 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve DNA'nın kolona bağlanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Kolonun altındaki toplama tüpü yenisi ile değiştirilmiştir. Bu DNA bağlı kolon, üzerine önce 500 µl yıkama tamponu 1 ekledikten sonra 10.000 g 'de 1 dakika santrifüj edilmiş, sonra tekrar temiz bir tüpe alınarak 500 µl yıkama tamponu 2 eklenmiş ve maksimum hızda 3 dakika daha santrifüj edilmiştir. Son aşama olarak, kolona bağlanan DNA'yı kolondan ayırmak için kolona 50 µl yıkama tamponu eklenerek oda ısısında 1 dakika inkübasyona bırakılmış ve yeni bir tüp içine alınarak maksimum hızda 1 dakika santrifüj yapılmıştır. DNA'yı kolondan daha etkin bir şekilde ayırmak için bir kez daha 50 µl yıkama tamponu eklenerek, oda ısısında tekrar 1 dakika inkübasyona bırakılmış ve ardından maksimum hızda tekrar 1 dakika santrifüj yapılmış ve elde edilen DNA PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere + 4 C'de saklanmıştır.

Yukarıda verilen protokol izlenerek elde edilen genomik DNA'lardan *An. maculipennis* kompleksi türlerinin ayrılmasında kullanılacak olan rDNA ITS 2 bölgesinin çoğaltılması yapılmıştır. Bu çalışmada, her bir örneğe ait genomik DNA'lar kullanılarak, ITS 2 bölgesi 28 SR 5'-ATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3' ve 5.8 SF 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3' primerleriyle (Collins ve Paskewitz, 1996), Çizelge 3.2'de verilmiş olan reaksiyon protokolü ve Çizelge 3.3'deki çalışma programı uygulanarak Eppendorf marka (Mastercycler) PZR makinasında çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.2. *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinin rDNA ITS 2 bölgesinin PZR ile amplifikasyonunda kullanılan bileşenler

Kullanılan PZR reaksiyonu (25 µl)	Kullanılan miktar (µl)
Buffer (10X)	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	1.3
2.5 mM dNTP Mix	2
Primer Forward (20 µM)	0.6
Primer Reverse (20 µM)	0.6
Taq Polimeraz (5 U/ µl)	0.13
Kalıp DNA	1
Ddh20 (steril distile su)	16.87

Çizelge 3.3. rDNA ITS 2 gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan PZR programı

Sıcaklık	Süre	Reaksiyon Basamağı	Döngü Sayısı
94°	5 dk	Başlangıç denatürasyonu	
94°	45 sn	Denatürasyon	30 DÖNGÜ
53°	45 sn	Primer bağlanma (Annealing)	
72°	45 sn	Zincir uzama (Extension)	
72°	10 dk	Son uzama	

3.3.4. *Anopheles maculipennis* Kompleksi Örneklerinin *Vssc1* Gen Bölgesinin PZR Yöntemiyle Çoğaltılması

Anopheles maculipennis kompleksi örneklerinin *Vssc1* gen bölgelerinin PZR ile amplifikasyonunda An. kdr R2 5' GAG GAT GAA CCG AAA TTG GAC 3', AgR-kdr 5' GCA AGG CTA AGA AAA GGT TAA GCA 3' ve AgF-kdr 5' GAC CAT GAT CTG CCA AGA TGG AAT 3' primerleri kullanılmıştır (Syafuruddin vd., 2010). Örneklerinin *Vssc1* gen bölgeleri, Çizelge 3.4'de ve 3.5'de verilmiş olan reaksiyon protokolleri ve Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7'deki çalışma programları uygulanarak Eppendorf marka (Mastercycler) PZR makinasında çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.4. *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinde *kdr* mutasyonunun belirlenmesi için yapılan 1. PZR reaksiyonu için kullanılan bileşenler

Kullanılan PCR reaksiyonu (25 µl)	Kullanılan miktar (µl)
10X TaqBuffer /Tampon	2,5
2.5 mM dNTP Mix	5
Primer Forward (AgF-kdr) (20 µM)	0.6
Primer Reverse (An. kdr R2) (20 µM)	0.6
Taq Polimeraz (5 U/ µl)	0.4
Kalıp DNA	1
Ddh20 (steril distile su)	14.9

Çizelge 3.5. *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinde *kdr* mutasyonunun belirlenmesi için yapılan 2. PZR reaksiyonu için kullanılan bileşenler

Kullanılan PCR reaksiyonu (25 µl)	Kullanılan miktar (µl)
10X TaqBuffer /Tampon	2,5
2.5 mM dNTP Mix	5
Primer Forward (AgF–kdr) (20 µM)	0.6
Primer Reverse (AgR–kdr) (20 µM)	0.6
Taq Polimeraz (5 U/ µl)	0.5
Kalıp DNA	0.5
Ddh20 (steril distile su)	15.3

Çizelge 3.6. *Vssc1* gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan 1. PZR programı

Sıcaklık	Süre	Reaksiyon Basamağı	Döngü Sayısı
94°	5 dk	Başlangıç denatürasyonu	1 DÖNGÜ
94°	30 sn	Denatürasyon	
47°	30 sn	Primer Bağlanma (Annealing)	
72°	1.5 dk	Zincir Uzama (Extension)	29 DÖNGÜ
94°	30 sn	Denatürasyon	
47°	30 sn	Primer Bağlanma (Annealing)	
72°	1 dk	Zincir Uzama (Extension)	
72°	1 dk	Son uzama	

Çizelge 3.7. *Vssc1* gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan 2. PZR programı

Sıcaklık	Süre	Reaksiyon Basamağı	Döngü Sayısı
94°	5 dk	Başlangıç denatürasyonu	35 DÖNGÜ
94°	30 sn	Denatürasyon	
50°	30 sn	Primer Bağlanma (Annealing)	
72°	40 sn	Zincir Uzama (Extension)	
72°	5 dk	Son uzama	

Dizilerin analizlerinde, Gen Bankası AY533849 numaralı *Anopheles maculipennis* türünün 160Me voltaj-duyarlı sodyum kanalının kısmi olarak çoğaltılan dizisi, *kdr* mutasyonu için elde ettiğimiz dizilerle % 99 uyumlu olduğundan referans dizi olarak kullanılmıştır (Djadid vd., 2005).

3.3.5. *Anopheles maculipennis* Kompleksi Örneklerinden *Ace-1* Gen Bölgelerinin PZR Yöntemiyle Çoğaltılması

Anopheles maculipennis kompleksi örneklerinin *Ace-1* gen bölgelerinin PZR ile amplifikasyonunda, Ex3Ag F 5' GAT CGT GGA CAC CGT GTT CG 3', Ex3Ag R 5' AGG ATG GCC CGC TGG AAC AG 3' primerleri kullanılmıştır (Ahoua Alou vd., 2010). Çizelge 3.8'de verilmiş olan reaksiyon protokolü ve Çizelge 3.9'daki çalışma programı uygulanarak Eppendorf marka (Mastercycler) PZR makinasında çoğaltılmıştır. *Ace-1* gen bölgesi için elde edilen bant 555–560 bp büyüklüğündedir.

Çizelge 3.8. *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinin *Ace-1* gen bölgesinin PZR ile amplifikasyonunda kullanılan bileşenler

Kullanılan PCR reaksiyonu (25 µl)	Kullanılan miktar (µl)
10X TaqBuffer /Tampon	2,5
2.5 mM dNTP Mix	5
Primer Forward (20 µM)	0.5
Primer Reverse (20 µM)	0.5
Taq Polimeraz (5 U/ µl)	0.2
Kalıp DNA	2
Ddh20 (steril distile su)	14.3

Çizelge 3.9. *Ace-1* gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan PZR programı

Sıcaklık	Süre	Reaksiyon Basamağı	Döngü Sayısı
94°	5 dk	Başlangıç denatürasyonu	
94°	30 sn	Denatürasyon	35 DÖNGÜ
62°	30 sn	Primer Bağlanma (Annealing)	
72°	20 sn	Zincir Uzama (Extension)	
72°	5 dk	Son uzama	

3.3.6. *Ace-1* Gen Bölgesinin *Alu 1* Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

Ace-1 gen bölgesindeki G119S mutasyonunun belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada, *Alu 1* restriksiyon enzimi (10 Ünite/µl, BIORON, Cat No: 250101S)

kullanılmıştır. *Ace-1* gen bölgesinin çoğaltılması ile elde edilen PZR ürünleri *Alu I* enzimi için iki kesim yerine (5' AG↓CT 3') sahiptir. Toplam 10 µl *Ace-1* PZR ürünü için Çizelge 3.10'da belirtilen reaksiyon karışımı uygulanmış, *Ace-1* gen bölgesi PZR ürünleri *Alu I* restriksiyon enzimi ile kesim için sırasıyla 37°C'de 16 saat inkübasyon, 65°C'de 20 dakika enzim aktivitesinin durdurulması reaksiyonlarına tabi tutulmuştur. *Ace-1* gen bölgesi PZR ürünlerinin *Alu I* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda 236 bç, 89 bç ve 182 bç büyüklüğünde kesim ürünleri oluşmaktadır. PZR-RFLP ürünleri %1,5'lük agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmış ve elde edilen jel profilinde bantların sayısına bakılarak bireylerin genotipleri saptanmıştır.

Çizelge 3.10. *Ace-1* geninin *Alu I* enzimi restriksiyon kesim reaksiyonu

Kullanılan PZR reaksiyonu (10 µl)	Kullanılan miktar (µl)
10X Buffer /Tampon	1
BSA (10 mg/ml)	0.1
Alu I (10 units/µl)	0.25
dh20 (steril distile su)	1.65
PZR Ürünü	7

3.3.7. *Ace-1* Geninin Kodladığı Amino asit Dizisinin Belirlenmesi İçin RNA İzolasyonu ve Elde edilen RNA'lardan cDNA Sentezi

Ace-1 gen bölgesindeki G119S mutasyonunun belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada, *Alu I* restriksiyon enzimi kullanılarak kesim yapılmıştır. Enzim ile kesim sonucunda bant profilinde mutasyon olması durumunda meydana gelecek amino asit değişikliğinin tespiti için *Ace-1* genine ait bölgenin kodladığı amino asit dizisinin bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla, DDT insektisiti kullanılarak gerçekleştirilmiş WHO'nun insektisit duyarlılık testinin 24 saatlik süresinin sonunda yaşayanlardan 3 ve ölenlerden 3 olmak üzere toplamda 6 sivrisinekten iki grup oluşturularak her gruptan ayrı ayrı RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonlarında Qiagen/RNeasy Mini kit kullanılmış ve bu kit için izlenen yöntemin aşamaları aşağıda verilmiştir:

1. Sivrisinekler içinde 350 µl RLT tampon eklenmiş eppendorf tüplere aktarılmıştır. Bir parçalayıcı (pestle) yardımıyla mümkün olduğu kadar parçalanmış ve bir şırınga yardımıyla, 6 kez çek-al yapılarak homojen hale gelmeleri sağlanmıştır.

2. Elde edilen karışım maksimum hızda 3 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant yeni bir eppendorf tüpe alınmıştır.
3. Süpernatantın alındığı yeni eppendorf tüpüne 350 µl %70'lik ethanol eklenmiş, hızlıca birkaç kez pipetlenmiştir.
4. Yaklaşık 650 – 700 µl olan karışım, toplama kolonuna aktarılmış, 10.000 rpm'de 15 sn santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.
5. Tüpe 700 µl RW1 tamponu eklenmiş, 10.000 rpm'de 15 sn santrifüjlenmiş ve altta kalan sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.
6. Tüpe 500 µl RPE tamponu eklenmiş, 10.000 rpm'de 15 sn santrifüjlenmiş ve altta kalan sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.
7. Yine 500 µl RPE tamponu eklenmiş ve 10.000 rpm'de 2 dk santrifüjlenmiştir.
8. Kolon yeni bir eppendorf tüpüne alınmış ve herhangi bir şey eklenmeden alkolü tamamen uzaklaştırmak için maksimum hızda 1 dk santrifüjlenmiştir.
9. Kolon RNA izolasyon kitinde bulunan 1.5 ml'lik toplama tüpüne alınmıştır, 20 µl RNase içermeyen distile su kolonun tam ortasına aktararak 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlanmış ve eğer izole edilen RNA hemen kullanılmayacaksa – 20°C'de saklanmıştır.

Elde edilen RNA'ların görüntülenmesi için RNA jeli hazırlanmıştır. 100 ml RNA jeli hazırlanırken 72 ml distile su içinde 1 gr agaroz eklenerek mikrodalga fırında çözdürüldükten sonra 60°C'ye kadar soğutulmuştur. Daha sonra içine 10 ml 10X MOPS yürütme tamponu ve 18 ml % 37'lik formaldehit ilave edilmiştir ve hazırlanan bu karışım içine uygun tarak yerleştirilerek, jel tablasına katılması için dökülmüştür. Son olarak jel tank içerisine alınmış, üzerini birkaç mm kapatacak kadar 1X MOPS ilave edilerek, kuyucuğa 3 µl 6X yükleme tamponu ile birlikte karıştırılmış olan ürün yüklenmiş ve 50 mV'da yürütülmüştür.

Total RNA'dan mRNA'nın seçilmesi için, elde edilen RNA kalıp olarak kullanılarak RT-PZR yöntemiyle komplementer DNA (cDNA) elde edilmiştir. Bu reaksiyon için kullanılan bileşenler Çizelge 3.11'de verilmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımı Eppendorf marka PZR cihazında sırasıyla 25° 10 dk, 48° 30 dk ve 95° 5 dk'lık çalışma programına tabi tutulmuştur. Elde edilen cDNA, Çizelge 3.9'da belirtilen *Ace-1* gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan PZR programı uygulanarak çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.11. cDNA sentezi için kullanılan master mix bileşenleri ve konsantrasyonları

Kullanılan PZR reaksiyonu (50 µl)	Kullanılan miktar (µl)
10X Buffer /Tampon	5
2.5 mM dNTP Mix	10
MgCl ₂ (25 mM)	11
Random Hekzamer	1.25
Oligo d(T)	1.25
RNase inhibitör	1
Reverse Transkriptaz	14.3
RNase içermeyen distile su	19.25

3.3.8. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforeziyle Kalitesinin İncelenmesi ve Görüntülenmesi

Elde edilen rDNA ITS 2 gen bölgesi, *Vssc1* gen bölgesi, *Ace-1* gen bölgesine ait PZR ürünleri kalite ve büyüklüklerinin kontrolü amacıyla hazırlanmış agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. Bu işlem için aşağıdaki aşamalar izlenmiştir:

1. Kullanılan tanka göre, %1,5'lük (w/v) jel hazırlanırken 1,5 gr agaroz (Sigma) 100 ml 1X TBE tamponu (500 ml: 54 g Tris – base (Sigma) , 27,5 g Borik asit (AppliChem), 1,7 g Na₂EDTA, pH: 8.0) içerisinde mikrodalga fırında (Premier marka) eritildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulmuştur.

2. Hazırlanan homojen karışıma 5 µl SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Inc.) eklenerek iyice karıştırılmış ve içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde uygun tarak yerleştirilmiş olan jel kabına dökülmüş ve polimerleşmesi beklenmiştir. Yaklaşık yarım saat sonra tamamen polimerleşen jel içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına (Thermo EC Midicell Primo TM EC330) yerleştirilmiştir.

3. Jelde yürütülecek olan örneklerden 5 µl alınarak 3 µl 6X yükleme tamponu (%50 gliserol, 0,1M EDTA, % 1 SDS, % 0,1 bromfenol mavisi, % 0,1 ksilen siyanol) ile karıştırılmıştır. Hazırlanmış olan jelin ilk kuyucuğuna 3 µl 6X yükleme tamponu ve BioLabs marka (Quick-Load 50 bç #NO473G) 2 µl DNA büyüklük belirteci (sırasıyla 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1000 bç parçalar içermektedir) yüklenmiş, daha sonra

sırayla her bir kuyucuğa yine 3 µl 6X yükleme tamponu ile birlikte karıştırılmış olan PZR ürünü yüklenmiştir.

4. Elektroforez, 50 mA’de 1 saat çalıştırılmış ve ayırım sonucundaki jel görüntüsü Vilbert Lourmat görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Görüntüleme sonucunda ITS 2, *Vssc1*, *Ace-1* gen bölgesi ürünlerinde konsantrasyon, kontaminasyon (RNA, protein) ve degradasyon ile ilgili fikir edinilmiş ve herhangi bir özgül olmayan bant gözlemlenmemesi sonucunda PZR ürünü doğrudan Gen Elute PZR saflaştırma kiti (SIGMA) kullanılarak temizlenmiştir.

3.3.9. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması İşlemi

Agaroz jelde yürütülerek görüntülenen ürünlerden tek ve doğru büyüklükte bant veren PZR ürünleri SIGMA GenElute PCR Clean-Up kit (#NA120) kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu işlem sırasında üretici tarafından verilen protokol uygulanmıştır.

1. PZR ürünlerini dizi analizi öncesi temizlemek için ilk olarak kit içinde verilmiş olan “toplama tüpü”ne GenElute Miniprep bağlanma kolonu yerleştirilmiş ve her bir kolona 500 µl “kolon hazırlık çözeltisi” eklenerek 12.000 g’de yaklaşık 45 saniye santrifüj edilmiştir. Bu basamak DNA’nın membrana daha iyi bağlanmasını sağlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2. Saflaştırılacak olan PZR ürünü 5 katı “yüklem çözeltisi” ile karıştırılarak kolona yüklenmiştir ve kolon maksimum hızda (12.000–16.000 g) 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpünde biriken sıvı dökülerek kolon tekrar tüpe yerleştirilmiştir.

3. 500 µl “yıkama çözeltisi” kolona eklenmiştir ve tekrar maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra tekrar kolonun altında dipte kalan sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.

4. Kolonda kalabilecek etanolü tamamen uzaklaştırmak için de kolon tekrar maksimum hızda 2 dakika hiçbir ek “yıkama solüsyonu” ilave edilmeksizin santrifüjlenmiştir. Yine kolonun altında dipte kalan sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.

5. Kolona bağlanan PZR ürününü elde etmek için kolonlar kitle beraber verilen yeni toplama tüplerine aktarılmış ve kolonun merkezine gelecek şekilde 50 µl “elüsyon çözeltisi” her birine eklenmiştir. DNA’nın çözünmesi için oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.

6. Sonuç olarak kolona bağlanmış DNA kolondan ayrılarak alttaki toplama tüpü içerisine alınmış ve geri kazanılmıştır.

Saflaştırma işleminden sonra elde edilen PZR ürünleri kalitesini saptamak için tekrar agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Spesifik olmayan bantlar ve primer dimerlerinin gözlemlenmediği örnekler dizi analizine hazırlanmıştır.

3.3.10. rDNA ITS 2, *Vssc1* ve *Ace-1* Bölgesine Ait DNA Dizi Verilerinin Elde Edilmesi ve Analizi

Saflaştırılmış rDNA ITS 2 gen bölgesi, *Vssc1* gen bölgesi, *Ace-1* gen bölgesine ait PZR ürünleri ve primerler dizi analizi için Macrogen (Seul/Güney Kore) adlı firmaya gönderilmiştir. Burada sekans reaksiyonu için BigDye Terminaor Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılmış ve dizi ürünleri ABI 3730XL kapilla otomatik sekans aletinde yürütülerek verileri elde edilmiştir. Hem her iki gen bölgesi için hem de çalışılan rDNA ITS 2 genom bölgesi hem ileri (forward) hem de tersine (reverse) PZR primerleri ile dizilenmiştir. Elde edilen ham diziler BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) programı kullanılarak (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) her bir birey için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Bu işlem sırasında her bir verideki her bir baz dikkatle kontrol edilmiştir. Özellikle primer bağlanma bölgelerinde oluşabilecek yanlış baz okumalarına karşı kromatogramlarda yapılan dizilerdeki hatalar düzeltilmiş ve fazla uzamadan kaynaklanan 3’uçlardaki fazlalıklar eşitlenerek elde edilen ham veriler kullanılabilir hale getirilmiştir. Daha sonra elde edilen her DNA dizisi fasta formatında kaydedilip <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> web sitesi üzerinden GenBank’ta bulunan dizilerle karşılaştırılmış ve GenBank’ta en yüksek benzerlik gösteren diziler seçilerek BioEdit programında ClustalW çoklu eşleme yöntemi ile elde ettiğimiz dizilerle birlikte analize alınmış, benzerlik oranları ve baz kompozisyonları ortaya konulmuştur. Okunmayan veya yanlış okunan nükleotidler gözle kontrol edilerek düzeltilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *Anopheles maculipennis* Kompleksi Populasyon Örnekleri

Akdeniz ve Ege bölgeleri kapsamında *Anopheles maculipennis* kompleksi populasyonlarının örneklemeleri için belirlenmiş olan 5 lokalitede ahır ya da evlerden ağız aspiratörleri aracılığıyla *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinin dişi örnekleri yakalanmıştır. Örneklemeye çalışmaları 2011-2012 yıllarının Temmuz-Ekim aylarında yapılmış olup, elde edilen örneklerin lokalitelere göre dağılımı Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Anopheles maculipennis* kompleksi populasyonlarından elde edilen örneklerin lokalitelere göre dağılımı

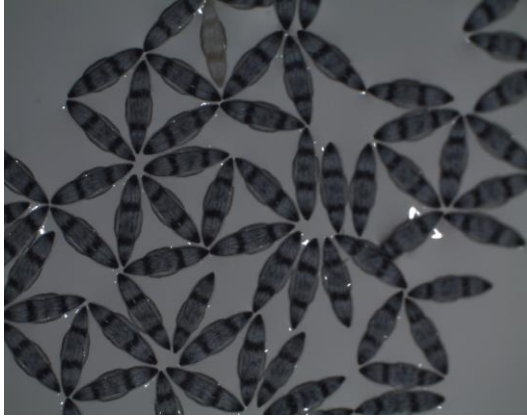
Bölge	No	Lokalite	Dişi Örnek Sayısı	Örneklemeye Zamanı
Aydın	1	Tuzburgazı	157	15. 9. 2012
İzmir	2	Belevi	116	12. 8. 2012
Muğla	3	Dalaman	373	20. 7. 2011
Burdur	4	Uylupınar	264	12. 8. 2011
Isparta	5	Gelendost	126	6. 10. 2012

4.2. *Anopheles maculipennis* Kompleksi Yumurtalarının İncelenmesi

Anopheles maculipennis kompleksi populasyon örneklemelerinin yapıldığı lokalitelerden canlı olarak labarotuvaya getirilen 205 dişinin yumurta bırakması sağlanmıştır. Bırakılan yumurtaların mikroskopla incelenerek fotoğraflanması sonucunda lokalitelere göre dağılımları farklı olan 3 yumurta tipi belirlenmiştir. Yumurtalardaki yüzgeç yapısı, desen şekli, bantlanmanın olup olmaması gibi karakterlerin değerlendirmesi sonucunda *Anopheles maculipennis* kompleksi örneklerinin, *An. melanoon* (Şekil 4.1), *An. maculipennis* s.s. (Şekil 4.2) ve *An. sacharovi* (Şekil 4.3) türlerine ait olduğu tespit edilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda temel olarak 3 farklı karaktere sahip yumurta tipi belirlenmiş olmakla birlikte, *An. maculipennis* kompleksi türlerinden sadece *An. sacharovi* türü için güvenilir bir teşhis yapılabilmektedir. *An. melanoon* ve *An. maculipennis* s.s. türlerinin örneklemeye lokalitelerindeki dağılımları konusunda da bir ön değerlendirme yapılmasını sağlamıştır.



Şekil 4.1. *Anopheles melanoon* yumurtaları



Şekil 4.2. *Anopheles maculipennis* s.s. yumurtaları



Şekil 4.3. *Anopheles sacharovi* yumurtaları

4.3. İnektisit Duyarlılık Testleri

Laboratuvar ortamında Uylupınar, Gelendost, Kapıkargın, Tuzburgaz ve Belevi lokalitelerinden örneklenen *Anopheles maculipennis* kompleksi populasyonlarına ait toplam 510 dişi birey kullanılarak WHO'nun (1998) inektisit duyarlılık testleri gerçekleştirilmiş ve populasyonlarının duyarlılık ya da dirençliliği için de WHO'nun test sonuçlarını değerlendirme kriterleri uygulanmıştır. Bu kriterlere göre bir populasyonda test sonuçları üç farklı durumu göstermektedir: 1) Test sonuçlarında ölüm oranı % 98-% 100 arasında ise, o populasyonun test yapılan inektisite karşı duyarlı olduğu; 2) Ölüm oranı % 80-% 97 arasında ise, doğruluğunun teyit edilmesi gereken direnç durumunu; 3) % 80'in altında elde edilen bir ölüm oranı da, o populasyonun dirençli olduğunu göstermektedir. Ancak, optimum koşullarda yapılan bir test, her bir inektisit için 100 bireyden az örnekle gerçekleştirilmişse ölüm oranı % 95'in altında bulunsan bile, bu populasyonu dirençli olarak değerlendirilmesi uygun olmamaktadır (WHO, 1998).

Yapılan duyarlılık testlerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiş olup, Uylupınar lokalitesi için yapılan testlerde toplamda 120 örnek kullanılmıştır (DDT: 30 örnek, Permetrin: 30 örnek, Deltametrin: 30 örnek, Kontrol-OC: 20, Kontrol-PY: 10). Test sonuçlarına göre, ölüm oranları DDT'de % 57, Permetrinde % 87, Deltametrinde ise % 97 olarak bulunmuştur. WHO'nun değerlendirme kriterlerine göre, Uylupınar lokalitesi populasyonunda her üç inektisit için de dirençli bireyler vardır.

Gelendost lokalitesi için yapılan testlerde 140 örnek kullanılmıştır (DDT: 30 örnek, Permetrin: 30 örnek, Deltametrin: 30 örnek, Kontrol-OC: 30, Kontrol-PY: 20). Bu bölge için elde edilen test sonuçlarına göre ölüm oranları DDT'de % 70, Permetrinde % 100, Deltametrinde ise % 97 olarak bulunmuştur.

Kapıkargın lokalitesi için gerçekleştirilen testlerde toplamda 140 örnek kullanılmış (DDT: 40 örnek, Permetrin: 40 örnek, Deltametrin: 20 örnek, Kontrol – OC: 20, Kontrol – PY: 20) ve testler sonucunda, DDT için ölüm oranı % 65, Permetrin için %95 ve Deltametrin için % 100 olarak belirlenmiştir.

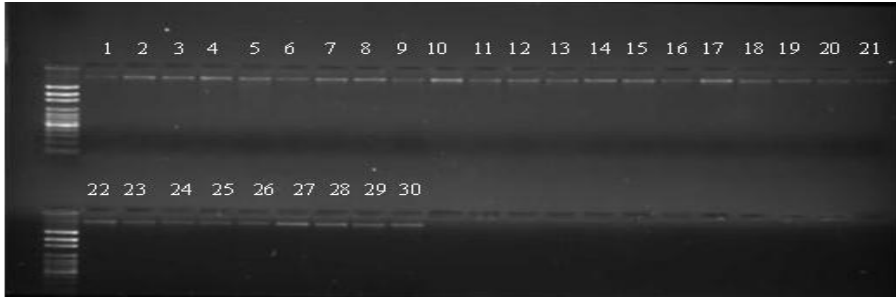
Testleri yapılan Belevi ve Tuzburgazı lokaliteleri populasyonlarına ait sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. WHO'nun standart insektisit duyarlılık testleri sonuçları (PY: Piretroid, OC: Organoklorlu).

Lokalite	Birey sayısı	DDT (24. saat)		Birey sayısı	Deltametrin (24. saat)		Birey sayısı	Permetrin (24. saat)		Birey sayısı	Kontrol (PY) (24. saat)		Birey sayısı	Kontrol (OC) (24. saat)	
		Canlı	Ölü		Canlı	Ölü		Canlı	Ölü		Canlı	Ölü		Canlı	Ölü
Belevi	20	2	18	10	1	9	10	1	9	10	10			10	0
% Ölüm		% 90			% 90			% 90			% 0			% 0	
Tuzburgazı	10	6	4	10	2	8	10	2	8	10	10	0		10	0
% Ölüm		% 40			% 80			% 80			% 0			% 0	
Kapıkargın	40	14	26	20	0	20	40	2	38	20	20	0		20	0
% Ölüm		% 65			% 100			% 95			% 0			% 0	
Gelendost	30	9	21	30	1	29	30	0	30	20	20	0		30	0
% Ölüm		% 70			% 97			% 100			% 0			% 0	
Uylupınar	30	13	17	30	1	29	30	4	26	10	10	0		20	0
% Ölüm		% 57			% 97			% 87			% 0			% 0	
Toplam	130	44	86	100	5	95	120	9	111	70	70			90	

4.4. Genomik DNA İzolasyonu

İnsektisit duyarlılık testleri yapıldıktan sonra laboratuvar ortamında % 95’lik etil alkolde +4°C’de koruma altına alınmış olan örneklerden genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. Belevi lokalitesi için 15 dişi bireyden, Tuzburgazı için 16, Kapıkargın için 46, Gelendost için 22 ve Uylupınar lokalitesi için 46 dişiden olmak üzere toplam da 145 dişinin DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu yapılan Kapıkargın örneklerine ait jel görüntüsü, Şekil 4.4’de verilmiştir.



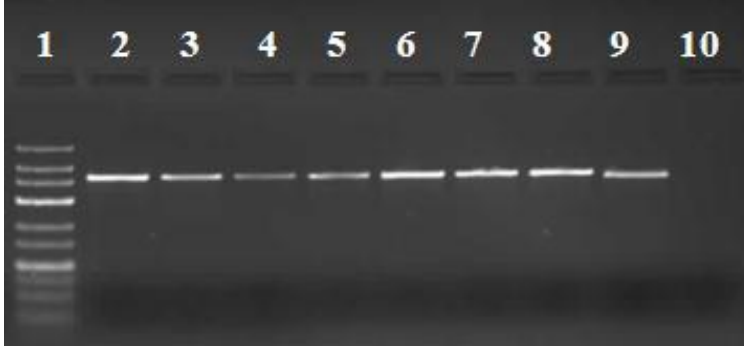
Şekil 4.4. Kapıkargın köyü lokalitesi örneklerine ait DNA’ların jel görüntüsü

4.5. *Anopheles maculipennis* Kompleksi Örneklerinin Moleküler Tür Teşhisi

İnsektisit duyarlılık testleri gerçekleştirildikten sonra DNA izolasyonu yapılmış örneklerin tür bazında ayırımında ITS 2 sekanslarındaki farklılıklar temeline dayanan yöntem kullanılarak tür teşhisleri gerçekleştirilmiştir. Nükleer DNA’dan çoğaltılan PZR ürünlerinin (ITS2 bölgesi) %1,5’luk agaroz jelde elektroforezi yapılmış ve görüntülenerek analiz için hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.5). Örneklemeleri yapılan beş popülasyondan toplamda 75 adet örneğin ITS 2 bölgesi çoğaltılarak dizileri elde edilmiştir (Çizelge 4.3).

Dişi bireylerden elde edilen ITS 2 bölgelerine ait dizileri GenBank’taki *An. maculipennis* kompleksi türleri için mevcut olan diğer dizilerle karşılaştırılmış ve her bir dizi için tür teşhisleri yapılmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz dizilerden 49 (% 66)’unun, *An. sacharovi* türü için Gen Bankası’nda kaydedilmiş olan HQ878035 (Şimşek vd., 2011), AY8422515 (Djadid vd., 2007) dizileriyle, 14 (% 18,42)’ünün, *An. maculipennis* s.s. türüne ait HQ877939 (Şimşek vd., 2011) ve FJ210877 (Azari–Hamidian vd., 2009) dizileriyle ve 12 (% 15,78)’sinin de, *An.*

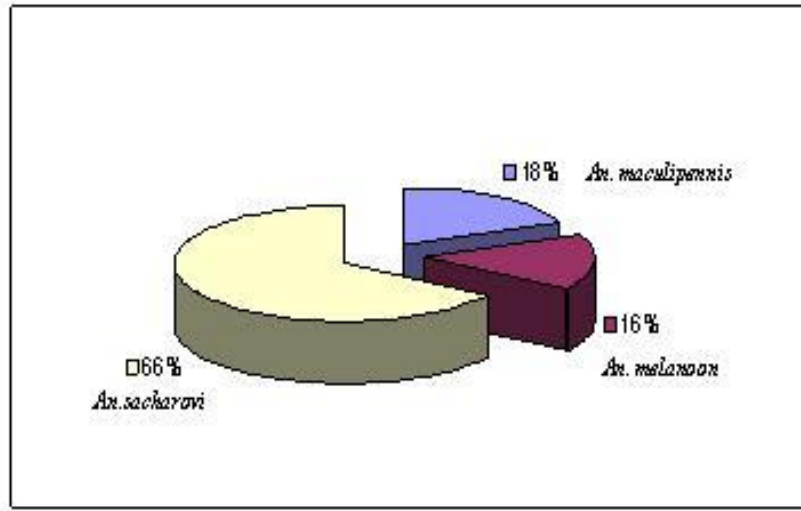
melanonn türü için kaydedilmiş olan AJ224330 (Marinucci vd., 1999) ve AF452389 (Linton vd., 2007) dizileriyle % 100 uyumlu olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6). Moleküler analizleri yapılan 75 örneğimize ait dizi sonuçları değerlendirildiğinde, ITS 2 bölgesinin uzunluğu ya da kompozisyonu bakımından tür içi varyasyon da tespit edilmemiştir.



Şekil 4.5. Uylupınar lokalitesi örneklerinden elde edilen ITS 2 bölgesi PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü 1. Fermentas Gen Ruler Low Range DNA Ladder. 2. Belevi bölgesi örneğine ait ITS 2 PZR ürünü 3. Belevi bölgesi örneğine ait ITS 2 PZR ürünü 4. Tuzburgazı bölgesi örneğine ait ITS 2 PZR ürünü 5. Gelendost bölgesi örneğine ait ITS 2 PZR ürünü 6. Uylupınar bölgesi örneğine ait ITS 2 PZR ürünü 7. Uylupınar kodlu örneğe ait ITS 2 PZR ürünü 8. Kapıkargın bölgesi örneğine ait ITS 2 PZR ürünü 9. Kapıkargın bölgesi örneğine ait ITS 2 PZR ürünü 10. Reaksiyonun kontrolü amacıyla DNA yerine steril distile su içeren PZR ürünü. Bantlar ladder ile karşılaştırıldığında 400 ile 500 bp arasında olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3. Lokalitelere göre *Anopheles maculipennis* kompleksi örneklerinin moleküler tür teşhisi

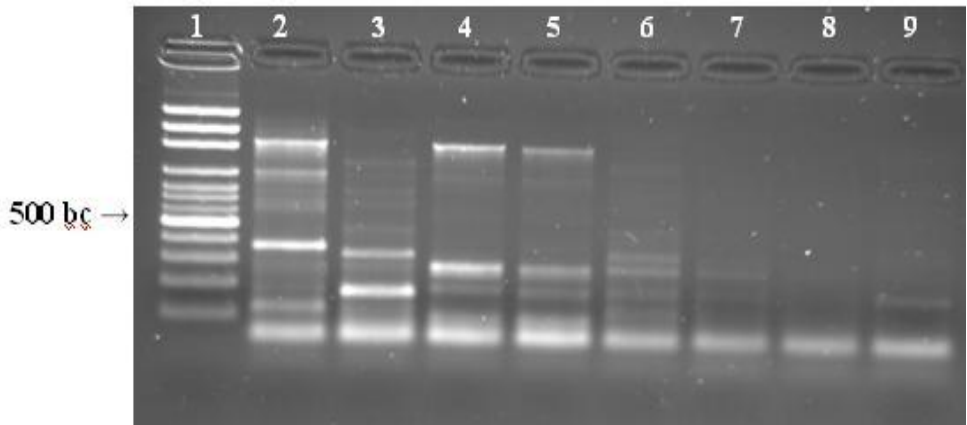
Lokalite	Elde edilen ITS 2 dizisi	Moleküler teşhisi yapılan tür		
		<i>An. sacharovi</i>	<i>An. maculipennis</i>	<i>An. melanonn</i>
Belevi	5	5	-	-
Tuzburgazı	5	5	-	-
Kapıkargın	5	5	-	-
Gelendost	21	5	7	9
Uylupınar	39	29	7	3
TOPLAM	75	49	14	12



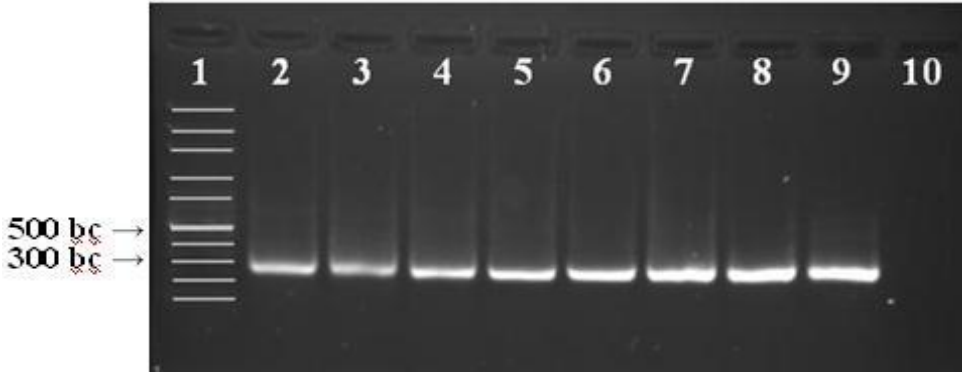
Şekil 4.6. ITS 2 bölgesi dizilerine göre belirlenen türlerin oranları

4.6. *Vssc1* Geninde *Kdr* Mutasyonunun Belirlenmesi

Vssc1 geninde *kdr* mutasyonunun belirlenmesi amacıyla duyarlılık testleri sonucu her bölgeden hem canlı hem ölü örneklerden seçilerek toplamda 106 örnek için PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiş, elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezinde görüntülemeleri yapılmıştır (Şekil 4.7-4.8).



Şekil 4.7. *Kdr* mutasyonunun belirlenmesi için yapılan 1. PZR ürünlerinin jel görüntüsü



Şekil 4.8. *Kdr* mutasyonunun belirlenmesi için yapılan 2. PZR ürünlerinin jel görüntüsü

Grüntülenmesi yapılan 106 PZR ürünün *Vssc1* geninde *kdr* mutasyonunun belirlenmesi amacıyla diziler elde edilmiştir. Ancak, elde edilen dizilerden 9'u mutasyon taraması için uygun olmadığından değerlendirme için *Vssc1* genine ait toplamda 97 dizi analizlerde kullanılmıştır (Çizelge 4.4) ve dizilerin amino asit genotip dağılımı belirlenmiştir (Çizelge 4.5-4.6).

Çizelge 4.4. *Kdr* mutasyonunun belirlenmesi için gerçekleştirilen reaksiyonların lokalitelere göre dağılımı

Lokalite	Örnek sayısı	Tür		
		<i>An. sacharovi</i>	<i>An. maculipennis</i>	<i>An. melanonn</i>
Belevi	15	5		
Tuzburgazı	16	5		
Kapıkargın	25	5		
Gelendost	15	5	4	6
Uylupınar	35	24	5	3
TOPLAM	106	44	9	9

Çizelge 4.5. *Vssc1* geninde *kdr* mutasyonu yönünden belirlenen genotip dağılımı (TTG → Lösin, TCG → Serin, T (T/C) G → Lösin /Serin Heterozigot)

İnsektisit	TTG	TT/CG	TCG
DDT	23	18	1
Deltametrin	16	9	
Permetrin	15	9	1
TOPLAM	59	36	2

Çizelge 4.6. *Vssc1* geninde *kdr* mutasyonu yönünden belirlenen genotiplerin lokalitelere göre dağılımı (TTG → Lösin, TCG → Serin, T (T/C) G → Lösin /Serin Heterozigot)

Lokalite	Genotipler					
	TTG		T(T/C)G		TCG	
	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü
Belevi	3	8	1	3		
Tuzburgazı	3	5	5	1	1	
Kapıkargın	13	7	5	0		
Gelendost	0	2	5	8		
Uylupınar	13	5	2	6	1	
TOPLAM	32	27	18	18	2	

An. maculipennis kompleksi örneğinden sadece Tuzburgazı lokalitesindeki bir *An. sacharovi* örneğinde ve Uylupınar lokalitesindeki bir *An. sacharovi* örneğinde *kdr* mutasyonu ile ilişkili olan 1014.pozisyonunda serin amino asidi tespit edilmiştir. 1014. pozisyonunda, Lösin amino asidini taşıdığı belirlenen 59 dizinin önemli bir kısmı Kapıkargın ve Uylupınar lokalitesine ait örneklerde bulunmuştur. Heterozigot polimorfizm gösteren diziler ise en daha çok Gelendost lokalitesi örneklerinden elde edilmiştir.

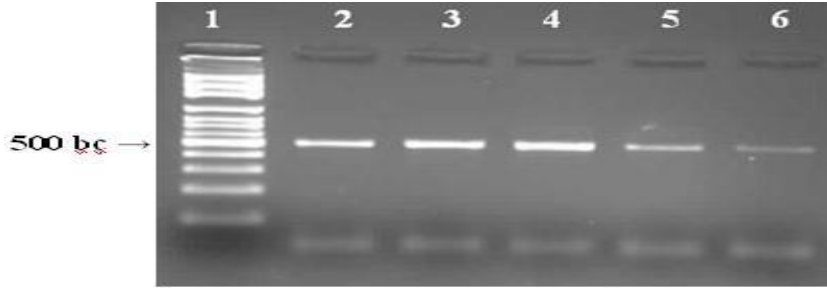
Kdr mutasyonuna sahip, mutasyonsuz ya da heterozigot örnekler için dizilerin kodladığı amino asitlere ait veriler ile Gen Bankası AY533849 numaralı referans dizi Çizelge 4.7’de verilmiştir.

4.7. *Ace-1* Genindeki *Ace* Mutasyonunun Belirlenmesi

Ace-1 geninde direnç gelişimine sebep olan mutasyonunun belirlenmesi amacıyla 5 popülasyondan toplamda 144 örneğinin *Ace-1* gen bölgesi PZR reaksiyonları ile çoğaltılmış ve 550–600 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezinde görüntülemeleri yapılmıştır. (Şekil 4.9). Lokalitelere göre yapılan örnek sayıları Çizelge 4.8’de verilmiştir. Daha sonra elde edilen PZR ürünleri *Alu I* restriksiyon enzimi ile kesim için hazırlanmıştır.

Çizelge 4.7. *Kdr* mutasyonunun belirlenmesine yönelik dizi analizi sonucu 1014. pozisyondaki amino asit değişiklikleri (1014. pozisyona karşılık gelen kodonlar çerçeve içinde gösterilmiştir)

TÜR	LOKALİTE	DİZİLER
<i>An. maculipennis</i>	Tahran/İran (AY533849)	<pre> 1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 TGGATTGAATCAATGTGGGATTGCATGCTCGTTGGTGATGTATCATGTATCCCGTTCCTTCTTAGCTACCGTAGTAATAGGAAACTGGTGGTAAGTATCCGGACACGTCAI W I E S M W D C M L V G D V S C I P F F L A T V V I G N L V V S I R T R H </pre>
<i>An. maculipennis</i>	Gelendost	<pre> TGGATTGAATCGATGTGGGACTGCATGCTCGTTGGTGATGTATCATGTATCCCGTTCCTTCTTAGCTACCGTAGTAATAGGAAACTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGT W I E S M W D C M L V G D V S C I P F F L A T V V I G N L V V S N R H V V </pre>
<i>An. melanoon</i>	Uylupınar	<pre> TGGATTGAATCGATGTGGGACTGCATGCTCGTTGGTGATGTATCATGTATCCCGTTCCTTCTTAGCTACCGTAGTAATAGGAAACTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGT W I E S M W D C M L V G D V S C I P F F L A T V V I G N L V V S N R H V V </pre>
<i>An. sacharovi</i>	Tuzburgazı	<pre> TGGATTGAATCGATGTGGGACTGCATGCTCGTTGGTGATGTATCATGTATCCCGTTCCTTCTTAGCTACCGTAGTAATAGGAAACTCGTGGTAAGTAACCG W I E S M W D C M L V G D V S C I P F F L A T V V I G N S V V S N R </pre>
<i>An. sacharovi</i>	Uylupınar	<pre> TGGATTGAATCGATGTGGGACTGCATGCTCGTTGGTGATGTATCATGTATCCCGTTCCTTCTTAGCTACCGTAGTAATAGGAAACTCGTGGTAAGTAACCG W I E S M W D C M L V G D V S C I P F F L A T V V I G N S V V S N R </pre>
<i>An. sacharovi</i>	Uylupınar	<pre> TTGAATCGATGTGGGACTGCATGCTCGTTGGTGATGTATCATGTATCCCGTTCCTTCTTAGCTACCGTAGTAATAGGAAACTCCGTAAGTAACCG </pre>



Şekil 4.9. *Ace-1* geninden elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Çizelge 4.8. *Ace* mutasyonunun belirlenmesi için gerçekleştirilen reaksiyonların lokalitelere göre dağılımı

Lokalite	Örnek sayısı
Belevi	14
Tuzburgazı	16
Kapıkargın	46
Gelendost	22
Uylupınar	46

ITS 2 gen bölgesi çoğaltılarak elde edilen sekans sonuçlarına göre *An. maculipennis* kompleksi içindeki her 3 türden 2'şer örnek için tür bazında *Ace-1* gen bölgesine ait sekans dizilerinin elde edilmesi için PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu, *Alu I* enzimi ile restriksiyon kesim reaksiyonu sonucu mutasyon görülen birey elde edilirse sekans dizileri ile elde edilen sonuçları karşılaştırarak tür bazında meydana gelen değişimleri belirlemek amaçlı gerçekleştirilmiştir.

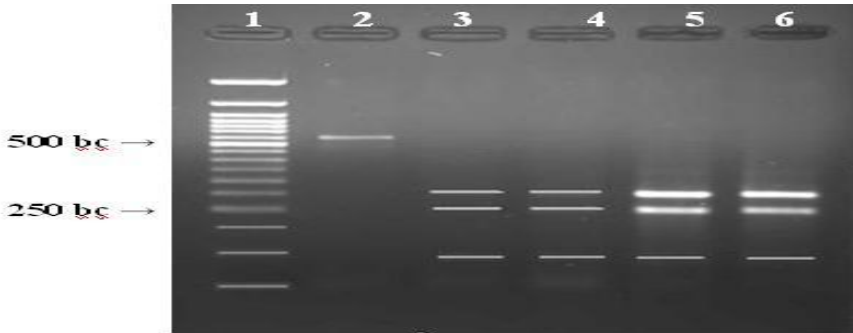
4.8. *Ace-1* Geninin *Alu I* Enzimi ile Kesimi

Ace-1 gen bölgesinin, 555/560 bp büyüklüğündeki PZR ürünlerinden, G119S mutasyonunun saptanması için toplamda 107 örnek, bu bölgelerde tanıma dizisine sahip olan *Alu I* restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve %1,5'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülerek bant büyüklükleri belirlenmiştir (Şekil 4.10). Kesimi yapılan PZR ürünlerinin lokalitelere göre dağılımı Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. *Alu 1* enzimi ile gerçekleştirilen kesim reaksiyonlarının lokalitelere göre dağılımı

Lokalite	Örnek sayısı
Belevi	13
Tuzburgazı	15
Kapıkargın	37
Gelendost	15
Uylupınar	27

Çalıştığımız *An. maculipennis* kompleksi üyelerinin *Ace-1* gen bölgelerinin kısmi olarak çoğaltılan dizilerinde, *Alu 1* enziminin kesim yapabileceği iki bölge bulunmaktadır. *Alu 1* enzimi ile yaklaşık 560 bp uzunluğundaki 107 örneğe ait dizilerin kesimi sonucunda, herhangi bir mutasyon görülmeyen bir bireyde yaklaşık 240, 85 ve 100 bp uzunluğunda 3 bant profili elde edilmiştir. Dolayısıyla, analizleri yapılan lokalitelerin hiçbirinde, *Ace-1* gen bölgesinde mutasyon taşıyan örnek bulunamamıştır.



Şekil 4.10. *Alu 1* enzimi ile yapılan RFLP reaksiyonu sonucu elde edilen kesim sonuçları 1. BioLabs marka DNA Ladder 2. Uylupınar lokalitesine ait örneğin PZR ürünü 3. Gelendost lokalitesine ait örneğin kesim ürünü 4. Kapıkargın lokalitesine ait örneğin kesim ürünü 5. Belevi lokalitesine ait örneğin kesim ürünü 6. Tuzburgazı lokalitesine ait örneğin kesim ürünü

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sivrisinekler, bulaşıcı hastalıklara vektörlük yapan canlılar arasında biyolojik potansiyelleri en yüksek olanlardır (Alten ve Çağlar, 1998). Sivrisineklerle mücadelede çeşitli yöntemler bulunmasına rağmen, etkilerinin hızlı olması, mevcut problemi kısa sürede çözebilmeleri, lokal çözümler sağlayabilmeleri gibi avantajları sebebiyle kimyasal kontrol yöntemleri ağırlıklı olarak tercih edilmektedir. Genel olarak da, sıtma ve diğer vektör kökenli hastalıklarla mücadelede insektisitlerin kullanımı en etkili ve ekonomik yöntem olarak kabul edilmektedir (Rivero vd., 2010). Ancak insektisitlerin bu özelliklerinden dolayı yoğun şekilde kullanılmalarıyla bu bileşenlere karşı birçok vektör türde çeşitli direnç mekanizmaları gelişmiştir. Bu direnç mekanizmaları, insektisit–temelli mücadele programlarının etkinliğine göre oldukça değişmektedir. Pestisit direncinin zararlı kontrolünde en önemli sorunu oluşturduğu günümüzde direnç yönetim programlarının geliştirilmesi amacıyla, zararlı populasyonlarındaki direnç oluşum mekanizmalarının ve dirençli–duyarlı genotiplerin uyumsal farklılıklarının araştırılması büyük önem taşımaktadır. Farklı genotiplerin uyumsal özellikleri, çeşitli çevresel koşullar altında bu genotiplerin populasyonlarındaki frekansını doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle dirençli genotiplerin zararlı populasyonlarındaki yayılım hızını önceden tespit etmek için bu özelliklerin araştırılması gerekmektedir (Kuyucu, 2007). Mevcut direnç mekanizmalarının bilinmesi vektör kontrol programlarında insektisit kullanımında yol gösterici bir rol oynamaktadır. İnsektisit direncinin karakterizasyonu, hedef böceğin çevresel değişimlere adaptasyon süresindeki evrimsel işleyiş hakkında veri elde edilmesini sağlayacaktır. Bu doğrultuda planlanan bu Yüksek Lisans Tez çalışmasında, ülkemizin Akdeniz ve Ege bölgelerinin farklı alanlarından örneklenen *An. maculipennis* kompleksine ait örneklerde, ülkemizde çeşitli nedenlerle halen kullanılan veya geçmiş yıllarda yoğun olarak kullanılmış olan organoklorlu ve piretroid grubu insektisitlere karşı direnç oluşumunu sağlayabilen *kdr* ve *Ace-I* mutasyonlarının varlığı moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilmeye çalışılmıştır.

Bu araştırma kapsamında ilk olarak Burdur (Uylupınar), Isparta (Gelendost), Muğla (Kapıkargın), İzmir (Belevi) ve Aydın (Tuzburgazı) çalışma bölgelerinden elde edilen *An. maculipennis* kompleksi örneklerinden toplamda 510 örnek kullanılarak DDT, permetrin ve deltametrin insektisitleri için WHO'nün insektisit duyarlılık testleri yapılmıştır. Duyarlılık test sonuçları populasyon örnekleme

bölgeleri bazında değerlendirildiğinde, farklı sonuçlara ulaşılmış olmakla birlikte, genel olarak popülasyonların tamamında yıllar önce yaşaklanmış olan DDT'ye karşı hala direncin mevcut olduğu görülmüştür. Buna karşılık, popülasyonların tamamında permetrin ve deltametrin için kesin olarak bir direnç gelişimi tespit edilememiştir. Çünkü Uylupınar lokalitesinde permetrin için ölüm oranı % 87 olarak bulunmuşken, Gelendost lokalitesinde % 100 olarak bulunmuştur. Benzer şekilde Tuzburgazı ve Belevi lokaliteleri için permetrin ölüm oranı % 90 olarak bulunmuşken, Kapıkargın lokalitesinde % 95'lik bir ölüm oranı elde edilmiştir. Diğer taraftan, deltametrin için de yüzde ölüm oranları popülasyonlara göre farklılıklar göstermiş olup, en düşük ölüm oranı % 90 ile Belevi lokalitesinde en yüksek ölüm oranı da % 100 ile Kapıkargın lokalitesinde elde edilmiştir. Bu sonuçlar direnç mekanizmasını açıklayamamakla birlikte, popülasyonlarda DDT gibi organoklorlu insektisitlere karşı direncin korunduğunu ve mevcut direnç mekanizmasının son yıllarda pek çok amaçla yaygın olarak kullanılan pretroid grubu insektisitler için de etkili olmayı sağladığını göstermiştir. Bu nedenle, örnekleme popülasyonlarında mevcut olan ve korunan direncin ancak genetik bir temele dayanabileceğine dair bir öngörü oluşturulmuştur. Akıner (2009), DDT ve türevlerinin yıllarca kullanılmış olması nedeniyle halen gözlenen direncin, DDT kullanımı bırakılmış olsa da, popülasyonların çapraz direnç oluşturabilme özellikleri nedeniyle organoklorlu insektisitlerden daha sonra geliştirilen ancak hedef bölgeleri aynı olan insektisitlerin kullanımını sınırlandırabileceğini bildirmiştir. Benzer sonuçlar, sivrisineklerde mücadelede ilk defa 1946'da kullanılmaya başlayan DDT (Brown, 1986) ve aynı gruptan diğer insektisitler için birçok çalışmada elde edilmiştir. WHO (1992)'ne göre, 100 sivrisinek türünde 1 ya da daha fazla insektiside karşı direnç geliştiği ve bunların 50'den fazlasının *Anopheles* cinsine ait türlerde görüldüğü bildirilmiştir. *An. albimanus*'ta, *An. stephensi*'de, *An. gambiae*'de piretroid direnci geliştiği bildirilmiştir (Brodgon ve Barber, 1990; Vatandoost, vd., 1996; Chandre, vd., 1999a, b). Ülkemizde sıtmanın kontrolünde, DDT, lindan, malation, primiphosmetil ve bendiocarb gibi insektisitler kullanılmıştır (Kasap vd., 2000) ve 1952'de hem tarımsal hem de halk sağlığı amaçlı olarak yoğun olarak DDT kullanılması izleyen yıllarda *An. sacharovi* popülasyonları da yoğun insektisit baskısına maruz kalmıştır. DDT ve lindan 1950 ve 60'lı yıllarda kullanılmış olmasına rağmen *An. sacharovi*'de bunlara karşı direnç 1959'da gelişmiştir. Zulueta (1959), Yunanistan, İran, İtalya, Romanya ve Türkiye'deki *An. sacharovi* örneklerinde insektisitlere karşı gelişen direnç ya da duyarlılık durumunun popülasyonlara göre değişkenliğini bildirmiştir.

Ülkemizde Tarsus ilçesinden elde edilen *An. sacharovi* örneklerinde DDT'ye karşı yüksek fizyolojik direnç, Yunanistan'da dieldrine karşı yüksek fizyolojik direnç görülmüştür. Çok çeşitli kimyasalların yoğun kullanımına rağmen 1970'e kadar insektisitlere karşı *Anopheles* türlerinde gelişen direnç, organoklorlu bileşiklerle sınırlandırılmıştır (Ramsdale, 1975). *An. sacharovi*'de dieldrin direnci 1970 yılında belirlenmiştir ve daha sonra organoklorluların yerini malation almıştır (Curtis, 1962). Malation'a karşı direnç oluşumu 1974'te meydana gelmiştir ve kapalı alanların spreylemesinde organofosfor ve karbamat insektisitleri hiç kullanılmamasına rağmen bunlara karşı geniş oranda çapraz direnç gelişmiştir (Ramsdale, 1975). Malation kullanımına 1984'de son verilmiştir. *Anopheles* türlerinde organofosfat ve karbamat grubu insektisitlere karşı gelişen direncin varlığı ile ilgili ilk veri Çukurova Bölgesi'nde *An. sacharovi* ile yapılan testlerden elde edilmiştir. *An. hyrcanus*'un da aynı şekilde DDT ve dieldrine oldukça dirençli olduğu ve Çukurova'nın dışında Kahramanmaraş bölgesinin *An. sacharovi* populasyonunda da çok yönlü direnç olduğu bildirilmiştir (Ramsdale vd., 1980). Hemingway vd. (1985), sıtma kontrolünde DDT'nin yerini malation almış olmasına rağmen, 1984 yılında *An. sacharovi* populasyonlarında DDT direnci olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, bu *An. sacharovi* populasyonlarında organofosfat ve karbamat grubu insektisitlere karşı da direnç oluşumuna sebep olan AChE direnç mekanizmasının Çukurova populasyonlarında var olduğunu göstermişlerdir. Kasap vd. (1999) yaptıkları çalışmada, Adana-Tuzla (Karataş) bölgesinden toplanan *An. sacharovi*, *Cx. tritaeniorhyncus* ve *Ae. caspius* örneklerine direnç testleri uygulamışlar ve DDT için *An. sacharovi*'de çok düşük, *Cx. tritaeniorhyncus* için % 100'e ulaşan ve *Ae. caspius* için de % 81'e varan oranlarda ölüm belirlemişlerdir. *An. sacharovi* populasyonunda deltametrin ve permetrin için ölüm oranları % 5 ile % 56 arasında bulunmuştur. Ayrıca Çukurova Bölgesi'nde 1992–1995 yılları arasında 32 tarımsal pestisid (1 organoklorlu, 15 organofosforlu, 7 karbamat ve 9 piretroid) kullanıldığını bildirmişlerdir. Lüleyap ve Kasap (2000) tarafından yapılan çalışmada da test yapılan üç bölge için DDT' de % 10, deltametrin ve permetrin için ise % 20–60 arasında ölüm değerleri bulunmuştur. Kasap vd., (2000), *An. sacharovi* ile yapılan diğer bir çalışmada ise DDT için Adana, Adıyaman ve Antalya populasyonlarında çok düşük oranlarda, Aydın (% 67) ve Muğla (% 77) populasyonları için ise yüksek ölüm (% 95) yüzdeleri saptanmıştır. Deltametrin ve permetrin için Adana populasyonu en dirençli soy olarak belirlenmiş diğer soylarda ise değişen oranlarda direnç bulunmuştur. Lak vd. (2002), İran, Ermenistan, Nahcivan ve Türkiye sınır

hattındaki bölgelerden topladıkları *An. sacharovi* örneklerini WHO'nün duyarlılık testlerini uygulayarak çeşitli insektisitlere maruz bırakılmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar *An. sacharovi* örneklerinin DDT'ye dirençli, dieldrine toleranslı olduğu, bendiocarb, propoxur, malation gibi insektisitlere karşı duyarlı olduğunu göstermiştir.

Yukarıda özetlenen araştırmalardan elde edilen sonuçların da ortaya koyduğu gibi hem ülkemizdeki hem de yakın ülkelerdeki *Anopheles* populasyonlarında uzun yıllardır devam eden belirgin bir DDT direnci vardır. Diğer taraftan, çapraz direnç gelişimiyle deltametrin ve permetrin insektisitlerine karşı da direnç gelişiminin ortaya çıktığı son yıllardaki çalışmalarda gösterilmiştir. Benzer şekilde, bu araştırmada kullanılan örnek sayısı kesin bir yargıya varmak için yeteli olmasa da, yapılan test sonuçlarına göre örneklenen populasyonlardaki DDT direncinin varlığı ifade edilebilir. Örnek sayısının dışında teste tabi tutulacak örneklerin toplandığı iklim, mevsim, yıl, dönem, populasyonların mevime bağlı hareketleri gibi diğer faktörler de test sonuçlarını etkileyebilmektedir. Bu nedenle hem yılın tek bir döneminde hem de az sayıda örnekle gerçekleştirilen WHO duyarlılık testleri tek başına populasyonların dirençliliğini ya da duyarlılıklarını ortaya koymak için yeterli olmamaktadır. Bu durumlarda direnç gelişimini sağlayan mekanizmalara yönelik moleküler çalışmalardan elde edilen sonuçlara da ihtiyaç duyulmaktadır.

DDT ve piretroidlere karşı gelişen ve *kdr* olarak adlandırılan direnç tipi, voltaj duyarlı sodyum kanal geninin Domain II'sinin S6 transmembran segmentindeki tek bir mutasyon sonucu oluşmaktadır. *Anopheles* türlerinde piretroidlere ve DDT'ye karşı gelişen direnç fenotipi ile *kdr* genotipi arasındaki pozitif korelasyon açıklanmıştır (Kim vd., 2007; Donnely vd., 2009; Tan vd., 2012). Bu sebeple örnekleme yapılan lokalitelerden elde edilen *An. maculipennis* kompleksine ait türlerin örnekleri kullanılarak yapılan WHO'nün duyarlılık testlerinden sonra aynı örnekler için *kdr* direncini oluşturan mutasyonların tespitine yönelik moleküler çalışmalar da yapılmıştır. Ülkemizde *Anopheles* populasyonlarında moleküler düzeyde gen mutasyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan insektisit direncini belirlemeye yönelik olarak yapılan tek bir çalışma vardır (Lüleyap vd., 2002). Bu çalışmada araştırmacılar, WHO'nün duyarlılık testleri sonucunda piretroidler için dirençli olduklarını belirledikleri *An. sacharovi*'nin Adana populasyonuna ait 12 örnek için mutasyon taraması yapmışlardır. Voltaj duyarlı sodyum kanal geninin *kdr* mutasyonu ile ilişkili olan bölgesi çoğaltılan 12 örnekten 4'ünde, 1014. Amino

asit pozisyonunda serin (TCG), lösin (TTG) ve fenilalanin (TTT) olmak üzere 3 farklı amino asit bulmuşlardır. Böylece, araştırmacılar ülkemizde *An. maculipennis* kompleksi türlerinden *An. sacharovi*'nin Adana popülasyonunda gen mutasyonu ile piretroid direnci arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir.

Akdeniz ve Ege bölgelerinden örneklenen *An. maculipennis* kompleksi örnekleriyle gerçekleştirilen bu çalışmada ise toplamda 97 örnek moleküler düzeyde direnç bakımından incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Voltaj duyarlı sodyum kanal geninin *kdr* direnci ile ilgili bölgesi olan 1014. pozisyonda, genotip dağılımı, 57 örnekte lösin aminoasidi, 36 örnekte lösin/serin aminoasidi bakımından heterozigot polimorfizmi ve 2 örnekte de serin aminoasidi şeklinde bulunmuştur. Lösin aminoasidini 1014. pozisyonunda taşıdığı belirlenen 59 dizinin önemli bir kısmı Kapıkargın ve Uylupınar lokalitesine ait örneklerde bulunmuştur. Heterozigot polimorfizm gösteren diziler ise en daha çok Gelendost lokalitesi örneklerinden elde edilmiştir. Örneklerin önemli bir kısmında *kdr* direncini sağlayan amino asit değişimi saptanamamış olmakla birlikte, Uylupınar ve Tuzburgazı lokalitelerinden *An. sacharovi* türüne ait birer örnekte serin aminoasidi tespit edilmiştir. Bu durum Uylupınar ve Tuzburgazı popülasyonlarının dirençli olduğunu göstermekten çok, popülasyonlarda direnç oluşumunu sağlayan mutasyonun bazı bireylerdeki varlığını ortaya koymuştur. Ayrıca, 1014. pozisyonunda serin bunduran 2 birey, *kdr* direncini sağlayan mutasyonun kuşaklara aktarıldığını ve DDT'nin uzun yıllar kullanılmıyor olmasına rağmen, DDT için ve çapraz direnç olarak deltametrin ve permetrin için direnç sağlayan *kdr* mutasyonunun *An. sacharovi* popülasyonlarında korunduğunu göstermiştir. Elde edilen veriler, popülasyonlara DDT ile ya da benzer etki mekanizmasına sahip insektisitlerle mücadele çalışmaları yapılırsa, popülasyonlardaki dirençli allelin seçim nedeniyle popülasyonda baskın hale gelebileceği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Diğer ülkelerde, diğer önemli *Anopheles* türleriyle yapılan çalışmalarda benzer mekanizmalar araştırılmış olmakla birlikte, bu çalışmada elde edilen sonuçlardan farklı ya da benzer olan sonuçlar elde edilmiştir. Verhaeghen vd. (2009), Çin'nin Mekong bölgesindeki *Anopheles* popülasyonlarında FRET/MCA yöntemi ve PZR-RFLP yöntemlerini kullanarak yaptıkları çalışmada hiçbir türde *kdr* mutasyonunu bulamamışlardır. Araştırmacılar *kdr* mutasyonunun bulunmamasını çalışılan bölgede uzun süre insektisit kullanılmamış olmasına bağlamışlardır. Bu durumda da, insektisit baskısının ortadan kalkmasıyla, DDT ve piretroidlere karşı gelişen dirençten farklı olarak metabolik enzim sistemleriyle

direncin sağlanabileceğine, her bir türün farklı insektisitlere karşı farklı tepkiler verebileceğine ya da farklı bir insektisit baskısı ya da genetik baskının bulunmasından kaynaklanabileceğine dair görüşler öne sürmüşlerdir.

Awolola vd. (2003), Nijerya'da *Anopheles gambiae* s.s ile gerçekleştirdikleri çalışmada *kdr* mutasyonunu sadece türün moleküler S formunda bulmuşlardır. Türün M formunda *kdr* mutasyonunun bulunmamasını da, *An. gambiae* s.s.'de farklı bir piretroid direnç mekanizmasının olabileceğini öne sürerek açıklamaya çalışmışlardır. Yine yapılan farklı çalışmalarda da *An. gambiae*'nin moleküler S formunda *kdr* mutasyonu bulunmuş olmasına rağmen, simpatrik M formunda mutasyona rastlanmamıştır (Chandre vd., 1999c, Diabate vd., 2003a). Bu sonuçlar, bu vektörün genetik formlarının aynı bölgede benzer insektisit baskılara maruz kalsalar da direnç açısından farklılıklar gösterdiklerini ve türün moleküler formları arasında da gen akışının olmadığını göstermektedir (dellaTorre vd., 2001). Benzer durum, yapılan bu çalışmada da belirlenmiş olup, Burdur ve Isparta bölgelerinde simpatrik popülasyonları olan *An. maculipennis* türlerinde de türler arasında direnç mekanizmaları ya da direnç mutasyonlarının korunumuna dair önemli farklılıklar olabileceğinin işaretlerini sunmaktadır. Kang vd., (2012), *An. sinensis* kompleksi ile yaptıkları çalışmada, *kdr* için 1014. kodondaki mutasyonu *An. sirensis* s.s.'de bulmuşlarken, çalışılan diğer 5 türde (*An. pullus*, *An. kleini*, *An. sineroides*, *An. lesteri*, *An. belenrae*) *kdr* mutasyonuna rastlamamışlardır. Bu durumu da, *An. sirensis* s.s türünün diğer türlere göre daha büyük popülasyona ve yayılıma sahip olmalarına bağlamışlar ve biyokimyasal ve spesifik gen ekspresyon çalışmalarının da yapılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Dünyanın değişik bölgelerinde yapılan çalışmalarda, 1014. kodonda meydana gelen L1014F, L1014S ve L1014C gibi mutasyonlar *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. culicifacies*, *An. stephensi*, *An. sinensis*, *An. sacharovi*, *An. superpictus*, *An. sundaicus*, *An. aconitus* ve *An. vagus* gibi türlerde tespit edilmiştir (Martinez-Torres vd., 1998; Lüleyap vd., 2002; Enayati vd., 2003; Diabate vd., 2004; Hoti vd., 2006; Karunaratne vd., 2007; Kim vd., 2007; Syafruddin vd., 2010). Bunun dışında çok sayıda böcek türünde de yapılan çalışmalarla benzer mutasyonların varlığı ortaya konmuştur (Martinez-Torres vd., 1998; Soderlund ve Knipple, 2003; O'reilly vd., 2006; Davies vd., 2007; Verhaeghen vd., 2009; Verhaeghen vd., 2010).

Anopheles maculipennis kompleksi populasyonları için yapılan bu araştırmada, *Ace-1* geninde direnç gelişimine sebep olan mutasyonunun belirlenmesi amacıyla da analizler yapılmıştır. Beş lokalite kapsamında toplamda 144 örneğin PZR reaksiyonlarıyla elde edilen gen bölgesine ait ürünlerinde *Alu-1* enzimi ile kesim reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık olarak 560 bç uzunluğundaki dizilerde *Alu-1* enzimi 2 adet kesim yerine sahip olup, kesimi yapılan üründe eğer herhangi bir mutasyona yok ise ağaroz jel görüntüsünde 240, 85 ve 100 bç uzunluğunda 3 bant profili ortaya çıkmaktadır. *Alu-1* enzimi ile yapılan kesimler sonucunda, örneklerin tamamı benzer şekilde üç bant profili ortaya çıkartmış olup, duyarlı AChE oluşumunu sağlayan *Ace* mutasyonu hiçbir örnekte tespit edilememiştir. Ülkemizde bu kapsamda daha önce sivrisineklerle yapılan bir çalışma olmamakla birlikte, Başkurt vd., (2010), Ege ve Orta Anadolu'da topladıkları karasinek örneklerinden elde ettikleri *Ace-1* geninde, 3 amino asit pozisyonunda 13 farklı kombinasyon meydana geldiğini göstermişlerdir. Djogbenou vd. (2007), *Ace-1*'in fenitrotyon ve Klorpirifos insektisitlerine göre propoksur ve karbamat grubu insektisitler kullanıldığında daha baskın olduğunu bildirmişlerdir. Ahoua Alou vd. (2010)'nin yaptıkları çalışma, *An. gambiae* s.s.'in diğer populasyonlarında görülen düşük çapraz direnç, farklı metabolik direnç mekanizmalarının varlığını ya da G119S'e alternatif farklı mutasyonlar olduğunu desteklemektedir. Ayrıca piretroid baskısına maruz kalan farklı *Anopheles* türlerinde artırılmış detoksifikasyon mekanizmaları organofosfat ve karbamatlara karşı çapraz direnç oluşumunu açıklayabilir (Brodgon ve Barber, 1987). Kıbrıs kökenli *Culex pipiens* soylarındaki *Ace-1* geninde farklı bir mutasyon bulunmuştur. F290V olarak adlandırılan bu mutasyon, organofosfat ve karbamat grubu insektisitlere çapraz direnç oluşumuna sebep olmaktadır (Alout vd., 2007). *Culex pipiens* ve *An. gambiae* s.s. G119S mutasyonunu taşıdıklarından, *An. gambiae* s.s.'in de bu mutasyonu taşıması olası gözükmemektedir. Yapılan çalışmalarda homozigot dirençli bireylerin bulunamaması G119S mutasyonunun yüksek uyum gücü ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Weill vd., 2004; Asidi vd., 2005; Djogbenou vd., 2008). Bunun dışında dirençli bireylerin duyarlılara oranla pupa evresinde oldukça yüksek oranda ölümü de yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Djogbenou vd., 2010).

Gerçekleştirilen bu çalışma ile elde edilen sonuçların tamamı *Anopheles maculipennis* kompleksi için ilk kez elde edilmiş verilerdir. Çalışmanın gerçekleştirildiği örneklerden sadece ikisinde *kdr* mutasyonuna sebep olan 1014.

pozisyonda serin amino asidi bulunmuştur. Mutasyon taraması yapılan 97 örnekten 2'sinde bu değişikliğin görülmesi çalışılan populasyonların değil, bu iki bireyin genetik özellikleri bakımından farklı ya da dirençli olduğunu göstermektedir.

Yapılan test sonuçları bu populasyonlarda predroitler için duyarlılık olduğunu göstermemekle birlikte, daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Öneğin, araştırılan populasyonların daha sık dönemlerde ya da mevsimlik olarak örneklenerek direnç çalışmaları bu örneklerle düzenli olarak yapılmalıdır. Aynı zamanda insektisit uygulanan ortamlara insektisit uygulanmamış alanlardan olan göçlerin de hem direncin hem de uyumun değişiminde önemli bir yeri vardır. Bundan dolayı dirençli populasyonlara duyarlı populasyonlardan birey göçünün araştırılması da, bu alanda çalışılması gereken konulardan biridir (Kuyucu , 2007). Bunun dışında daha geniş coğrafik bölgeler seçilerek, daha fazla birey toplanarak, eğer bir cins ya da kompleks ile çalışılırsa kompleks yada cinse ait örneklerin hemen hemen hepsi toplanarak çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Laboratuvar koşullarında insektisit dirençli koloniler oluşturularak direncin kökeni ile ilgili hem moleküler hem de biyokimyasal olarak daha kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Metabolik direnç mekanizmalarına da bakılarak direnç gelişimine farklı enzim sistemlerinin sebep olup olmadığı araştırılmalıdır.

Son olarak populasyonlarda direnç gelişiminin azaltılması için pestisid uygulamaları geniş alanlar yerine daha sınırlı alanlarda yapılmalı, tüm mevsimler yerine zararlıların üreme dönemlerinde ve erginlerin aşırı çoğaldığı dönemlerde uygulanmalıdır. Kalıcı pestisidler yerine kalıcı olamayan, hızlı etkili pestisidler uygun dozlarda kullanılmalıdır. Ergin ve larva mücadelesinde farklı kimyasallar tercih edilmeli ve dönüşümlü olarak değişik ilaç uygulamaları yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Ahoua Alou, L.P., Koffi, A.A., Adja, M.A., Tia, E., Kouassi, K.P., Kone, M., Chandre, F. 2010. Distribution of ace – 1^R and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae* s.s. populations from Cote d'Ivoire. **Malaria Journal**, 9: 167.
- Akner, M. M. 2003. *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae)'da İnektisitlere Karşı Direnç Düzeyinin Tespiti ve Alana Özgü Direnç Yönetimi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bilim Uzmanlığı Tezi, pp. 102, Ankara.
- Akner, M.M., Çağlar S.S., Şimşek, F.M. 2008. Spectrum of insecticidal resistance enzyme activities in the maculipennis complex in five regions of Turkey. **Abstract Book, 16th European SOVE Conference**, pp: 85, Cambridge, UK.
- Akner, M.M. 2009. Sivrisineklerde Direnç Tespiti ve Direnç Gelişimini Sağlayan Enzimatik Mekanizmaların Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, pp. 109, Ankara.
- Akner, M.M., Şimşek, F.M., Çağlar, S.S. 2009. Insecticide resistance of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Turkey. **J.Pestic. Sci**, 34(4): 259–264.
- Akner, M.M., Çağlar, S.S., Şimşek, F.M. 2011. Spectrum of acetylcholinesterase and insensitive acetylcholinesterase profile in *Anopheles maculipennis* in eight population of Turkey. **Abstract Book, 6th European Mosquito Control Association Workshop**, pp:76, Budapest, Hungary.
- Aldemir, A., Ege, M. 2005. Temephos aktif maddeli iki insektisidin sivrisinek (Diptera: Culicidae) larvaları üzerindeki etkinlik ve kalıcılığı. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 29(2): 126–130.
- Aldemir A., Bedir, H., Demirci, B., Alten, B. 2010. Biting activity of mosquito species (Diptera: Culicidae) in the Turkey-Armenia border area, Ararat Valley, Turkey. **Journal of Medical Entomology**, 47(1): 22–27.

- Alout, H., Berthomieu, A., Hadjivassilis, A., Weill, M. 2007. A new amino acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. **Insect Biochem. Mol. Biol**, 37: 41–47.
- Alout, H., Djogbenou, L., Berticat, C., Chandre, F., Weill, M. 2008. Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetylcholinesterase 1 biochemical properties. **Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol**, 150: 271–277.
- Alten, S.B., Çağlar, S.S. 1998. Vektör Ekolojisi ve Mücadelesi: Sıtma Vektörünün Biyo-Ekolojisi Mücadele Organizasyonu ve Yöntemleri. TC Sağlık Bakanlığı Sıtma Savaş Daire Başkanlığı ve Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü Bizim Büro Basımevi, pp. 242, Ankara.
- Alten, S.B., Çağlar, S.S., Özer, N. 2000. Malaria and its vectors in Turkey. **European Mosquito Bulletin**, 7: 27–33.
- Andreev, O., Rocheleau, T., Phillips, T.W., Beeman, R.W., ffrench – Constant, R.H. 1994. A PCR diagnostic for cyclodiene insecticide, resistance in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Pesticide Science**, 41: 345–349.
- Anthony, N.M., Benner, E.A., Rauh, J.J., Sattelle, D.B. 1991. GABA receptors of insects susceptible and resistant to cyclodiene insecticides. **Pesticide Science**, 33: 223 – 230.
- Anthony, N.M., Brown, J.K., Markham P.G., ffrench - Constant R.H. 1995. Molecular analysis of cyclodiene resistance associated mutations among populations of the sweet potato whitefly *Bemisia tabaci*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 51: 220 – 228.
- Asidi, AN., N'Guessan, R., Hutchinson, RA., Traore- Lamizana, M., Carnevale, P., Curtis, CF. 2004. Experimental hut comparisons of nets treated with carbamate or pyrethroid insecticides, washed or unwashed, against pyrethroid-resistant mosquitoes. **Med. Vet. Entomol**, 18: 134–140.

- Asidi, AN., N'Guessan, R., Koffi, AA., Curtis, CF., Hougaard, JM., Chandre, F., Darriet, F., Zaim, M., Rowland, MW. 2005. Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate or a pyrethroid alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* s.s. and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. **Malar. J.**, 4:25-34.
- Awolola, T.S., Brooke, B.D., Koekemoer, L.L., Coetzee, M. 2003. Absence of the kdr mutation in the molecular 'M' form suggests different pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* s.s. **Tropical Medicine and International Health**, 8: 420-422.
- Ayad, H., Georghiou, G.P. 1975. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity to acetylcholinesterase. **J. Econ. Entomol.**, 68: 296–297.
- Azari-Hamidian, S., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Javadian, E., Abai, M.R., Mobedi, I., Linton, Y.-M. and Harbach, R.E. 2009. Distribution and ecology of mosquitoes in a focus of dirofilariasis in northwestern Iran, with the first finding of filarial larvae in naturally infected local mosquitoes. **Med. Vet. Entomol.**, 23: 111–121.
- Bardakçı, F., Yenidünya, A.F., Yılmaz, N. 2009. Gen Klonlama ve DNA analizi Giriş. Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın. No:51, Ankara.
- Başkurt, S., Taşkın G.B., Doğaç, E., Taşkın, V. 2010. Polymorphism in the acetylcholinesterase gene of *Musca domestica* L. field populations in Turkey. **Journal of Vector Ecology**, 36 (2): 248–257.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Dahl, C., Lane, J., Kaiser, A. 2003. Mosquitoes and Their Control. Kluwer Academic, Plenum publishers, pp. 498, USA.
- Bloomquist, J.R. 1993. Neuroreceptor mechanisms in pyrethroid mode of action and resistance. In: Reviews in Pesticide Toxicology, (eds. Roe, M., Kuhr, R.J.) Toxicology Communications, pp. 181–22, Raleigh, NC.

- Boccolini, D., Luca, M., Marinucci, M., Romi, R. 2003. Further molecular and morphological support for the formal synonymy of *Anopheles subalpinus* Hackett & Lewis with *An. melanoon* Hackett. **European Mosquito Bulletin**, 16: 1–5.
- Brogdon, WG., Barber, AM. 1990. Fenitrothion- deltamethrin cross-resistance conferred by esterases in Guatemalan *Anopheles albimanus*. **Pest. Biochem. Physiol**, 37: 30–39.
- Brogdon, W. G., McAllister, J. C. 1998. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infectious Diseases**, 4(4): 605–613.
- Brown, W. 1958. Insecticide Resistance in Arthropods. **W.H.O**, pp. 240, Geneva.
- Brown, A.V. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. **J. Am. Mosq. Control Assoc**, 2(2): 123–40.
- Busvine, J.R. 1951. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. **Nature (London)**, 168: 193–195.
- Catterall, W. A. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, 26: 13 – 25.
- Chandre, F., Darriet, F., Manga, L., Akogbeto, M., Faye, O. 1999a. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.l. **European Mosquito Bulletin**, 77: 230–34.
- Chandre, F., Darriet, F., Brengues, C., Manguin, S., Carnevale, P., Guillet P. 1999b. Pyrethroid cross-resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* from Cote D'Ivoire. **J. Am. Mosq. Control Assoc**, 15: 53–59.

- Chandre, F., S. Manguin, C., Brengues, J., Dossou Yovo, F., Darriet, A., Diabate', P., Carnevale, Guillet, P. 1999c. Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the mopti form. **Parassitologia**, 41: 319-322.
- Che-Mendoza, A., Patricia Penilla, R., Américo Rodríguez, D. 2009. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. **African Journal of Biotechnology**, 8 (8): 1386–1397.
- Cluck, TW., Plapp, FW Jr., Johnston, JS. 1990. Genetics of organophosphate resistance in field populations of the house fly (Diptera: Muscidae). **J. Econ. Entomol.**, 83(1): 48–54.
- Collins, FH., Paskewitz, SM. 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. **Insect Molecular Biology**, 5: 1–9.
- Curtis, TJ. 1962. Status of mosquito and fly insecticide susceptibility in Turkey. **Mosq. News**, 22: 1422–1428.
- Cygler, M., Schrag, JD., Susman, JL., Harel, M., Silman, I., Gentry, MK. 1993. Relationship between sequence conservation and three dimensional structure in large family of esterases, lipases and related proteins. **Protein Sci**, 2: 366.
- Çağlar, S.S. 1991. Karasinek *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae)'da tetramethrin'e dirençlilik düzeyi ve hayat tablosu çalışmaları. **Doğa Turkish Journal of Zoology**, 15: 91–97.
- Çağlar, S.S., Skavdis, G. 2008. Study of The Resistance in Commonly Used Insecticides of Natural Mosquito Populations in The Province of Thrace (TBAG-U/161- 105T531nolu TÜBİTAK projesi sonuç raporu).
- Çakır, Ş., Yamanel, Ş. 2005. Böceklerde insektisitlere direnç. **Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi**, 6 (1): 21–29.

- Davidson, G. 1982. The agricultural usage of insecticides in Turkey and resurgence of malaria. In: **Proceedings of an International Workshop on Resistance to Insecticides used in Public Health and Agriculture**, pp. 22–26 February, Sri Lanka. Colombo.
- Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood P.N.R., Williamson MS. 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. **IUBMB**, 59: 151–162.
- Davies, T.G.E., Usherwood, P.N.R., Field, L.M., Williamson MS. 2007. A comparative study of voltage-gated sodium channel in the insecta: Implication for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. **Insect Mol. Biol**, 16: 361–375.
- Davies, T.G.E., O'Reilly, A.O., Field, L.M., Wallace, B.A., Williamson, M.S. 2008. Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modelling. **Pest Management Science**, 64: 1126–1130.
- della Torre A., Fanello, C., Akogbeto, M., Dossou-Yovo, J., Favia, G., Petrarca, V., Coluzzi, M. 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in west Africa. **Insect Mol. Biol**, 10: 9-18.
- Dent, D. 2000. Insect Pest Management. Cabi Bioscience Ascot, pp. 432, UK.
- Diabate, A., Ouedraogo, J.B., Baldet, T., Guillet, P., Guiguemde, T.R. 2003a. Pyrethroids resistance status of *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso (West Africa). **Med. Vet. Entomol** (in press).
- Diabate, A., Brengues, C., Baldet, T., Dabiré, KR., Hougard, JM., Akogbeto, M., Kengne, P., Simard, F., Guillet, P., Hemingway, J., Chandre, F. 2004. The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. **Trop. Med. Int. Health**, 9: 1267–1273.

- Djadid, N.D., Gholizadeh, S., Tafsiri, E., Romi, R., Gordeev, M., Zakeri, S. 2005. Molecular identification of Palearctic members of *Anopheles maculipennis* in northern Iran. **Malaria Journal**, 6: 6-16.
- Djogbénu, L., Weill, M., Hougard, JM., Raymond, M., Akogbeto, M., Chandre, F. 2007. Characterization of insensitive acetylcholinesterase in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): Resistance levels and dominance. **J. Med. Entomol**, 44: 805–810.
- Djogbénu, L., Chandre, F., Berthomieu, A., Dabiré, R., Koffi, A., Alout, H., Weill, M. 2008. Evidence of introgression of the ace-1R mutation and of the ace-1 duplication in West African *Anopheles gambiae* s.s. **Plos ONE**, 3(5): 2172-2179.
- Djogbénu, L., Noel, V., Agnew, P. 2010. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. **Malar. J.**, 13: 9–12.
- Dogan, H.M., Cetin, I., Egri, M. 2010. Spatiotemporal change and ecological modelling of malaria in Turkey by means of geographic information systems. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 104: 726–732.
- Donnelly, MJ., Corbel, V., Weetman, D., Wilding, CS., Williamson, MS., Black IV WC. 2009. Does kdr genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes? **Trends Parasitol**, 25: 213–219.
- Dong, K. 1997. A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides in the German cockroach. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 27: 93-100.
- Edwards, C.A. 1987. The environmental impact of pesticides. In: Integrated Pest Management, Protection Integree Quo Vadis, An International Perspective. **Parasitic**, 86: 309–329.

- Elliott, M., Janes, N. F., Potter, C. 1978. The future of pyrethroids in insect control. **Ann. Rev. Entomol**, 23: 443–69.
- Emden, V., Helmut, F. 2004. Pest and Vector Control. Cambridge University Press, pp. 363, England.
- Enayati, AA., Vatandoost, H., Ladonni, H., Townson, H., Hemingway, J. 2003. Molecular evidence for a *kdr* like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. **Med. Vet. Entomol**, 17: 138–144.
- Famham, A.V., Murray, A.W.A., Sawicki, R.M., Denholm, I., White, J.C. 1987. Characterization of the structure activity relationship of *kdr* and two variants of super *kdr* to pyrethroids in the housefly (*Musca domestica* L.). **Pesticide Science**, 44: 269–275.
- French-Constant, R.H., Roush, R.T. 1991. Gene mapping and cross-resistance in cyclodiene insecticide-resistant *Drosophila melanogaster* (Mg.) **Genet. Res**, 57(1): 17–21.
- French-Constant, R.H., Steichen, J., Rocheleau, T.A., Aronstein, K., Roush, R.T. 1993b. A single amino acid substitution in gamma aminobutyric acid subtype A receptor locus associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. **Proceedings of The United National Academy of Sciences of The United States of America**, 90: 1957–61.
- Floate, K. 2001. <http://res2.agr.ca/lethbridge/scitech/kdf/resist.htm>
- Fournier, D., Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M. 1993. *Drosophila* acetylcholinesterase: mechanisms of resistance to organophosphates. **Chem. Biol. Interact**, 87: 233–38.
- Fournier, D., Mutero, A. 1994. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. **Comparative Biochem. Physiol**, 108: 19–31.

- Georghiou, G.P. 1986. The Magnitude of The Resistance Problem in Pesticide Resistance Strategies and Tactics for Management. National Reserach Council (U.S.). National Academy Press, pp. 14–43, Washington, D.C.
- Georghiou, G.P., Lagunes-Tejeda, A. 1991. The Occurrence of Resistance to Pesticides in Arthropods. An index of cases reported through 1980. Rome: Food and Agricultural Organization of The United Nations.
- Giray, H. 1977. Böceklerin insektisitlere karşı dayanıklılığı. **Türkiye Bitki Koruma Dergisi**, 1 (1): 29–38.
- 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, pp. 45–54, Washington, D.C.
- Guerrero, F.D., Jamroz, R.C., Kammlah, D., Kunz, S.E. 1997. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of *kdr* and *super-kdr* point mutations. **Insect Biochem. Mol. Biol**, 27: 745–755.
- Güler, Ç., Çobanoğlu, Z. 1997. Pestisitler. Sağlık Bakanlığı, Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi, 52. Ankara.
- Hall, T.A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT. Nucl. Acids. Symp. Ser, 41: 95–98.
- Harbach, R.E., Kitching, I.J. 2005. Reconsideration of *Anopheline* phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. **Systematics and Biodiversity**, 3: 345–374.
- Harbach, R.E. 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, 1668: 591–638.

- Harbach, R.E. 2011. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, 1668: 591–638.
- He, H., Chen, A.C., Davey, R.B., Ivie, G.W., George, J.E. 1999. Identification of a point mutation in the *para*-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 261: 558–561.
- Head, D.J., McCaffery, A.R., Callaghan, A. 1998. Novel mutations in the *para*-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in Heliothine lepidoptera. **Insect Mol. Biol**, 7: 191–196.
- Hemingway, J. 1985. The biochemistry of insecticide resistance in *Anopheles sacharovi*: comparative studies with a range of insecticide susceptible and resistant *Anopheles* and *Culex* species. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 24: 68–76.
- Hemingway, J. 1992. Insecticide resistance gene frequencies of *Anopheles sacharovi* populations of Çukurova Plain, Adana Province, Turkey. **Medical and Veterinary Entomology**, 6: 342–348.
- Hemingway, J., Ranson, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annu. Rev. Entomol**, 45: 371–391.
- Hoti, S.L., Vasuki, V., Jambulingam, P., Sahu, S.S. 2006. *Kdr* allele-based PCR assay for detection of resistance to DDT in *Anopheles culicifacies* sensu lato Giles population from Malkangiri District, Orissa, India. **Curr. Sci**, 91: 658–661.
- Ingles, D.J., Adams, P.M., Knipple, D.C., Soderlund, D.M. 1996. Characterization of the voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide susceptible and knockdown resistant house fly strains. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 26: 319–326.
- Jetten, T.H., Takken, W. 1994. Anophelism without malaria in Europe. **Wageningen Agricultural University Papers**. 94–95.

- Kadous, A.A., Ghiasuddin, S.M., Matsummura, F., Scott, J. G., Tanaka, K. 1983. Difference in the picrotoxinin receptor between the cyclodiene - resistant and susceptible strains of the German-cockroach. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 19: 157–166.
- Kampen, H. 2005. Integration of *Anopheles beklemishevi* (Diptera: Culicidae) in an PCR assay diagnostic for palearctic *Anopheles maculipennis* sibling species. **Parasitological Research**, 97: 113–117.
- Karunaratne Parakrama, S.H.P. 1998. Insecticide resistance in Insects: A review. 1998. **Cey. J. Sci, (Bio. Sci.)** 25: 72-99.
- Karunaratne, S., Hawkes, NJ., Perera, MDB., Ranson, H., Hemingway, J. 2007. Mutated sodium channel genes and elevated monooxygenases are found in pyrethroid resistant populations of Sri Lankan malaria vectors. **Pestic. Biochem. Physiol**, 88: 108–113.
- Kasap, H. 1987. Development of *Plasmodium vivax* in *Anopheles superpictus* under experimental conditions. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 37: 241–245.
- Kasap, M. 1989. Insecticides and their use in vector kontrol. **Acta Parasitologica Turcica**, 13 (2): 209–226.
- Kasap, H. 1990. Comparison of experimental infectivity and development of *Plasmodium vivax* in *Anopheles superpictus* in Turkey. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 42: 111–117.
- Kasap, H., Kasap, M., Akbaba, M., Alptekin, D.O., Demirhan, O., Lüleyap, Ü., Pazarbaşı, A., Akdur, R., Wade, J. 1992. Residual efficacy of pirimiphos methyl (Actellic) on *Anopheles sacharovi* in Cukurova, Turkey. **J. Am. Mosq. Control Assoc**, 8: 47–51.

- Kasap, H., Alptekin, D. 1997. Sivrisinekler, Vektörlükleri ve Kontrolü. Parazitoloji'de Artropod Hastalıkları ve Vektörler, (editör: M. Ali Özcel, Nilgün Daldal), Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No: 13, Ege Üniversitesi Basımevi, pp. 527, İzmir.
- Kasap, H., Lüleyap, Ü., Alptekin, D., Kasap, M. 1999. Use of insecticides in Çukurova and development of resistance in mosquitoes. **Acta Parasitologica Turcica**, 23: 267–272.
- Kasap, H., Kasap, M., Alptekin, D., Lüleyap, Ü., Herath, P. R. J. 2000. Insecticide resistance in *Anopheles sacharovi* Favre in Southern Turkey. **Bulletin of World Health Organization**, 78: 687–692.
- Kazanidou, A., Nikou, D., Grigoriou, M., Vontas, J., Skavdis, G. 2009. Short Report: A Multiplex PCR Assay for Simultaneous Genotyping of *kdr* and *ace-1* Loci in *Anopheles gambiae*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 80(2): 236–238.
- Keiding, J. 1999. Review of the global status and recent development of insecticide resistance in field populations of the housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Bulletin of Entomological Research**, 89 (1): 1–67.
- Kence, M. 1988. Ecological Genetics of Malathion Resistance in Housefly, *Musca domestica* L. Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, pp. 108. Ankara.
- Kim, H., Baek, JH., Lee, WJ., Lee, SH. 2007. Frequency detection of pyrethroid resistance allele in *Anopheles arabiensis* populations by real-time PCR amplification of specific allele (rtPASA). **Pestic Biochem Physiol**, 87: 54–61.
- Kuyucu, A.C. 2007. İnektisit Direncinin Karasinek, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae)'nın Uyumsal Özellikleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

- Lak, S.S., Vatandoost, H., Entezarmahdi, M.R., Ashraf, H., Abai, M.R., Nazari, M. 2002. Monitoring of insecticide resistance in *Anopheles sacharovi* (Favre, 1903) in borderline of Iran, Armenia, Naxcivan and Turkey, 2001. 2002. **Iranian J. Publ. Health**, 31: 96–99.
- Lee, S.H., Dunn, J.B., Clark, J.M., Soderlund, D.M. 1999b. Molecular analysis of *kdr*-like resistance in a permethrin-resistant strain of Colorado potato beetle. **Pestic. Biochem. Physiol.**, 63: 63–75.
- Levin, B.R. 1984. Science as a way of knowing evolutionary biology. **Annual Zoology**, 24: 467–534.
- Linn, S, Arber, W. 1968. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 59(4):1300–6.
- Lin, H., Bloomquist, J.R., Becman, R. W., Clark, J. M. 1993. Mechanisms underlying cyclodiene resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 45: 154–164.
- Linton, Y.M., Samanidou-Voyadjoglou, A., Smith, L., Harbach, R.E. 2001. New occurrence records for *Anopheles maculipennis* and *An. messeae* in northern Greece based on DNA sequence data. **Eur. Mosq. Bull**, 13: 31–36.
- Linton, Y.M., Samanidou-Voyadjoglou, A., Harbach, R.E. 2002. Ribosomal ITS2 sequence data for *Anopheles maculipennis* and *An. messeae* in northern Greece, with a critical assessment of previously published sequences. **Ins. Mol. Bio**, 11: 379–383.
- Linton, Y–M., Smith, L., Koliopoulos, G., Zounos, A.K., Samanidou-Voyadjoglou, A., Patsoula, E., Harbach, R.E. 2007. The *Anopheles* (*Anopheles*) *maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Greece. **Journal of Natural History**, 41: 2683–2699.

- Liu, Z., Valles, S.M., Dong, K. 2000. Novel point mutations in the German cockroach *para* sodium channel gene are associated with knockdown resistance (*knr*) to pyrethroid insecticides. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 30: 991–997.
- Loughney, A., Kreber, R., Ganetzky, B. 1989. Molecular analysis of the *para* locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. **Cell**, 58: 1143–1154.
- Lüleyap, Ü. 1996. Physiological Resistance To İnsecticides Among Mosquitoes İn The Çukurova District. Çukurova University Institute of Health Sciences, PhD thesis, Adana, Turkey.
- Lüleyap, Ü., Kasap, H. 2000. Sıtma vektörü *Anopheles sacharovi*'de fizyolojik insektisit direnci. **Turk. J. Biol.**, 24: 437–460.
- Lüleyap, Ü., Alptekin, D., Kasap, H., Kasap, M. 2002. Detection of knockdown resistance mutations in *Anopheles sacharovi* (Diptera: Culicidae) and genetic distance with *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) using cDNA sequencing of the voltage-gated sodium channel gene. **Journal of Medical Entomology**, 39: 870–874.
- Malcolm, C.A., Bourguet, D., Ascolillo, A., Rooker, S.J., Garvey, C.F., Hall, L.M.C., Pasteur, N., Raymond, M. 1998. A sex – linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase – mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. **Insect. Mol. Biol.**, 7: 107–120.
- Marinucci, M., Romi, R., Mancini, P., Di Luca, M., Severini, C. 1999. Phylegenetic relationships of seven palearctic members of the *Maculipennis* complex inferred from ITS2 sequences analysis. **Insect Molecular Biology**, 8(4): 469–480.
- Martinez-Torres, D., Devonshire, A.L., Williamson, M.S. 1997. Molecular studies of knockdown resistance to pyrethroids: cloning of domain II sodium channel gene sequences from insects. **Pestic. Sci.**, 51: 265–270.

- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Berge, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N., Pauron, D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. **Insect Mol. Biol**, 7: 179–184.
- Martinez-Torres, D., Chevillon, C., Brun-Barale, A., Berge, J.B., Pasteur, N., Pauron, D. 1999a. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. **Pestic. Sci**, 55: 1012–1020.
- Martinez-Torres, D., Foster, S.P., Field, L.M., Devonshire, A.L., Williamson, M.S. 1999b. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peachpotato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Insect Mol. Biol**, 8: 339–346.
- Matsumura, F. 1985. Toxicology of Insecticides. Plenum Press, New York, USA.
- Menozi, P. 2000. Caracterisation d'insectes et Comprehension des Mecanismes de rRsistance Aux Insecticides a l'aide de Techniques de Biologie Molecularie. These de Doctorat, Universite Paul Sabatier.
- Merdivenci, A. 1984. Türkiye Sivrinekleri (Yurdumuzda Varlığı Bilinen Sivrineklerin Biyo – Morfolojisi, Biyo – Ekolojisi, Yayılışı ve Sağlık Önemleri). İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, pp 340, İstanbul.
- Meselson, M., Yuan, R. 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. **Nature**, 217(5134):1110–4.
- Milani, R., 1954. Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbattente del DDT: correlazione tran abbattimento e mortalita in *Musca domestica*. **L. Riv. Parassitol**, 15: 513–542.

- Miyazaki, M., Ohyama, K., Dunlap, D.Y., Matsumura, F. 1996. Cloning and sequencing of the *para*-type sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). **Mol. Gen. Genet**, 252: 61–68.
- Moore, J.A. 1984. Science as a way of knowing evolutionary biology. **Annual Zoology**, 24: 467–471.
- Mori, A., Tomita, T., Hidoh, O., Kono, Y., Severson, D.W. 2001. Comparative linkage map development and identification of an autosomal locus for insensitive acetylcholinesterase – mediated insecticide resistance in *Culex tritaeniorhynchus*. **Insect Mol. Biol**, 10: 197–203.
- Morin, S., Williamson, M.S., Goodson, S.J., Brown, J.K., Tabashnik, B.E., Dennehy, T.J. 2002. Mutations in the *Bemisia tabaci para* sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. **Insect Biochem. Mol. Biol**, 32: 1781–1791.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M., Fournier, D. 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 91: 5922–5926.
- Narahashi, T. 1996. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. **Pharmacol. Toxicol**, 78: 1–14
- N’guessan, R., Darriet, F., Traore–Lamizana, M., Corbel, V., Kofi, A.A., Chandre, F. 2003. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae s.s.* from Ivory Coast based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. **Med. Vet. Entomol**, 17(1): 19–25.
- Nicolescu, G., Linton, Y.M., Vlademirescu, A., Howard, T.M., Harbach, R.E. 2004. Mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* group (Diptera: Culicidae) in Romania, with the discovery and formal recognition a new species based on molecular and morphological evidence. **Bull. Ent. Res**, 94: 525–535.

- Oppenorth, F.J. 1982. Two different Paraoxon resistant acetylcholinesterase mutants in the housefly. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 18: 26–27.
- O'reilly, AO., Khambay, BPS., Williamson, MS., Filed, LM., Wallace, BA., Davies, TGE. 2006. Modelling insecticide-binding sites in the voltage gated sodium channel. **Biochem. J**, 396: 255–263.
- Özbilgin, A., Topluoglu, S., Islek, E., Mollahaliloglu, E., Erkok, Y. 2011. Malaria in Turkey: Successful control and strategies for achieving elimination, **Acta Tropica**, 120: 15-23.
- Park, Y., Taylor, M.F.J. 1997. A novel mutation L1029H in sodium channel gene *hscp* associated with pyrethroid resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Biochem. Mol Biol**, 27: 9–13.
- Park, Y., Taylor, M.F.J., Feyereisen, R. 1997. A valine 421 to methionine mutation in IS6 of the *hscp* voltage-gated sodium channel associated with pyrethroid resistance in *Heliothis virescens* F. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 239: 688–691.
- Parrish, D.W. 1959. The mosquitoes of Turkey. **Mosquito News**, 19: 264–266.
- Pedigo, L.P. 1996. Entomology and Pest Management. Prentice Hall Inc, 679 p.
- Pittendrigh, B., Reenan, R., Ffrench-Constant, R.H., Ganetzky, B. 1997. Point mutations in the *Drosophila* sodium channel gene *para* associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides. **Mol. Gen. Genet**, 256: 602–610
- Plapp, F.W. 1984. The genetic basis of insecticide resistance in the housefly: Evidence that a single locus plays a major role in metabolic resistance to insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 22: 194.
- Postiglione, M., Tabanlı, B., Ramsdale, C. 1973. The *Anopheles* of Turkey. **Rivista Di Parassitologia**, 34: 128–159.

- Proft, J., Maier, W.A., Kampen, H. 1999. Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera:Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. **Parasitol. Res**, 85: 837–843.
- Ramsdale, C.D. 1975. Insecticide resistance in *Anopheles* of Turkey. **Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, 69: 226-235.
- Ramsdale, C.D., Herath, P.R.J., Davidson, G. 1980. Recent development of insecticide resistance in some Turkish *Anophelines*. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 83: 11–19.
- Ramsdale, C.D., Alten, B., Çağlar, S.S., Özer, N. 2001. A revised, annotated checklist of the mosquitoes (Diptera, Culicidae) of Turkey. **European Mosquito Bulletin**, 9: 18–28.
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J., Collins, F.H. 2000. Identification of a point mutation in the voltage gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. **Insect Mol. Biol**, 9: 491–497.
- Raymond, M., Berticat, C., Weill M., Pasteur, N., Chevillon, C. 2001. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? **Genetica**, 112-113:287-296.
- Ren, X., Han, Z., Wang, Y. 2002. Mechanism of monocrotophos resistance in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Arch. Insect Biochem. Physiol**, 51: 103–110.
- Rivero, A., Vezher, J., Weill, M., Read, A.F., Gandon, S. 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? **PLoS Pathol**, 6: 100.
- Romi, R., Boccolini, D., Di Luca, M., La Rosa, G., Maruncci, M. 2000. Identification of the sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex by heteroduplex analysis. **Insect Molecular Biology**, 9: 509–513.

- Roush, R.T. 1989. Designing resistance management programs: How can you choose? Society of chemical industry. **Pest. Sci**, 31: 613–689.
- Sattelle, D.B., Yamamoto, D. 1988. Molecular targets of pyrethroid insecticides. **Adv. Insect Physiol**, 20: 147–213.
- Schuler, T.H., Martinez-Torres, D., Thompson, A.J., Denholm, I., Devonshire, A.L., Duce, I.R., Williamson, M.S. 1998. Toxicological, electrophysiological, and molecular characterisation of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Pestic. Biochem. Physiol**, 59: 169–192.
- Scott, J.G. 1999. Cytochromus P₄₅₀ and insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 29: 757–777.
- Sedaghat, M.M., Linton, Y.M., Nicolescu, G., Smith, L., Koliopoulos, G., Zounos, A.K., Oshagi, M.A., Vatandoost, H., Harbach, R.E. 2003. Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles) sacharovi* Favre, a primary vector of malaria in the Middle East. **Sys. Entomol**, 28: 241–256.
- Sevgili, E., Şimşek, F.M. 2012. Distribution pattern and molecular identification of *Anopheles maculipennis* complex in eight river basins of Anatolia, Turkey. **North-Western Journal of Zoology**, 8: 223–231.
- Soderlund, D.M., Bloomquist, J.R. 1990. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Pesticide Resistance in Arthropods (eds. Roush, R.T., Tabashnik, B. E.), Chapman and Hall, pp. 58–96, New York, NY.
- Soderlund, D.M. 1995. Mode of action of pyrethrins and pyrethroids. In: Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses (eds. Casida, J.E., Quistad, G.B.), Chemistry, pp. 217– 233.
- Soderlund, D.M. 1997. Molecular mechanisms of insecticide resistance. (Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals. **Chemistry of Plant Protection**, 13: 21–73.

- Soderlund, D.M., Knipple, D.C. 1999. Knockdown resistance to DDT and pyrethroid in the house fly (Diptera:Muscidae): From genetic trait to molecular mechanism. **Annals of the Entomological Society of the America**, 92 (69): 909–915.
- Soderlund, D.M., Knipple, D.C. 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 33: 563–577.
- Steichen, J. C., French-Constant, R. H. 1994. Amplification of specific cyclodiene insecticide resistance alleles by the polymerase chain reaction. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 48: 1 -7.
- Syafruddin, D., Hidayati, Anggi PN., Puji BS Asih., Hawley, William A., Sukowati, Supratman., Lobo, Neil F. 2010. Detection of 1014F mutation in four major *Anopheline* malaria vectors in Indonesia. **Malaria Journal**, 9: 315-323.
- Şahin, İ. 1984. Antalya ve çevresindeki sivrisinekler (Diptera: Culicidae) ve filariose vektörü olarak önemleri üzerine araştırmalar II. Sivrisinek Faunasını Belirlemek Amacıyla Yapılan çalışmalar, **Doğa Bilim Dergisi**, A2, 8 (3): 385–396.
- Şimşek, F.M., Kaynaş, S., Özensoy Toz, S., Özbel, Y., Alten, B., Chan, A.S.T. 2010. Evaluation of the VecTest malaria antigen panel assay using *Anopheles sacharovi* specimens in an endemic area, Sanliurfa Province, Turkey. **Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg**, 16: 231–234.
- Şimşek, F.M., Ülger, C., Akıner, M.M., Şenol Tuncay, S., Kiremit, F., Bardakçı, F. 2011. Molecular identification and distribution of *Anopheles maculipennis* complex in the Mediterranean region of Turkey. **Biochem. Syst. And Ecol**, 39: 258–265.

- Tan, WL., Wang, ZM., Li, CX., Chu, HL., Xu, Y., Dong, YD., Wang, Z., Chen, DY., Liu, H., Liu, DP. 2012. First report of co-occurrence knockdown resistance mutations and susceptibility to beta-cypermethrin in *Anopheles sirensis* from Hangsu Province. **China Plos One**, 7: 229–242.
- Thompson, M., Shotkoski, F., French – Constant, R.H. 1993. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **FEBS Lett**, 325: 187–90
- Tomita, T., Hidoh, O., Kono, Y. 2000. Absence of protein polymorphism attributable to insecticide – insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. **Insect Biochem. Mol. Biol**, 30: 325 – 333.
- Tomlin, C. 1997. The Pesticide Manual: Eleventh Edition. Crop Protection Publications, British Crop Protection Council and the Royal Society of Chemistry, United Kingdom.
- Vatandoost, H., McCaffery, AR., Townson, H. 1996. An electrophysiological investigation of target site insensitivity mechanisms in permethrin-resistant and susceptible strains of *Anopheles stephensi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 90: 216-221.
- Verhaeghen, K., Bortel, WV., Trung, HD., Sochantha, T., Coosemans, M. 2009. Absence of knockdown resistance suggests metabolic resistance in the main malaria vectors of the Mekong region. **Malar. J**, 8: 84-98.
- Verhaeghen, K., Bortel, WV., Trung, HD., Sochantha, T., Keokenchanh, K., Coosemans, M. 2010. Knockdown resistance in *Anopheles vagus*, *An. sinensis*, *An. paraliae* and *An. peditaeniatus*. **Parasit. Vectors**, 3: 59-61.
- Vulule, JM., Beach, RF., Atieli, FK., Roberts, JM., Mount, DL., Mwangi, RW. 1994. Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. **Med. Vet. Entomol**, 8: 71–75.

- Yavuz, O., Şanlı, Y. 1999. Halk sağlığı ve Vektör Kontrolünde Kullanılan Pestisidler, Pestisid Formülasyonları ve Uygulama Seçenekleri. I. Seminer. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmokoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Yorulmaz, S., Ay, R. 2010. Akar ve böceklerde pestisitlerin detoksifikasyonunda rol oynayan enzimler. **Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi**, 24(2): 137–148.
- Yu, S.J. 2008. The Toxicology and Biochemistry of Insecticides. CRC Press Taylor- Francis Group, pp. 250.
- Zulueta, J.D.E. 1959. Insecticide resistance in *Anopheles sacharovi*. **Bulletin of the World Health Organization**, 20: 797–822.
- Weill, M., Fort, P., Berthomieu, A., Dubois, M.P., Pasteur, N., Raymond, M. 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. **Proc. Biol. Sci**, 269: 2007–2016.
- Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Philips, A., Fort, P., Raymond, M. 2003. Insecticide resistance in mosquito vectors. **Nature**, 423: 136–137.
- Weill, M., Berthomieu, A., Berticat, C., Lutfalla, G., Negre, V., Pasteur, N., Philips, A., Leonetti, J.P., Fort, P., Raymond, M. 2004a. Insecticide resistance: a silent base prediction. **Curr. Biol**, 14: 396–403.
- Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Bertomieu, A., Marquine, M., Raymond, M. 2004b. The unique mutation in *ace - 1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. **Insect Molecular Biology**, 13: 1–17.

- Williamson, M. S., Denholm, I., Bell, C. A., Devonshire, A.L. 1993. Knockdown resistance (*knr*) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). **Molecular and General Genetics**, 240: 17–22.
- Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A., Devonshire, A. L. 1996. Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*knr*) to pyrethroid insecticides. **Molecular and General Genetics**, 252: 51–60.
- White, G.B. 1978. Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex. **Mosq. Syst**, 10: 13–44.
- WHO, 1992. Vector Resistance to Pesticides. Fifteenth Report of The Expert Committee on Vector Biology and Control. In WHO Technical Report Series No: 818: 1–55.
- WHO, 1995. Vector Control for Malaria and Other Mosquito Borne Diseases. Technical Report Series No: 857 Geneva.
- WHO, 1998. Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio – Efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surfaces. Report of the WHO Informal Consultation. WHO, Geneva, Switzerland, 28 – 30 September 1998.
- WHO, 2000a. Progress with Roll Back Malaria, In the WHO European Region. WHO Regional Office for Europe, Denmark, pp. 27.
- WHO, 2000b. RBM Action at Country Level, Country Updates, October 1998–June 2000. WHO/CDS/RBM/2000.24 Switzerland, pp.80
- WHO, 2009. World Malaria Report 2009. Geneva, Switzerland.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Fatma BURSALI
Doğum Yeri ve Tarihi : Bakırköy / 26.10.1987

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Pamukkale Üniversitesi, 2009
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- a) Makaleler
 - SCI
 - Diğer
- b) Bildiriler
 - Uluslararası
Şimşek, F.M., Ülger C., Akıner, M.M., Günerkan, F., Cihangir, S.İ., Bardakcı, F., Mosquito species in southern Turkey (Mediterranean Region), Abstract Book, 6th European Mosquito Control Association Workshop, Budapest, Hungary, p: 115, 2011.
 - Ulusal
- c) Katıldığı Projeler
 1. Aydın İli Sivrisinek Populasyonlarında İnsektisit Direnç Düzeylerinin Analizi, ADÜ-BAP-FEF-12004, Araştırmacı, 2012-2014.
 2. Türkiye'nin Güneydoğu, Akdeniz ve Ege Bölgelerinde Anopheles türlerinin İnsektisit Direnci, TÜBİTAK-112T469, Araştırmacı, 2012-2014.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Adnan Menderes Üniversitesi/Aralık 2009-halen

İLETİŞİM

E-posta Adresi : fatma.gunerkan@adu.edu.tr
Tarih : 10.01.2013