

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ZEYTİN SİNEĞİ (*Bactrocera oleae*)
POPÜLASYONLARININ GENETİK
KARAKTERİZASYONU VE BU POPÜLASYONLARDA
ORGANOFOSFAT İNSEKTİSİT DİRENÇ MUTASYON
FREKANSLARININ BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

ERSİN DOĞAÇ

NİSAN 2013

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ZEYTİN SİNEĞİ (*Bactrocera oleae*)
POPÜLASYONLARININ GENETİK
KARAKTERİZASYONU VE BU POPÜLASYONLARDA
ORGANOFOSFAT İNSEKTİSİT DİRENÇ MUTASYON
FREKANSLARININ BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

ERSİN DOĞAÇ

NİSAN 2013

MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

Ersin DOĞAÇ tarafından hazırlanan Zeytin sineği (*Bactrocera oleae*) popülasyonlarının genetik karakterizasyonu ve bu popülasyonlarda organofosfat insektisit direnç mutasyon frekanslarının belirlenmesi başlıklı tezinin, 22/04/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ (Jüri Başkanı)

Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla S.K. Üniversitesi, Muğla

İmza: 

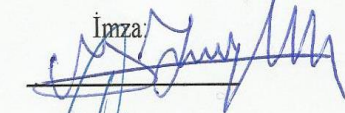
Prof. Dr. İrfan KANDEMİR (Üye)

Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi, Ankara

İmza: 

Prof. Dr. Ahmet ZEYBEK (Üye)

Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla S.K. Üniversitesi, Muğla

İmza: 

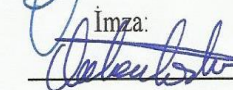
Doç. Dr. Melek ÖZKAN (Üye)

Çevre Mühendisliği, GYTE, Kocaeli

İmza: 

Yrd. Doç. Dr. Vatan TAŞKIN (Danışman)

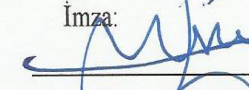
Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla S.K. Üniversitesi, Muğla

İmza: 

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

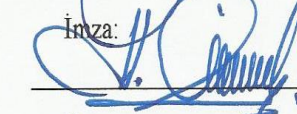
Prof. Dr. Fevzi YILMAZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü, Muğla S.K. Üniversitesi, Muğla

İmza: 

Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK

Biyoloji Bölüm Başkanı, Muğla S.K. Üniversitesi, Muğla

İmza: 

Yrd. Doç. Dr. Vatan TAŞKIN

Danışman, Biyoloji A.B.D. Muğla S.K. Üniversitesi, Muğla

İmza: 

Savunma Tarihi: 22/04/2013

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

Ersin DOĞAÇ

22/04/2013



ÖZET

ZEYTİN SİNEĞİ (*Bactrocera oleae*) POPÜLASYONLARININ GENETİK KARAKTERİZASYONU VE BU POPÜLASYONLARDA ORGANOFOSFAT İNSEKTİSİT DİRENÇ MUTASYON FREKANSLARININ BELİRLENMESİ

Ersin DOĞAÇ

Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Vatan TAŞKIN

Mayıs 2013, 166 sayfa

Zeytin sineği (*Bactrocera oleae*) dünya’da zeytin bitkisinin yetiştirildiği bütün alanlarda, özellikle de Akdeniz havzasında ve Kuzey Amerika’da en önemli zeytin zararlısıdır. Zeytin sineğinin ekonomik açıdan önemli olmasına rağmen, bu türün yayılım yolları net değildir. Bu tez çalışmasında Doğu Akdeniz havzasının önemli bir kısmını temsil eden Türkiye’deki zeytin sineği popülasyonlarının yayılım yolları ve bu popülasyonların genetik yapısı hakkında bilgi sağlamak için mikrosatellit ve mitokondriyal DNA belirteçleri kullanılmıştır. Bu amaçla ülkemizde zeytin yetiştiriciliğinin yapıldığı bütün alanları kapsayacak şekilde 12 ile ait 38 alt lokasyondan vuruklu meyveler toplanarak ergin bireyler elde edilmiştir. Sonuçlar, zeytin sineği popülasyonları arasında önemli bir genetik çeşitlilik olduğu ve Ege ve Akdeniz popülasyonları arasında önemli derecede genetik farklılık olduğunu ortaya koymuştur. Akdeniz popülasyonları, Ege popülasyonlarına oranla daha yüksek seviyede mikrosatellit çeşitliliğine sahiptir ve bu durum Akdeniz’in Doğu kısmının bu organizmanın Orta Doğu’dan Avrupa’ya yayılımında önemli bir yere sahip olduğuna işaret etmektedir. Çalışma sonucu popülasyonlardaki ortalama gözlenen heterozigotluk değeri 0.78, ortalama beklenen heterozigotluk değeri 0.76 olarak bulunmuştur. Popülasyonlar arasında gen akış düzeyi $N_{em}= 8.36$ olarak bulunmuştur. MtDNA sonuçları Türkiye’nin Batı’sından toplanan zeytin sineği örneklerinin Akdeniz havzasının İtalya-Ege grubu ile oldukça yakından ilişkili olduğunu ve bu organizmanın Avrupa’ya ülkemiz üzerinden yayıldığı ihtimalini göstermektedir. Buna ek olarak Amerika kıtasına ait daha önceki çalışmalardan elde edilen mtDNA haplotiplerinin çalışmamızda yüksek frekansta bulunması bu kıtada bulunan zeytin sineği popülasyonlarının muhtemel kaynağının ülkemiz olabileceğini göstermektedir. Bu organizmanın popülasyon yapısını ve yayılım yollarını daha kesin bir şekilde belirlemek için daha fazla DNA’ya dayalı baz dizi analizi çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Ace geni tarafından kodlanan asetilkolinesteraz enzimi organofosfat grubu insektisitlerin temel hedefidir. Zeytin sineğinde daha önceden tanımlanmış üç mutasyon, farklı seviyelerde organofosfat duyarsızlaşmasını sağlamaktadır. Çalışmamızda organofosfat insektisit direncinde önemli bir rol oynayan asetilkolinesteraz enziminin 214 ve 488 numaralı bölgelerini kodlayan *Ace* geninin kısmi baz dizi analizi yapılmak suretiyle ve ekzon10 içerisinde bulunan 9 bç'lik delesyon bölgesinin ise poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemi kullanılarak çalışılan bireylerdeki organofosfat direnç mutasyonlarının sıklığı belirlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız zeytin sineği popülasyonlarında *Ace* geni ekzon 3 ve 6 bölgelerinin kısmi baz dizi analizlerinin yapılması sonucu elde edilen gen içi çeşitlilik değerleri karşılaştırıldığında Akdeniz popülasyonları Ege popülasyonlarına oranla daha yüksek gen içi çeşitliliği değerlerine sahiptir. Bunun yanı sıra *Ace* geninde direnç mutasyon sıklık farklılıklarına bakıldığında ülkemizde direnç mutasyon oranları yüksek bulunmuştur. Bu direnç mutasyonlarını bölgeler bazında kıyasladığımızda Ege popülasyonlarında Akdeniz'e oranla çok daha yüksek direnç mutasyon frekansları gözlenmiştir. Ekzon 10 bölgesinde bulunan $\Delta 3Q$ mutasyon frekansı ise 0.064 olarak bulunmuştur. Ekzon 3-6 ve 10 da gözlenen allel kombinasyonlarına bakıldığında çalışmamızdaki popülasyonlarda en fazla gözlenen allel kombinasyonu 214Val/Val-488Ser/Ser-SS kombinasyonudur (% 41). İkinci en fazla görülen kombinasyon ise %28 ile 214Ile/Val-488Gly/Ser-SS kombinasyonudur.

Anahtar Kelimeler: Zeytin sineği, Popülasyon genetiği, Mikrosatellit, mtDNA, *Ace* geni, Asetilkolinesteraz, Organofosfat direnci.

ABSTRACT

GENETIC CHARACTERIZATION OF OLIVE FLY (*Bactrocera oleae*) POPULATIONS AND THE DETERMINATION OF ORGANOPHOSPHATE RESISTANCE-ASSOCIATED MUTATION FREQUENCIES OF THESE POPULATIONS

Ersin DOĞAÇ

Philosophy of Doctorate Thesis

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Vatan TAŞKIN

May 2013, 166 pages

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is the most important pest in olive growing regions worldwide, especially in the Mediterranean basin and North America. Despite the economic importance of the olive fly, the spreading route of this species is unclear. In this thesis microsatellite and mitochondrial DNA markers were used for providing information about the population structure and invasion route of olive fly populations in Turkey, as representative of the Eastern Mediterranean region. In this purpose, hatched fruit samples were collected from 38 sublocations belonging 12 cities including all olive growing regions in Turkey. The results were presented significant genetic diversity between olive fly populations and a certain degree of differentiation between Mediterranean and Aegean populations. Mediterranean populations present higher levels of microsatellite variation than Aegean populations and this situation indicates that the eastern part of the Mediterranean has an important role on the invasion of this organism from Middle East to Europe. At the end of the study average observed heterozygosity value in populations was found as 0.78 and the average expected heterozygosity value was found as 0.76. High gene flow among populations, $N_{em}=8.36$, were determined. MtDNA results suggest olive flies from the western part of Turkey are closely related to Italo-Aegean flies of the Mediterranean basin and the olive fly populations have invaded the northern part of the Mediterranean basin through western Turkey. In addition, finding specific American haplotypes in high frequencies might indicate that Turkey is the possible source of American olive fly populations. In order to more precisely characterize the population structure and invasion routes of this organism, more DNA-based sequence analysis should be carried out worldwide.

Acetylcholinesterase, encoded by the *Ace* gene, is the molecular target of organophosphate insecticides. Three mutations have previously been identified in the olive fly confer different levels of organophosphate resistance. In this study 214 and 488 numbered regions, which play a significant role in organophosphate insecticide resistance of the olive fruit fly, is detected through base sequence analysis and 9 base

pairs deletion region inside exon10 is analyzed through polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) for the frequency of organophosphate resistance mutation in the members being studied. When gene diversity acquired by the partial base sequence analysis of the regions 3 and 6 of *Ace* gene belonging to the olive fly populations used in our study, Mediterranean populations have higher gene diversity compared to the Aegean populations. In addition, with regards to resistance mutation frequency differences in *Ace* gene Resistance mutation ratio in our country is found to be high. When we compared this resistance mutations on the basis of regions, Aegean populations has higher resistance mutation frequency than Mediterranean populations. $\Delta 3Q$ mutation frequency in Exon 10 region is found to be 0.064. In our study highest allele combination observed in the populations, when allele combinations in Exon 3-6 and 10 is monitored, is 214Val/Val-488Ser/Ser-SS combination (% 41). Second most frequently observed combinations is 214Ile/Val-488Gly/Ser-SS with a ratio of % 28.

Keywords: Olive fly, Microsatellite, Population genetics, mtDNA, *Ace* gene, Acetylcholinesterase, Organophosphate resistance.

Sevgili Eşim ve Kızıma

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel katkıları ile bana her zaman destek olan, eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen ve her konuda yol gösteren değerli hocam, tez danışmanım sayın *Yrd. Doç. Dr. Vatan TAŞKIN*'a ve sayın *Prof. Dr. İrfan KANDEMİR*'e,

Araştırmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam, *Yrd. Doç. Dr. Belgin GÖÇMEN TAŞKIN*'a
derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Araziler sırasında bizden yardımlarını esirgemeyen Tarım İl Müdürlükleri çalışanlarına ve zeytin yetiştiricilerine *teşekkürü bir borç bilirim,*

Deneyletim sırasında bana her zaman yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım *Ar. Gör. Taylan DOĞAROĞLU, Nilden VARDARELİ, Elçin ÇAĞATAY ve Berna YÖRÜK*'e,

Sevgi ve desteklerini eksik etmeyen tüm dostlarım ve çalışmaktan büyük keyif aldığım tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma,
tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bana daima sonsuz güvenleriyle destek olan ve bu duruma gelmemi sağlayan tüm aileme,

Yıllardır her konuda, yanı başımda varlığını ve desteğini her zaman hissettiğim, özellikle bu zorlu süreçte de sevgisiyle bana daima güç veren, kalbimin diğer yarısı eşim,

Ar. Gör. Yasemin İSPİRLİ DOĞAÇ'a

Ve tabiki varlığıyla hayatımın en büyük mutluluğunu yaşatan, kendimi şanslı hissetmemin en büyük nedeni, biricik kızım, *İlke Derin*'ime,

ne kadar teşekkür etsem de az!!!

ERSİN DOĞAÇ

Doktora tez çalışmamın bir bölümü, *TÜBİTAK* tarafından TBAG 110T190 projesi kapsamında, diğer bölümü ise *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi* tarafından MUBAP- 2010/26 ve 2012/46 projeleri kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	İV
ABSTRACT	VI
ÖNSÖZ.....	İX
BÖLÜM 1.....	1
1.GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler.....	1
1.2. Zeytin Sineği İle İlgili Genel Bilgiler	5
1.2.1. Sistematikteki yeri.....	5
1.2.2. Diğer tephritid türleri ile ilişkisi.....	5
1.2.3. Tanımı.....	6
1.2.4. Biyolojisi.....	7
1.2.5. Zararı ve ürün üzerine etkileri.....	9
1.2.6. Yaygın olarak kullanılan kontrol stratejileri	11
1.2.6.1. Kültürel önlemler.....	11
1.2.6.2. Biyolojik mücadele	11
1.2.6.3. Biyoteknolojik mücadele (tuzaklar-renkler-feromonlarla etkileşim)	12
1.2.6.4. Kimyasal mücadele.....	14
1.3. Moleküler Filogeni.....	16
1.3.1. Protein belirteçleri	17
1.3.2. DNA belirteçleri.....	18
1.3.2.1. Kesilen parçaların uzunluk polimorfizmi (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP</i>).....	18
1.3.2.2. Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA (<i>Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD</i>).....	19
1.3.2.3. Çoğaltılan parçaların uzunluk polimorfizmi (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP</i>)	19
1.2.3.4. Basit dizi tekrarları (<i>Simple Sequence Repeats SSR</i>)	20
1.3.3. Belirteç olarak kullanılan DNA bölgeleri.....	20
1.3.3.1. İntronlar	21
1.3.3.2. Nükleer ribozomal DNA (<i>rDNA</i>)	21

1.3.3.3. Nükleer protein kodlayan genler	21
1.3.3.4. Mitokondriyal DNA (mtDNA)	22
1.3.3.5. Satelit DNA	24
1.4. Literatür Özeti.....	26
1.5. Amaç	29
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	30
2.1. Zeytin Sineği Örneklerinin Toplanması	30
2.2. Toplanan Örneklerden Genomik DNA İzolasyonu	35
2.3. Populasyonlardaki Genetik Çeşitliliğin Mikrosatellit Belirteçleri Yardımı ile Belirlenmesi.....	36
2.3.1. PCR şartları.....	37
2.4. Mitokondriyal DNA Haplotiplerin Belirlenmesi	40
2.5. Verilerin Analizi	42
2.5.1. Mikrosatellit verilerinin analizi.....	42
2.5.2. Mitokondriyal DNA haplotiplerinin belirlenmesi.....	43
3. BULGULAR VE İRDELEME	46
3.1. Mikrosatellit Çeşitliliği.....	46
3.2. mtDNA Analizi.....	56
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
4.1. Mikrosatellit Bulgularına Göre Türkiye'deki <i>B. oleae</i> Popülasyonlarının Yapısı	67
4.2. MtDNA Bulgularına Göre Türkiye'deki <i>B. oleae</i> Popülasyonlarının Yapısı ve Haplotip Analizi	70
BÖLÜM 2.....	73
5. GİRİŞ	73
5.1. Genel Bilgi.....	77
5.1.1. İnsektisitler.....	77
5.1.1.1. Organoklorinler.....	77
5.1.1.2. Karbamatlar	78
5.1.1.3. Piretroidler.....	78
5.1.1.4. Organofosfatlar	79

5.1.2. Türkiye ve Dünya’da insektisit kullanımı	79
5.1.3. Böceklerde direnç ve direnç tipleri	83
5.1.3.1. Davranışsal Direnç.....	83
5.1.3.2. Fizyolojik ve biyokimyasal direnç	84
5.1.3.2.1. Vücuda alınan insektisit miktarının azaltılması	84
5.1.3.2.2. Vücuda alınan insektisit hızla parçalanması	84
5.1.3.2.2.1. Esterazlar	85
5.1.3.2.2.2. Glutasyon -s-transferaz (GST) enzimi	85
5.1.3.2.2.3. Monooksijenazlar.....	86
5.1.3.2.2.4. Gen amplifikasyonu yolu ile direnç kazanılması	86
5.1.3.2.3. Hedef enzimde meydana gelen değişiklikler	87
5.1.3.2.3.1. γ - aminobütirik asit (GABA) reseptörleri.....	87
5.1.3.2.3.2. Sodyum kanal proteini	88
5.1.3.2.3.3. Asetilkolinesteraz (AKE) enzimi	88
5.2. Literatür Özeti.....	96
5.3. Amaç	98
6. MALZEME VE YÖNTEM.....	99
6.1. Ace Geninin Çoğaltılması ve Kısmi Baz Dizi Analizi	99
6.1.1. Ace geni ekzon 3 bölgesinin çoğaltılması.....	99
6.1.2. Ace geni ekzon 6 bölgesinin çoğaltılması.....	103
6.1.3. Ace geni ekzon 10 bölgesindeki delesyonun belirlenmesi	107
6.2. Verilerin Analizi	109
7. BULGULAR VE İRDELEME	110
7.1. Ekzon 3 Bölgesinin Baz Dizi Analizi Sonucu Elde Edilen Bulgular	111
7.2. Ekzon 6 Bölgesinin Baz Dizi Analizi Sonucu Elde Edilen Bulgular	119
7.3. Ekzon 10 Bölgesinin PCR’ı Sonucu Elde Edilen Bulgular	126
7.4. Ekzon 3-6 ve 10’a İlişkin Allel Kombinasyonları ve Frekansları	128
8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	130
8.1. Genetik Varyasyon.....	131
8.2. Ace Direnç Dağılımı.....	132
8.3. Organofosfat Direncinden Sorumlu Mutasyonların Orijini ve Dağılımı	134

KAYNAKLAR.....	137
EKLER.....	159
ÖZGEÇMİŞ	163

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya’da 2010-2011 yıllarına ilişkin dane zeytin üretim miktarı, alan ve verim değerleri.....	3
Çizelge 1.2. Türkiye’de 2010 yılı dane zeytin üretim miktarı, ve ağaç sayısı.....	3
Çizelge 1.3. Ülkemizde saptanan zeytin sineği parazitoidleri.	12
Çizelge 1.4. Zeytin sineğine karşı kullanılan kimyasallar.	15
Çizelge 2.1. Çalışmamızda kullandığımız zeytin sineği örneklerinin toplandığı il, alt lokasyon ve koordinatlar.....	31
Çizelge 2.2. Çalışmamızda kullandığımız mikrosatellit lokusları.	36
Çizelge 2.3. PCR bileşenlerinin konsantrasyon ve miktarları.	38
Çizelge 2.4. mtDNA ND1 bölgesinin çoğaltılması sırasında kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyon ve miktarları.	41
Çizelge 3.1. Türkiye’deki zeytin sineği örneklerinin lokus bazında mikrosatellit çeşitliliği.	47
Çizelge 3.2. Türkiye’nin farklı bölgelerinden toplanan zeytin sineği örneklerindeki genetik varyasyon.....	49
Çizelge 3.3. Zeytin sineği popülasyonları arasındaki F_{ST} değerleri ve bu değerlere göre popülasyon farklılaşmalarının önem dereceleri	51
Çizelge 3.4. Moleküler varyans analizi	54
Çizelge 3.5. Zeytin sineği popülasyonlarındaki haplotip çeşitliliği.	57
Çizelge 3.6. Daha önceki çalışmalarla ortak bulunan haplotiplerin listesi.	59
Çizelge 3.7. Türkiye’deki zeytin sineği popülasyonlarındaki mitokondriyal haplotiplerin illere göre dağılımı.....	61
Çizelge 5.1. Türkiye’de 1979-2007 yılları arasında pestisit tüketimi.	80
Çizelge 5.2. Dünyada pestisit tüketiminin değişimi	81
Çizelge 5.3. Türkiye’de pestisit kullanım miktarları.....	82
Çizelge 6.1. Ekzon 3 bölgesinin çoğaltılması sırasında kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyon ve miktarları.	99
Çizelge 6.2. Ekzon 6 bölgesinin çoğaltılması sırasında kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyon ve miktarları.	103
Çizelge 6.3. %10’ luk doğal-poliakrilamid jel bileşenlerinin konsantrasyon ve miktarları.....	109
Çizelge 7.1. Ekzon 3 ve 6 için 12 popülasyonda gözlenen aminoasit kombinasyonları ve sayıları.	111

Çizelge 7.2. Ekzon 3'e ilişkin 12 popülasyonda gözlenen homozigot ve heterozigot birey sayıları.....	113
Çizelge 7.3. Ekzon 6 bölgesine ilişkin zeytin sineği popülasyonlarındaki haplotip çeşitliliği.	114
Çizelge 7.4. Ekzon 3 için daha önceki çalışmalarla ortak bulunan haplotiplerin listesi.....	115
Çizelge 7.5. Türkiye'deki zeytin sineği popülasyonlarındaki ekzon 3 haplotiplerinin illere göre dağılımı	117
Çizelge 7.6. Ekzon 6'ya ilişkin 12 popülasyonda gözlenen homozigot ve heterozigot birey sayıları.....	120
Çizelge 7.7. Ekzon 6 bölgesine ilişkin zeytin sineği popülasyonlarındaki haplotip çeşitliliği.	122
Çizelge 7.8. Ekzon 6 için daha önceki çalışmalarla ortak bulunan haplotiplerin listesi.....	123
Çizelge 7.9. Türkiye'deki zeytin sineği popülasyonlarındaki ekzon 6 haplotiplerinin illere göre dağılımı	125
Çizelge 7.10. 12 popülasyona ilişkin duyarlı (SS), heterozigot dirençli (RS) ve homozigot dirençli (RR) bireyler.	128

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye’de zeytin yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlar.....	4
Şekil 1.2. Türkiye’de bölgelere göre zeytin üretim oranı.....	4
Şekil 1.3. Zeytin sineği ergin bireylerin görünümü.....	6
Şekil 1.4. Zeytin sineğinin yumurta, larva ve pupa dönemleri.....	7
Şekil 1.5. Vuruklu zeytin tanelerinin yakından görünümü.....	7
Şekil 1.6. Zeytin sineğinin genel yaşam döngüsü.....	8
Şekil 1.7. Zeytin sineğinin parazitoiti <i>O. concolor</i> ’un görünümü.....	12
Şekil 1.8. Zeytin sineği yakalamada kullanılan tuzaklar.....	14
Şekil 1.9. Zeytin sineği mitokondriyal DNA’sının şematik gösterimi.....	23
Şekil 1.10. Polimeraz enziminin kayması sonucu mikrosatellitlerde oluşan mutasyon.....	25
Şekil 1.11. Eşit olmayan crossing over.....	25
Şekil 2.1. Örneklerin toplandığı illerin haritadaki dağılımı.....	33
Şekil 2.2. Zeytin ağaçlarından vuruklu meyvelerin toplanması.....	33
Şekil 2.3. Laboratuara getirilen vuruklu meyvelerin yerleştirildiği kafesler.....	34
Şekil 2.4. Kafeslerden çıkan ergin bireyler.....	34
Şekil 2.5. Eceabat ve Samandağ bölgelerinden toplanan örneklerden izole edilen genomik DNA’lar.....	36
Şekil 2.6. Çalışmada kullanılan PCR cihazları.....	38
Şekil 2.7. Çalışmada kullanılan elektroforez jel sisteminin görünümü.....	39
Şekil 2.8. Bo-D37, Bo-D42, Bo-D51 ve Bo-D52 numaraları primer çiftleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerine ait bant görüntüleri.....	39
Şekil 2.9. BoED1F ve BoED1R primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerine ait yaklaşık 900bp’lik DNA bant görüntüleri.....	41
Şekil 2.10. Elde edilen mikrosatellit bantlarının Applied Biosystems Peak Scanner programındaki görünümü.....	43
Şekil 2.11. Örneklerden elde edilen baz dizileri FinchTV programında açılarak görsel olarak kontrol edilmiştir.....	44
Şekil 2.12. Örneklerden elde edilen baz dizileri.....	45
Şekil 3.1. Çalışılan 12 ile ait Neighbor Joining (NJ) dendrogramı.....	52

Şekil 3.2. Faktorial Korrespondans analizinde 12 ile ait gruplanmanın 3 boyutta gösterimi.	52
Şekil 3.3. Genetik uzaklık değerleri ve populasyonların coğrafik uzaklıkları arasındaki korelasyonu gösteren grafik.	53
Şekil 3.4. Analize tabi tutulan 12 ilden elde edilen mikrosatellit verilerine dayalı olarak elde edilen STRUCTURE analiz grafiği.	55
Şekil 3.5. Doğu ve Batı popülasyonlarına ilişkin Bottleneck grafikleri.	56
Şekil 3.6. mtDNA analizi sonucu elde edilen network grafiği.	66
Şekil 5.1. Dünyada insektisitlere dirençli böcek sayısının yıllara göre artışı.	75
Şekil 5.2. Pestisit gruplarına göre dünyada tarım ilacı kullanımı.	81
Şekil 5.3. Pestisit gruplarına göre Türkiye’de tarım ilacı kullanımı.	82
Şekil 5.4. Rdl GABA reseptörünün şematik gösterimi.	87
Şekil 5.5. Asetilkolin esterazın sinir hücrelerindeki fonksiyonu.	89
Şekil 5.6. AKE enziminin 3 boyutlu yapısı.	89
Şekil 5.7. Zeytin sineği <i>Ace</i> exon 6 (A) ve exon 3 (B)’deki mutasyon bölgeleri.	92
Şekil 5.8. Zeytin sineği <i>Ace</i> exon 10 mutasyon bölgesi.	92
Şekil 5.9. AKE enzimidaki katalitik aminoasitler.	94
Şekil 6.1. BoAce_518F ve BoAce_1040R primerleri kullanılarak elde edilen ekzon 3 bölgesi PCR ürünlerine ait yaklaşık 570bç’lik DNA bant görünümüleri ..	100
Şekil 6.2. Ekzon3 bölgesine ait baz dizisi FinchTV programında açılarak görsel olarak kontrol edilmiştir.	101
Şekil 6.3. Exon 3 bölgesine ait dizilerin MEGA programında hizalanması ve mutasyon bölgesinin incelenmesi.	102
Şekil 6.4. Exon 3 bölgesine ait dizilerin MEGA programı kullanılarak aminoasit dizine çevrilmesi ve mutasyon bölgesinin incelenmesi.	102
Şekil 6.5. BoAce_1424F ve BoAce_1519R primerleri kullanılarak elde edilen ekzon 6 bölgesi PCR ürünlerine ait yaklaşık 130bç’lik DNA bant görünümüleri ..	104
Şekil 6.6. Ekzon 6 bölgesine ait baz dizisi FinchTV programında açılarak incelenmesi.	105
Şekil 6.7. Exon 6 bölgesine ait dizilerin MEGA programında hizalanması ve mutasyon bölgesinin incelenmesi.	106
Şekil 6.8. Exon 6 bölgesine ait dizilerin MEGA programı kullanılarak aminoasit dizine çevrilmesi ve mutasyon bölgesinin incelenmesi.	106
Şekil 6.9. Ekzon 10 bölgesinin yürütülmesi sırasında kullanılan dikey elektroforez sistemi.	108
Şekil 6.10. Exon 10 bölgesine ait PCR ürünleri.	108

Şekil 7.1. Ekzon 3 bölgesi için Akdeniz (A), Ege (B) ve Akdeniz+Ege (C) popülasyonlarına ilişkin heterozigot ve homozigot bireylerin dağılımı. .112	
Şekil 7.2. AKE enzimi ekzon 3 baz dizi analizi sonucu elde edilen network grafiği..	118
Şekil 7.3. Ekzon 6 bölgesi için Akdeniz (A), Ege (B) ve Akdeniz+Ege (C) popülasyonlarına ilişkin heterozigot ve homozigot bireylerin dağılımı. .120	
Şekil 7.4. AKE enzimi ekzon 6 baz dizi analizi sonucu elde edilen network grafiği..	126
Şekil 7.5. Ekzon 10 bölgesi için Akdeniz (A), Ege (B) ve Akdeniz+Ege (C) popülasyonlarına ilişkin heterozigot ve homozigot bireylerin dağılımı. .127	
Şekil 7.6. Ekzon 3-6 ve 10 bölgesi için gözlenen allel kombinasyonları ve frekansları	129

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

γ	Gama
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
Δ	Delta
\$	Amerikan Doları
%	Yüzde
mM	Milimolar
M	Molar
pmol	Pikomol
g	Gram
mg	Miligram
ng	Nanogram
mm	Milimetre
cm	Santimetre
l	Litre
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
MgCl_2	Magnezyum Klorür
Na	Sodyum
K	Potasyum
Ca	Kalsiyum
ACE	Asetilkolinesteraz Geni
ACH	Asetilkolin
ADH	Alkol Dehidrogenaz
AFLP	Çoğaltılan parçaların uzunluk polimorfizmi
AKE	Asetilkolinesteraz Enzimi
ALA	Alanin
AMOVA	Moleküler Varyans Analizi

AMY	Amilaz
APH	Alkalin Fosfataz
APS	Amonyum Persülfat
Bç (bp)	Baz Çifti
COI	Sitokrom Oksidaz I
COX	Sitokrom Oksidaz
CYTB	Sitokrom b
DDT	Diklor Difenil Trikloretan
dH ₂ O	Distile Su
ddH ₂ O	Bidistile Su
DNA	Deoksiribonükleikasit
EC	Emülsiyon Konsantre
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EF	Uzama Faktörü
EST	Esteraz
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
FCA	Faktöriyel Korrespondans Analizi
GABA	Gama Amino Bütirik Asit
GLU	Glutamin
GLY	Glisin
GST	Glutasyon-S-Transferaz
GPI	Glikozilfosfotidilinositol
HCL	Hidroklorikasit
HWE	Hardy-Weinberg Eşitliği
ILE	İzolösin
ITS	İnternal Ara Bölgeler (Internal Transcribed Spacer)
Kb	Kilo Baz
LC	Öldürücü Konsantrasyon
LD	Öldürücü Doz
LEU	Lösin
MET	Methiyonin
M.Ö	Milattan Önce
M.S	Milattan Sonra

mtDNA	Mitokondriyal DNA
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
ND1	NADH Dehidrogenaz 1
NJ	Neighbor Joining
ODH	Oktanöl Dehidrogenaz
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHE	Fenilalanin
QTL	Kantitatif Karakter Lokusları (Quantitative Trait Loci)
RAPD	Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA
RFLP	Kesilen parçaların uzuluk polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
rDNA	Ribozomal DNA
rRNA	Ribozomal RNA
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SER	Serin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SSR	Basit Dizi Tekrarları
SP	Suda Çözünebilir Toz
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetrametiletildiamin
THR	Treonin
TO	Tetrazolim Oksidaz
TRP	Triptofan
VAL	Valin
WP	Suda Çözünebilir Paket
XDH	Ksantin Dehidrogenaz

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Diptera takımının bir üyesi olan meyve sinekleri (Tephritidae), birçok ticari bahçe bitkisine üretim aşamasında larval gelişimle zarar veren ve ekonomik kayıplara neden olan en önemli tarımsal zararlılardan bir kısmını içermektedir. Üreticilerin ekonomik kayıpları sadece ürün kaybından değil, dolaylı olarak bu zararlıların bulunmadığı ülkelere ihracat yapılırken, vuruklu ya da pestisit kalıntılı meyvelerin alınmaması gibi uygulanan karantina yöntemlerinden de kaynaklanmaktadır.

Bu familyaya ait türlerin büyük bir kısmı, beslenmelerini bitkilerin meyvelerinde yaparak, bitkilerde önemli zararlara neden olurlar. Bu sebeple bu türler meyve sineği olarak adlandırılmışlardır (Foote, 1984). Meyve sinekleri familyası dünyada çok geniş bir dağılım gösterip, zirai açıdan oldukça önemli zarar oluşturabilen türleri içermektedir. Dünyada 481 cinse ait 4352 tür ve paleoarktik bölgeden de 137 cinse ait 882 türün varlığı bilinmektedir (Korneyev,1999; Norrbom, 1999).

White ve Wang (1992)'in yaptıkları çalışmada ise Tephritidae familyasına ait 220 türün ekonomik açıdan zarara neden olduğu belirlenmiş ve bunlardan yaklaşık 40 tanesinin *Bactrocera*, 17'sinin *Rhagoletis* ve 15'inin de *Anastrepha* cinsine ait olduklarını bildirmişlerdir. Ülkemizde meyve sineklerinin 114 türü bulunmasına karşın bunlardan sadece tarımı yapılan meyvelerde zararlı olanları bilinmektedir (Yaran, 2009). Yurdumuzda tarımsal açıdan ekonomik kayıplara yol açması nedeniyle önem arz eden türlere; Akdeniz meyve sineği (*Ceratitis capitata*), kiraz sineği (*Rhagoletis cerasi*), kavun sineği (*Myiopardalis pardalin*) ve zeytin sineği (*Bactrocera oleae*) örnek olarak verilebilir.

Bu çalışmanın konusu olan zeytin sineği [*Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae)] yurdumuzda birçok alanda yetiştiriciliği yapılan zeytin bitkisinde ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Zeytin ağaçları birçok zararlıya konukçuluk yapmaktadır ve bu zararlılar doğrudan ya da dolaylı olarak ağacın kendisinde veya üründe büyük zarara yol açabilmektedir. Bunlar arasında; zeytin sineği, zeytin güvesi, zeytin kabuklu biti, zeytin karakoşnili ve zeytin halkalı leke hastalığı sayılabilir (Pala vd. 2001). Zeytin sineği bunlar içerisinde ana zararlı konumundadır ve çok eski zamanlardan bu yana zeytinlerin yetiştiği alanlarda büyük ekonomik kayıplara neden olan bir türdür (Daane ve Johnson, 2010; Tzanakakis, 2006; Nardi vd. 2005; Nardi vd. 2006). Larvaları *O. europaea*, *O. verrucosa* ve *O. chrysophylla*'yı içeren *Olea* genusundaki meyveler üzerinde monofag olarak yaşamaktadır (Daane ve Johnson, 2010). Zeytin sineğinin dağılımı, kültürü yapılan ya da yabani ağaçların bulunduğu alanlarla sınırlıdır. Günümüzde zeytin sineğinin; Akdeniz, Güney ve Orta Afrika, Kanarya Adaları, Orta Doğu, Kaliforniya ve Meksika'da yayılış gösterebildiği rapor edilmiştir. (Daane ve Johnson, 2010, Nardi ve ark 2003; Zygouridis vd. 2009; Augustinos vd. 2002).

Zeytin sineğinin yeryüzündeki yayılımının konakçısı olduğu zeytin bitkisiyle birlikte olduğu düşünülmektedir (Nardi vd. 2010; Augustinos vd. 2005). Kültüre alınmış zeytinin dünyaya yayılışı ile ilgili 2 ayrı hipotez bulunmaktadır. Bunlardan ilki; yabani zeytinin Orta Doğu bölgesinde M.Ö. 5500-5700 yılları arasında kültüre alındığı ve buradan çeşitli yollarla Akdeniz havzasına ve dünyaya yayıldığı şeklindedir (doğu-batı doğrultusunda). İkincisi hipotez ise, zeytinin Mısır ve Etiyopya'da kültüre alındığı ve Fenikeli'ler tarafından Kıbrıs'a getirilip, buradan Akdeniz havzasına ve dünyaya yayıldığı şeklindedir (güney-kuzey doğrultusunda) (Angiolillo vd. 1999; Aksu, 2000; Augustinos vd. 2005; Nardi vd. 2005).

Dünyada 38 ülkede ekonomik olarak zeytin üretimi yapılmaktadır. Bu ülkelerin 30 tanesi kuzey yarım kürede, 8 tanesi ise güney yarım kürede yer almaktadır (Öztürk, 2006). Kuzey yarımkürede bulunan üretim alanlarının Akdeniz Bölgesi'nde yoğunlaştığı dikkat çekmektedir. Nitekim dünya üretiminin % 90'dan fazlası Akdeniz havzasında gerçekleşmektedir (Augustinos vd. 2005).

Akdeniz ülkelerinde miyonlarca insanın geçim kaynağını oluşturan zeytin üretimi, 2010 yılı istatistiklerine göre yaklaşık 18.7 milyon ton'dur. Bu ülkeler sırasıyla, İspanya (% 35.7), İtalya (% 16.9), Yunanistan (% 9.67), Fas (% 7.9) ve Türkiye (%

7.56)'dır (Çizelge 1.1.) (Anonim, 2013a). Dünya zeytin üretimi yaklaşık 9 milyon hektar alanda gerçekleşmektedir.

Çizelge 1.1. Dünya'da 2010-2011 yıllarına ilişkin dane zeytin üretim miktarı, alan ve verim değerleri (Anonim, 2013a)

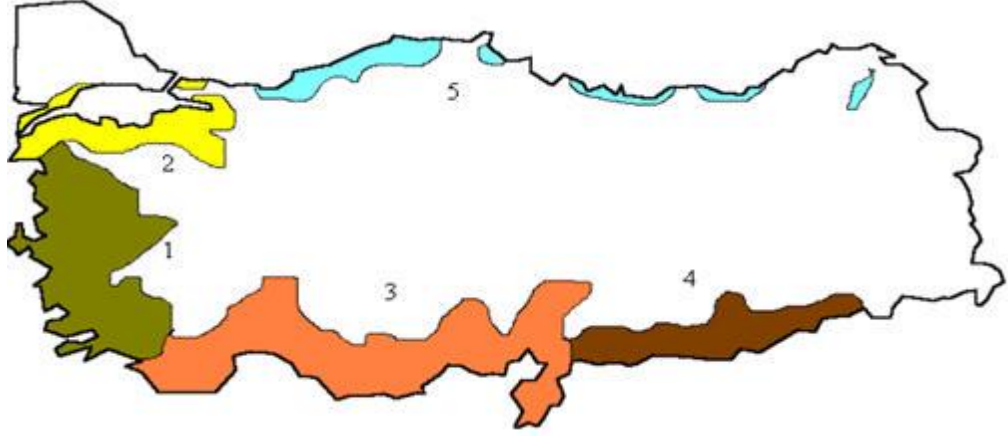
Ülke	Üretim (ton)	%
İspanya	6.682.010	35,72
İtalya	3.170.700	16,95
Yunanistan	1.809.800	9,67
Fas	1.483.510	7,93
Türkiye	1.415.000	7,56
Suriye	960.403	5,13
Tunus	750.000	0,4
Diğer	2.432.963	16,64

Türkiye'de 2010 yılı verilerine göre, yaklaşık 784 bin hektar alanda 157 milyon zeytin ağaç varlığına sahiptir. Toplam zeytin dane zeytin üretimi 2010 yılı istatistiklerine göre 1.415.000 ton olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 1.2., Anonim, 2013b).

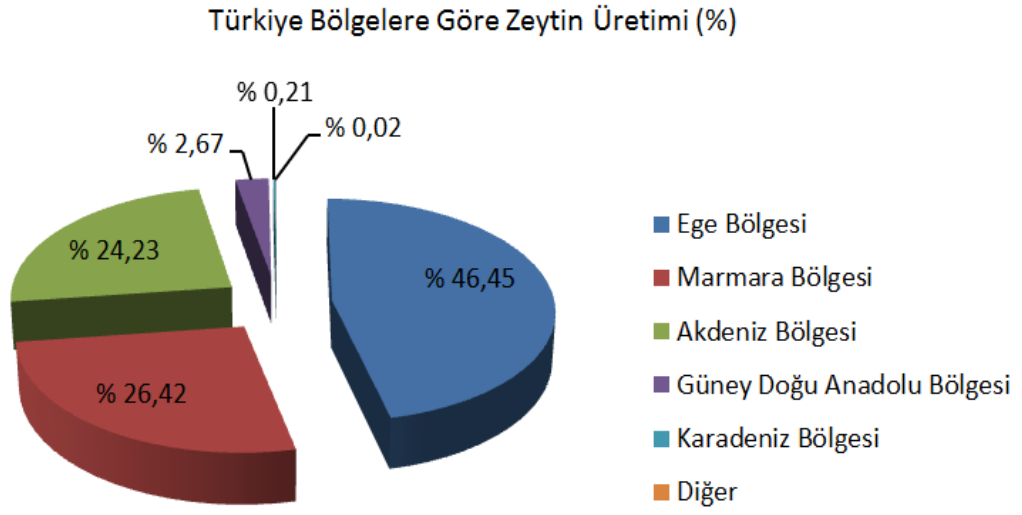
Çizelge 1.2. Türkiye'de 2010 yılı dane zeytin üretim miktarı, ve ağaç sayısı (Anonim, 2013b)

	Ağaç sayısı (Milyon)			Üretim (Ton)		
	Toplam	Meyve veren	Meyve vermeyen	Toplam	Sofralık	Yağlık
2010	157.156	111.398	45.758	1.415.000	375.000	1.040.000

2010 yılında zeytin üretiminin % 46.45'i Ege Bölgesi'nde, % 24.23'ü Akdeniz Bölgesinde, % 26.42'si Marmara Bölgesinde %2.67'si Güney Doğu Anadolu Bölgesinde, % 0.21'i Karadeniz Bölgesi'nde ve % 0.02'si diğer bölgelerde yapılmıştır (Şekil 1.1. ve Şekil 1.2.) (Anonim, 2013b).



Şekil 1.1. Türkiye’de zeytin yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlar. Numaralar ülkemizdeki bölgeleri göstermektedir.



Şekil 1.2. Türkiye’de bölgelere göre zeytin üretim oranı (2010).

1.2. Zeytin Sineği İle İlgili Genel Bilgiler

1.2.1. Sistematikteki yeri

Ülkemizde zeytin ağaçlarında yüksek oranda verim kayıplarına neden olan ana zararlı zeytin sineğidir. Sistematik düzende bakıldığında zeytin sineği;

Alem: Animalia

Şube: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: Diptera

Aile: Tephritidae

Alt aile: Dacinae

Tribus: Dacini

Cins: *Bactrocera*

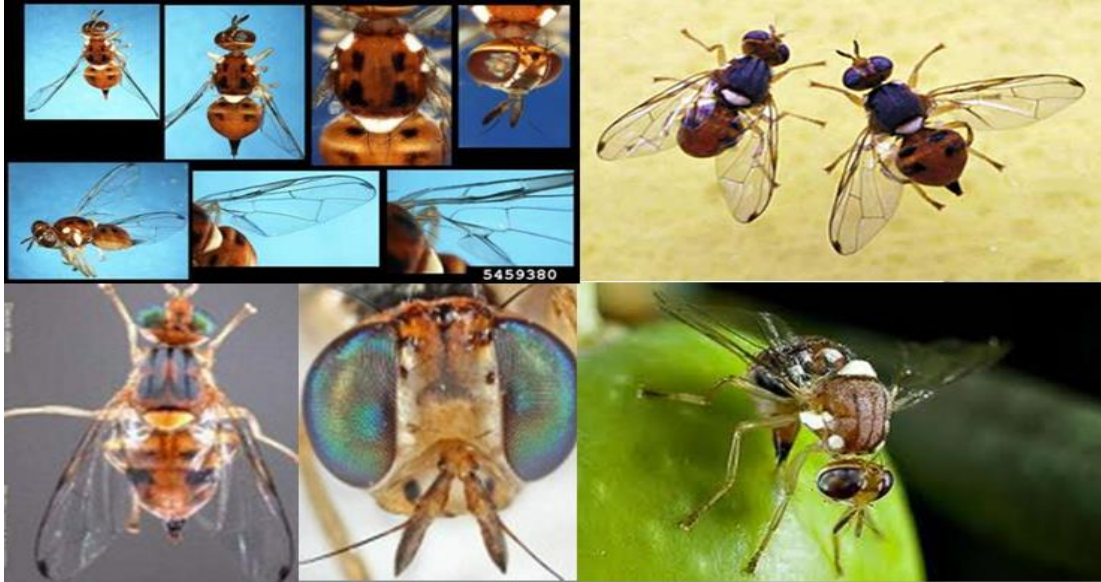
Tür: *B. oleae*

1.2.2. Diğer tephritid türleri ile ilişkisi

Tephritidae familyasının bilinen yaklaşık 4.500 türü bulunmaktadır ve bunlardan bazıları dünyanın en önemli tarımsal zararlılarıdır. Tephritid alt familyaları ve sınıfları arasındaki ilişkiler halen geliştirilmekte ve iyileştirilmektedir. Son zamanlarda meyve sineği morfolojisi ve çeşitli genetik yaklaşımlara dayalı filogenilerin geliştirilmesi gibi mevcut sistematik literatüre ilişkin derlemeler yüksek seviyede Tephritid sınıflandırmasına yardımcı olmaktadır (Korneyev, 1999; Han ve Ro, 2009). Zeytin sineği Afrotropikal, Australasian ve Oriental (Doğu) türleri içeren Dacinae alt ailesi ve Dacini tribusunun bir üyesidir. Dacinae alt ailesi içerisinde *Bactrocera*, *Dacus* ve *Ceratitidis* genuslarındaki türleri içeren meyve sebzelere zarar veren çeşitli meyve sineği zararlıları bulunmaktadır. *Bactrocera* genusu içerisinde daha iyi bilinen bazı meyve sineği zararlı türleri geniş oriental *Bactrocera dorsalis* kompleksine bağlıdır (Clarke vd. 2005).

1.2.3. Tanımı

Ergin zeytin sineğinin vücudu 4-6 mm, kanat açıklığı ise yaklaşık 10-14 mm uzunluğundadır. Baş ve antenler sarımsı kırmızı, hortum ve ağız parçaları kahverengi, petek gözler mavimsi yeşil pırıltılıdır. Toraks, sırt kısmında eklem bölgeleri hariç siyah, alt kısmında ise kırmızımsı sarı renklidir. Bu bölgedeki kıllar ise sarı renklidir. Bacaklar kırmızımsı sarı renkte olup, kanatlar saydamdır. Kanat damarları belirgin olup uca doğru siyahımsı bir leke bulunmaktadır. Abdomen kırmızımsı sarı renkte ve her segmentte değişik büyüklükte siyah lekeler bulunur. Dişilerde karın geniş yapılı olup, sonunda yumurta koyma iğnesi bulunur ve uzunluğu 1 mm'dir. (Şekil 1.3.) (Rice, 2000; Pala vd. 2001).



Şekil 1.3. Zeytin sineği ergin bireylerin görünümü (Anonim, 2013c).

Yumurta 0,7 mm uzunluğunda, 0,2 mm eninde olup mat beyaz renklidir ve mekik şeklindedir. Yumurta uzun ve arkaya doğru biraz genişçe, üst kısım konveks, alt kısım düzdür (Rice, 2000; Pala vd. 2001). Yumurtadan çıkan larva 3 dönem geçirerek olgunlaşır. Olgun larva 6,0-8,5 mm uzunlukta ve 1,3-1,9 mm eninde olup, 12 segmentli ve bacaksızdır. Fıçı şeklindeki pupa 3,5-4,5 mm uzunlukta ve 1,4-2,0 mm eninde olup, rengi ilk dönemlerde krem, son dönemlere doğru kahverengi renk alır (Şekil 1.4.) (Rice, 2000; Pala vd. 2001).



Şekil 1.4. Zeytin sineğinin yumurta, larva ve pupa dönemleri (Anonim, 2013c).

1.2.4. Biyolojisi

Zeytin sineğini içeren Dacini meyve sineklerinin biyolojisi Fletcher tarafından derlenmiştir (Fletcher, 1987). Zeytin sineği yalnızca bazı zeytin türlerinin meyvesi üzerinde beslendiğinden dolayı monofag olarak sayılabilir. Aslında sineklerin yaşam süreleri zeytinin koşulları ve erişilebilirliğine yakından bağlıdır (Tzanakakis, 2003). Ülke ekonomisinde önemli bir yeri olan zeytin bitkisinde zarara yol açabilen zeytin sineği kışı çoğunlukla toprağın 2-5 cm derinliğinde pupa halinde, eğer çevre sıcaklığı elverişli ise zeytinlik veya fundalıklarda ergin halde geçirir. Yumurtlama olgunluğuna ulaşan dişiler yumurtalarını olgun, iri, parlak ve yağlanmaya başlamış zeytin meyve yüzeyinin hemen altına koyarlar, böylece yeni doğan larva doğrudan besine ulaşabilir (Tzanakakis, 2003). V şeklindeki bu yarıklar, birkaç gün sonra koyu kahverengiye dönüşür ve buna “vuruk” denir (Şekil 1.5.).



Şekil 1.5. Vuruklu zeytin tanelerinin yakından görünümü (Anonim, 2013d).

Zeytin sineğinin de içinde bulunduğu meyve sinekleri holometabol yani tam başkalaşım geçirirler. Hayat döngüleri yumurta, larva, pupa ve ergin evrelerini içermektedir (Şekil 1.6.) (Carey ve Liedo, 1999).



Şekil 1.6. Zeytin sineğinin genel yaşam döngüsü.

Larva zeytinin mezokarpında meyve kurdu olarak büyür ve beslenir. Zeytin sineği larvaları zeytinin bulunmasına bağlı iken erginler böcek özsuğu, nektar, polen ve meyve salgılarını içeren çeşitli organik kaynaklardan beslenir. Zeytinin yumurta bırakma için uygun olmadığı periyotlar sırasında üreme ve yaşamak için erginlerin besinlere erişimi zeytin sineği popülasyonlarının var oluşunda kritik bir durum olabilmektedir. Bu nedenle ergin sinekler; besin kaynaklarının bulunduğu pek çok farklı bitki üzerinde bulunabilirler (Tsiropoulos, 1977).

Zeytin sineği larval gelişimi büyük ölçüde sıcaklığa bağlıdır. Tsitsipis (1980) ve Fletcher (1987) sabit sıcaklıklar ve laboratuvar koşulları altında zeytin sineği larval gelişimini çalışmış ve zeytin sineği larvasının alt sıcaklık sınırının 10-12 °C, üst sıcaklık sınırının da 30-32 °C olduğunu belirlemişlerdir. Yumurtalar için alt gelişim sınırının 7.5-10 °C, üst sınırının da 30-32 °C olduğu rapor edilmiştir. Larval ve pupal gelişim için sırasıyla yaklaşık 8-37 ve 9-49 gün gerekmektedir. Ancak optimum sıcaklıkta yumurta, larva ve pupa gelişimi sırasıyla 1, 8 ve 9 gün gibi kısa bir sürede gerçekleşebilmektedir (Tsitsipis, 1980; Fletcher, 1989a).

Arazide zeytin sineği gelişimi ve yıllık jenerasyon sayısı yalnızca ortam sıcaklığına bağlı değil aynı zamanda zeytinin erişilebilirliği, kalitesi, zeytin içindeki mikroklima ve neme de bağlıdır. Örneğin daha yüksek yüzey sıcaklığına sahip siyah zeytinde gelişim yeşil zeytine göre daha hızlı olabilmektedir (Neuenschwander ve Michelakis, 1979). Bu çeşitli klimatik koşullar sinekler için rapor edilen sezonluk jenerasyon sayısında farklılık ile sonuçlanır. Orta Doğu'da 3 ila 5 jenerasyon, Avrupa'nın farklı kısımlarında 2 ila 5 jenerasyon rapor edilmiştir (Neuenschwander ve Michelakis, 1979). Pek çok alanda larval büyüme için optimum koşullar varken zeytin sineği sonbahar periyodu gelişimine en iyi şekilde adapte olmuş gibi görünmektedir. Tzanakakis (2003), zeytin sineğini Güney Avrupa ve Orta Doğu'da günlerin uzun olduğu bahar sonu ve yaz başlarında yumurtlamamalarından dolayı "kısa gün" türleri olarak adlandırmıştır. Zeytin sineği ilkbahar yaz dormansisini yaz sonunda sona erdirir böylelikle yeni hasat meyvelerine erişebildiği periyotla keşiştirmiş olur. Yaz aylarındaki yüksek sıcaklık ve düşük nem dişi olgunlaşmasını engelleyen muhtemel faktörler arasındadır (Mourikis ve Fytizas, 1970) lkemizde zeytin sineği popülasyonları Ege bölgesinde 4-6, Marmara bölgesinde 3-4, Güney Anadolu'da 2-5, Karadeniz bölgesinde 3-4 dl verirler. Genellikle her meyvede bir olmak üzere, bir dişi 50-400 tane yumurta bırakır (Yaşar, 1996).

1.2.5. Zararı ve ürün üzerine etkileri

Zeytin sineği pek çok şekilde zeytin üretiminin azalmasına neden olabilmektedir. Gümüşay (1998), zeytin sineğinin zararlarını meyvelerin ryerek dökülmesi, zeytinyağı miktarını azaltması ve yağın kalitesinde (renk, koku, tat ve dayanma süresi gibi organoleptik özelliklerinde) bozulmaya neden olma şeklinde üç başlıkta gruplandırmıştır. Gelişme süresi 15-16 gün olan larvalar meyve içerisinde çekirdek etrafında galeriler açmak suretiyle meyve eti ile beslenir ve pupa haline gelir, daha sonra çıkış deliği açarak meyveyi terk ederler. Ekonomik zarar; zeytinin zeytin sineği tarafından yumurta bırakılmak için ısırılması, larvanın beslenmesi ile meyvenin düşmesi ve buna bağlı olarak yağ üretiminde azalma ve meyveleri rtebilen larvanın meyveyi doğrudan harap etmesinden dolayı oluşur (Neuenschwander ve Michelakis, 1978). Olgunlaşmamış meyve ısırıldığında, hasattan önce düşmesine ve böylelikle de ürün kaybına sebep olabilir. Meyvenin etli kısmının larval tüketimi

ortalama 50 ila 150 mg/larva civarındadır (Neuenschwander ve Michelakis, 1978). Zeytin sineği ayrıca meyvenin kullanım amacını da etkiler. Sofralık zeytindeki hasar meyvede larva temelli meyve kontaminasyon problemi oluşturur bu nedenle tolere edilebilir istila düzeyleri meyve başına sıfır larva civarındadır. Karşılaştırma olarak sofralık zeytine oranla yağlık zeytin göreceli olarak daha yüksek seviyede istilaya uğramaktadır (% 10-30) ve bu ekonomik açıdan halen kabul edilebilir seviyelerdedir (Neuenschwander ve Michelakis, 1978). Ülkemizde zeytin sineği ile mücadele yapılmadığı zaman, normal yıllarda % 15-30 salgın yıllarında ise %70'e kadar ulaşan zarar meydana gelebilmektedir (Pala vd. 2001; Bozbuğa, 2007). Zeytin sineğinin bulunduğu dünyanın pek çok alanında zeytin sineği yağ kalitesinin %80'den fazla ve bazı sofralık kültürvarların %100 kaybından sorumludur. Zeytin sineğinin toplam zeytin üretimini %5 hasara uğrattığı tahmin edilmektedir ve bu durum yılda yaklaşık 800 milyon \$'lık ekonomik kayıp anlamına gelmektedir (Montiel Bueno ve Jones, 2002). Zeytinyağı üzerine *B. oleae*'nin toplam etkisini değiştiren çeşitli faktörler vardır. Bunlar faktörler *B. oleae* istilasının zamanlaması ve şiddeti, zeytin çeşidi, hasat zamanı ve mikroflora varlığıdır. Zeytin sineği larval hasarı ve yağ saklama süresi arasındaki korelasyon yağ asitliğinin sinerjetik olarak artmasına sebep olur. Bu hasardan bakteri (*Xanthomonas*), mayalar (genel olarak *Torulopsis* and *Candida*) ve küfler (genelde *Fusarium* ve *Penicillium*) gibi mikroorganizmalar sorumludur. Mikroflora ve yağ asiditesi arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır (Torres-Villa vd. 2003).

Zeytin sineği çeşitli zeytin kültürvarlarını tercih edebilmektedir. Kaliforniya'daki çalışmalarda dişi *B. oleae*'nin kültür zeytinlerinin bazı varyeteleri için güçlü ovpozisyonel tercih sergilediği ve tercih edilen varyetelerde larvaların daha iyi geliştikleri bulunmuştur. Bunda bazı faktörler rol oynayabilmektedir. Bu faktörler meyve büyüklüğü ve ağırlığı, rengi, epikarp sertliği, yüzey örtüsü (özellikle alifatik mumlar), bitkinin fenolojik evresi ve kimyasal faktörlerdir (Iannotta vd. 2007). Zeytinler 3.5 g'a ulaştığında dişi *B. oleae*'nin yumurta bırakabilmesi için giderek daha cazip hale gelir (Iannotta vd. 2007).

Özetle, zeytin sineği, pek çok şekilde verim ve kaliteye etki etmek suretiyle önemli mali kayıplara neden olmaktadır. Zeytin sineği ile mücadele, kültürel önlemler, biyolojik, biyoteknolojik, ve kimyasal mücadele yöntemlerini kapsamaktadır. Bunlar arasında kimyasal mücadele yöntemi sıklıkla başvurulan bir yöntemdir (Sert, 2005).

1.2.6. Yaygın olarak kullanılan kontrol stratejileri

1.2.6.1. Kültürel önlemler

Kış aylarında pupaların yok edilmesi amacıyla toprağın derince sürülmesi ve zarar periyodu boyunca 3–4 günde, hasarlı zeytinlerin toplanarak zeytinlikten uzaklaştırılması kültürel önlemlere örnek olarak verilebilir. Ayrıca zeytin sineğinin, sonbahardaki yoğun zararını önlenmek için, belirlenen çeşitlerde erken hasat yapılması da zeytin sineği popülasyonunun kontrol altında tutulmasında uygulanabilen bir yöntemdir (Pala vd. 2001).

1.2.6.2. Biyolojik mücadele

Birçok zeytin üretimi alanında; çevresel kirliliğin, zeytinyağında kontaminasyonun ve yararlı böceklerin tahribinin azalması için, yaygın insektisitlerin (organofosfatlar ve piretroidler gibi) kullanımında azalma olması bir amaçtır. Biyolojik mücadele yönteminde, çok verimli olmamakla birlikte zeytin sineğinin parazitoiti zeytin bahçelerine salınmak suretiyle var olan zararlıyı kontrol altına almak amacıyla kullanılmaktadır (Daane ve Johnson 2010).

Zeytin sineğinin saptanan çok sayıda doğal düşmanı bulunmaktadır. Silvestri (1914) yılında yaptığı çalışmada dünyadaki zeytin sineği parazitlerini şu şekilde listelemiştir: *Psytalia dacicida* Silvestri, *Psytalia lounsburyi* (Silvestri), *Utetes africanus* (Szépligeti), *Bracon celer* Szépligeti ve *Tripaspis daci* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae); *Neochrysocharis formosa crythraca* (Silvestri) (*Achrysocharella formosa* olarak rapor edilmiştir) (Hymenoptera: Euophidae); *Eupelmus afer* Silvestri (Hymenoptera: Eupelmidae); *Halticoptera daci* Silvestri (Hymenoptera: Pteromalidae); ve *Coptera silvestrii* (Kieffer) (Hymenoptera:Diapriidae) (Neuenschwander, 1982).

Zeytin sineğinin parazitoiti olan *Opius concolor*, ülkemizde ve Avrupa'da bazı ülkelerde kitle halinde üretilerek, zeytin bahçelerine salınmak suretiyle biyolojik mücadelede kullanılmaktadır (Şekil 1.7.). Bunun yanı sıra ülkemizde zeytin sineği ile mücadelede kullanılabilen zeytin sineği parazitoidleri çizelge 1.3.'de sunulmuştur (Zobar, 2008).

Çizelge 1.3. Ülkemizde saptanan zeytin sineği parazitoidleri (Zobar, 2008).

Parazitoid	Takım:Familya
<i>Aprostocetus epicharmus</i> Walk.	(Hym.:Chalcididae)
<i>Cyrtoptyx dacicida</i> Masi.	(Hym.:Pteromalidae)
<i>Cyrtoptyx latipes</i> Rond.	(Hym.:Pteromalidae)
<i>Eurytoma parvula</i> (Thom.)	(Hym.:Eurytomidae)
<i>E. strigrifrons</i> (Thom.)	(Hym.:Eurytomidae)
<i>E. tibialis</i> Boh.	(Hym.: Eurytomidae)
<i>Eupelmus urozonus</i> Dalm.	(Hym.:Eupelmidae)
<i>Metaphycus silvestrii</i> Sug.	(Hym.:Encyrtidae)
<i>Opius concolor</i> Szelp.	(Hym.:Braconidae)
<i>Phygadeuon mediterraneus</i> (Fer. ve Del.)	(Hym.:Eulophidae)
<i>Zaglyptus multicolor</i> Grav.	(Hym.:Ichneumonidae)



Şekil 1.7. Zeytin sineğinin parazitoiti *O. concolor*'un görünümü (Zobar, 2008).

1.2.6.3. Biyoteknolojik mücadele (tuzaklar-renkler-feromonlarla etkileşim)

Biyoteknolojik mücadelede yapışkan tuzaklar, feromonlar, ışık tuzakları, renk tuzakları ve kapanlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.8.). Renk tuzakları genelde levha veya silindir şeklindedir ve üzerine yapışkan bir madde sürülür.

Böylece renge yönelen böcek tuzağa çarpar ve buraya yapışır (Öncüer, 2004). Tephritid meyve sineklerinin etkileştiği bileşenler çok geniştir. Bir asrı aşkın bir süredir bu etkileşen bileşenler, zeytin sineği yakalama, kimyasal sterilizasyon ya da çeşitli öldürme işlemleri için tuzak (insektisit, yapışkan tuzak ve sıvı tuzak gibi) olarak kullanılmıştır (Katsoyannos ve Kouloussis 2001). Kullanılan ilk tuzaklardan biri, melasın insektisit-arsenat kombinasyonudur. Sonraki tuzaklar, protein hidrolizatları (solbait gibi), Torula, NuLure ve amonyak salan tuzları (amonyum bikarbonat, amonyum sülfat ve biamonyum fosfat gibi) içermektedir (Katsoyannos ve Kouloussis 2001). Tuzak kullanımı, bölgeye ve kullanılan tuzağın tipine göre çeşitlilik gösterir.

Zeytin sineği için sarı renk çok çekicidir. Yapışkan ve McPhail tuzaklarının birkaç tipinin içine katılan sarı renk, görüntüleme ve kütle tuzaklama (mass trapping) için kullanılır. Bazı bölgelerde sarı tuzaklar, yararlı böceklerin birçoğunu da yakaladığı için bu yöntemden vazgeçilmiştir. Kırmızı renkli yapışkan kürelerin kullanıldığı çalışmalar, % 2'lik amonyum sülfatlı McPhail tuzaklara oranla çok daha etkili olduğunu göstermiştir (Katsoyannos ve Kouloussis 2001). Erkek ve dişi *B. oleae* tarafından salgılanan seks feromonlarının yapay olarak sentezi ve amonyum bikarbonat gibi tuzlarla birleştirilmesiyle, yakalama verimi çok gelişmiştir. Dört bileşenli bir karışım olan feromon, geniş aralıklı erkek cezbedici, agregasyon feromonu ve afrodizyak rolü oynar. En temel bileşeni, oleandır. Bu feromonda oleanın rasemik bir karışımı bulunur. R (-) enantiyomeri, erkek cezbedici ve S (+) enantiyomeri potansiyel olarak dişi cezbedici ya da sakinleştirici görevi alır (Katsoyannos ve Kouloussis 2001).



Şekil 1.8. Zeytin sineği yakalamada kullanılan tuzaklar (Anonim, 2013e).

1.2.6.4. Kimyasal mücadele

Kullanımının kolay olması ve çabuk sonuç vermesinden dolayı zeytin sineği popülasyonlarının baskı altına alınması ve zarar eşiğinin altında tutulması için son kırk yılı aşkın bir süredir, koruma sprelerinde ve tuzak sprelerinde (dimethoate ve fenthion gibi) organofosfat ve karbamat grubu insektisitlerin kullanıldığı bir zeytin sineği yönetimi temel alınmıştır. Son yıllarda ise kontrol için, piretroidlerin kullanımında da bir artış olmuştur (Pala vd. 2001). Zeytin sineği ile mücadelede kullanılan kimyasallar, kullanım şekilleri ve dozları Çizelge 1.4.'te sunulmuştur (Zobar, 2008).

Çizelge 1.4. Zeytin sineğine karşı kullanılan kimyasallar (Zobar, 2008).

Etkili Madde	Form.	Doz	Açıklama
Adı ve Oranı	Tipi	(Preparat/ hl su)	
<u>Öncelikli olarak tavsiye edilen ilaçlar</u>			
Feromon, %0.01+	Tuzak	- Orta büyüklükteki ağaçlardan oluşan yeknesak zeytin bahçelerinde, iki ağaca bir tuzak,	
Deltamethrin, %0.0187		- Büyük taçlı ağaçlardan oluşan bahçelerde ve yeknesak olmayan bahçelerde, her ağaca bir tuzak asılır.	
Hidrolize protein, 850 g/l + Malathion, %25	WP + EC	4 litre +4,5 kg	Zehirli yem kısmi ilaçlama.
Hidrolize protein, 850 g/l + Fenthion, 525 g/l	EC + EC	1 litre + 500 ml	Zehirli yem kısmi ilaçlama.
Beta Cyfluthrin, 25 g/l	EC	30 ml	Kaplama ilaçlama.
<u>İkinci derecede tavsiye edilen ilaçlar</u>			
Formothion, 336 g/l	EC	150 ml	Kaplama ilaçlama.
Cyfluthrin, 50 g/l	EC	30 ml	Kaplama ilaçlama.
Deltamethrin, 25 g/l	EC	25 ml	Kaplama ilaçlama.
Deltamethrin, 120 g/l	EC	5.5 ml	Kaplama ilaçlama.
Fenthion, 525 g/l	EC	100 ml	Kaplama ilaçlama.
Trichlorfon, %80	SP	125 g	Kaplama ilaçlama.

Morfolojik karakterlerin sınıflandırmada yetersiz kalmasından dolayı zeytin sineği gibi ülkemizde ve dünyada ekonomik açıdan önem arz eden türlerin sınıflandırılması, genetik yapılarının ve yayılım süreçlerinin belirlenmesi amacıyla moleküler filogenetik çalışmalar oldukça önem kazanmıştır. Moleküler biyolojik teknikler 1960'lı yıllardan sonra hızlı bir gelişim göstermiştir. Bu gelişim sayesinde, çok sayıda moleküler DNA belirteçlerinin geliştirilmesi mümkün olmuştur. Moleküler

belirteçler araştırmacılara taksonlar arasındaki genetik ilişkiyi detaylı olarak tayin etme, filogenetik ve biyoçeşitlilik için yeni deliller elde etme konularına ilişkin bilgiler sağlamıştır (Hills ve Moritz, 1990).

1.3. Moleküler Filogeni

Türler arasında DNA bölgelerindeki nükleotit bölge farklılıklarının belirlenmesi amacıyla moleküler filogeni çalışmaları yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Organizmalar arasında kategorik seviyelerdeki problemlerin çözümleri için uygun moleküler belirteçlerin ya da gen bölgelerinin belirlenmesi en önemli basamaktır ve bu amaçla filogenetik analizlerin en önemli basamağı uygun gen bölgesinin seçilmesidir (Hwang ve Kim, 1999).

Moleküler genetikteki son yıllarda artan gelişmelere paralel olarak kullanılan genetik markerler da çeşitlilik göstermektedir. Bu alana yönelik yapılan ilk çalışmalarda protein elektroforezi yöntemi ile çeşitli lokuslar çalışılarak; gözlenen alleller ve lokuslar karşılaştırılmalı olarak ele alınmıştır (Fidan, 1995). Sonraları PCR tekniğinin bulunuşuna bağlı olarak DNA'nın belli bölgelerinin çoğaltılabilmesi mümkün olmuş ve buna bağlı olarak DNA'nın doğrudan kullanımını içeren genetik işaretler kullanılmaya başlanmıştır (Bernatchez vd. 1992; Apostolidis vd. 1996).

Canlılar arasındaki sistematik ve genetik yapıların araştırılmasında kullanılan moleküler belirteçler, protein belirteçleri ve DNA belirteçleri olarak ikiye ayrılabilir. Moleküler belirteçler; morfolojik açıdan farklı olmayan yakın akraba türlerin ayırt edilmesinde, morfolojik karakterlerin kullanışlı olmadığı organizmaların sınıflandırılmasında, QTL haritalamada, gen kaynaklarının korunmasında, gen akışı ve popülasyonların genetik yapısını tayin etme gibi konularda kullanılmaktadır (Bardakçı ve Karataş, 2005).

DNA ile genetik polimorfizm çalışmanın, protein polimorfizmi ve diğer gen ürünleri üzerine çalışmalara göre daha fazla bilgi elde edilmesi gibi avantajlarının olduğu belirtilmiştir (Nei ve Kumar, 2000). Her ne kadar popülasyon genetiği çalışmalarında protein jel elektroforezi kullanılarak yapılan protein çeşitliliği çalışmaları günümüzde azalsa da, karşılaşılan bazı spesifik sorunların çözümlenmesinde hala

kullanılmaktadır (Lewontin, 1989). Aşağıda belirli temel moleküler filogenetik yöntemler kısaca özetlenecektir.

1.3.1. Protein belirteçleri

DNA teknolojisinin gelişiminden önce yaygın bir şekilde kullanılan protein belirteçleri, elektroforetik enzim analizleri, farklı alellerin ortaya çıkartılması, tür içi ve türler arasındaki genetik çeşitliliğin saptanması çalışmalarında kullanılmıştır. Elde edilen allel frekanslarının analizi ile türler arasında ya da bir türün farklı popülasyonları arasındaki genetik uzaklık, elde edilen allel frekanslarının analiziyle hesaplanabilir (Loxdale ve Lushai, 1998). Allozim ve izozimler 1960'lı yıllardan itibaren popülasyon genetiği çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmışlardır (Hubby ve Lewontin, 1966; Ayala vd. 1972). Allozimler, aynı lokus üzerinde farklı aleller tarafından kodlanan farklı formda enzimlerdir; izozimler ise farklı lokuslar üzerinde yer alan genler tarafından kodlanan fakat aynı fonksiyonu gören enzimlerdir. Allozimlerin poliakrilamid jelde yürütülmesi sonucu gözlenen bant profilleri belli bir genin farklı allellerini ayırt etmede kullanılırken izozimlerden elde edilen bantların incelenmesiyle de farklı popülasyonlar arasındaki genetik varyasyon gözlemlenebilir (Gómez, 1998). Allozim elektroforezinin bazı avantajları ve dezavantajları vardır. Bunları şu şekilde özetlemek mümkündür (Gómez, 1998).

Allozim elektroforezinin avantajları;

1. Çalışılması kolaydır.
2. Elde edilen veriler fenotipik özelliklerden etkilenmez.
3. Aynı anda çok sayıda birey analize tabi tutulabilir.
4. Ko-dominanttır.
5. Diğer moleküler yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç verir ve daha ucuzdur.

Allozim elektroforezinin dezavantajları:

1. Sadece yapısal genler incelenebilir.
2. Genler arasındaki potansiyel pek çok farkın saptanması her zaman mümkün olmayabilir.
3. Bazı enzimlerin lokusları ya da allellerinin tanımlanması bazen zor olabilir.

4. Bazı enzimler sadece belli dokularda bulunabilir.
5. Enzimatik aktiviteyi saptamak için denatüre olmamış materyal gerekir.

1.3.2. DNA belirteçleri

Son yıllarda DNA temelli belirteç sistemlerindeki gelişim sebebiyle DNA belirteçlerinin, protein belirteçlerine göre polimorfizmi ortaya çıkarmada daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür (Richardson vd. 1986). Bunun yanı sıra DNA numuneleri, proteinlere göre daha stabildir ve proteinlerden farklı olarak organizmaların bütün dokularında aynıdır. Bu nedenle DNA belirteçleri tür içindeki ya da türler arasındaki genetik uzaklığı belirlemek için daha çok kullanılan belirteçler haline gelmiştir. Özellikle çalışma materyali az ise ya da numuneler eski ve kuru ise bu gibi durumlar, DNA belirteçlerinin kullanılması için uygun durumlardır (Behura, 2006; Hoy, 2003).

Son 20 yılda DNA belirteçleri böceklerde; filogeni, popülasyon dinamiği, gen ve genom haritalama çalışmalarına büyük katkı sağlamıştır (Avisé, 2004). DNA belirteçlerinde kullanılan moleküler teknikler RFLP (Kesilen Parçaların Uzunluk Polimorfizmi), RAPD (Rastgele Çoğaltılan Polimorfik DNA), AFLP (Çoğaltılan Parçaların Uzunluk Polimorfizmi) ve SSR (Basit Dizi Tekrarları)'dır.

1.3.2.1. Kesilen parçaların uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

İlk keşfedilen moleküler belirteç sistemidir. Teknik, temel olarak çalışılan DNA'nın çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesilerek agaroz jelde yürütülmesi, daha sonra DNA'ların blotlama tekniği kullanılarak naylon veya nitroselüloz membrana aktarılması şeklinde gerçekleştirilir. Belirteç olarak kullanılan DNA parçacıkları P³² veya biotin ile işaretlenir ve membranda bulunan kesilmiş DNA'lar ile hibridizasyona tabi tutulur. Tekniğin dezavantajları; çok fazla miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulması, pahalı ve fazla zaman almasıdır. Avantajları ise; sonuçların güvenilirliği, polimorfizm oranının yüksek oluşu ve kodominat belirteç sistemine sahip olmasıdır (Tanksley vd. 1992; Staub vd. 1996).

1.3.2.2. Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)

RFLP metodundaki zorlukları aşmak ve PCR tekniğinin getirdiği avantajlardan yararlanmak amacıyla RAPD tekniği geliştirilmiştir (Williams vd. 1990). Rastgele nükleotid dizilimine sahip olan tek bir primerin kullanılmasıyla DNA parçaları çoğaltılmakta ve oluşan farklı bant desenlerine göre polimorfizm tespit edilebilmektedir. Bu belirteç kullanılarak yapılan çalışmalarda, aynı lokustaki iki farklı alel belirli büyüklükteki bantların varlığıyla ya da yokluğuyla ayırt edilebilmektedir (Liu, 1998).

RAPD belirteçlerinin avantajları, DNA dizi bilgisine ihtiyacın olmaması, diğer markörlere göre ucuz ve daha az miktarda DNA ile kısa sürede sonuçlar alınabilmesidir. Dominant olmaları, PCR esnasında yanlış eşleşmelerin oluşabilmesi, PCR şartlarındaki küçük bir değişimin bile sonuçları etkilemesi ve tekrarlanabilirliğinin az olması tekniğin dezavantajlarını oluşturmaktadır (Williams vd. 1990).

1.3.2.3. Çoğaltılan parçaların uzunluk polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

Bu teknik, restriksiyon enzimleri ile kesilmiş genomik DNA parçalarının seçici PCR ile çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Teknik, DNA'ların restriksiyon enzimiyle kesilmesi, oluşan bu DNA parçacıklarının adaptörlerle birleştirilmesi ve ürünlerin 3 baz ilave edilmiş primerlerle (primerlerin birisi radyoaktif veya fluorescent ile işaretlenmekte) seçici PCR'a tabi tutulması şeklinde 3 basamaktan oluşmaktadır. PCR ürünleri poliakrilamid jelde yürütülerek oluşan polimorfizme göre sonuçlar değerlendirilmektedir. Tek bir reaksiyonda 30-150 bölge tanımlanabilmesi, sonuçların tekrarlanabilir olması ve az miktarda DNA gerekmesi tekniğin en önemli avantajlarını oluşturmaktadır. Dezavantajları ise pahalı laboratuvar ekipmanına gereksinim duyulması ve dominant markör olmasıdır (Vos vd. 1995; Ridout ve Donini, 1999).

1.2.3.4. Basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeats SSR)

Canlı genomunda çok sıklıkla tekrarlanan ve bu tekrar sayıları türden türe değişiklik gösteren DNA dizileri bulunmaktadır. Bu teknik, aynı tür içindeki bireyler arasında bu dizilerin bulunup bulunmamasına dayalı olarak geliştirilmiştir. SSR analizinde, tekrarlanan bölgelere özgü spesifik primerler geliştirilmekte ve bu primerler ile PCR yapılmaktadır. PCR ürünleri, elektroforez yapıldıktan sonra ethidium bromide veya gümüş nitrat kullanılarak boyandıktan sonra değişiklikler kaydedilmektedir (Rangwen vd. 1995).

SSR'lar yüksek polimorfizm göstermelerinden dolayı birçok organizmada popülasyon genetiği ve gen haritalama çalışmalarında kullanıma uygun genetik belirteç kaynağıdır (Holton, 2001).

Ko-dominant kalıtım özelliği göstermeleri, lokusa özgü olmaları, yüksek bilgi içeriğine sahip olmaları ve PCR ile kolayca tespit edilebilmeleri gibi avantajlarından dolayı sıklıkla kullanılan belirteçler arasında yer almaktadırlar (Röder vd. 1995). PCR'a dayalı olmalarından dolayı da az miktarda DNA yeterli olabilmektedir. Mikrosatellit primerleri tür içi ve türler arası varyasyonun belirlenmesinde kullanılabilir. Ayrıca türlerin bireysel olarak genotiplerini ortaya konmasında kullanılabilirler (Powell vd. 1996). Bu tekniğin dezavantajları ise; genom bilgisine ve dizilim analizine ihtiyaç duyulması ve primer dizayn etmenin oldukça zahmetli olmasıdır (Ridout ve Donini, 1999).

1.3.3. Belirteç olarak kullanılan DNA bölgeleri

- 1- İtronlar
- 2- Ribozomal DNA
- 3- Nükleer protein kodlayan genler
- 4- Mitokondriyal DNA
- 5- Satellit DNA

1.3.3.1. İtronlar

Moleküler çalışmalarda tek kopyalı nükleer genlerdeki intronların kullanılması uygun bulunmuştur ancak türler arasındaki varyasyonlar intronların filogeni çalışmalarındaki kullanımını sınırlayıcı bir faktör olmuştur (Caterino vd. 2000).

1.3.3.2. Nükleer ribozomal DNA (rDNA)

Ribozomal DNA (rDNA) taksonomik çalışmalarda kullanılan bir diğer moleküler belirteçtir. Ökaryotik nükleer rDNA art arda dizilen yaklaşık 5000 kadar kopya sayısı içermektedir. Her bir tekrar ünitesi 28S rRNA büyük alt birim, 18S rDNA küçük alt birim ve 5.8S rDNA bölgelerinden oluşmaktadır. Bunlara ilave olarak ITS1 ve ITS2 (internal transcribed spacer) bölgeleri bulunur. Ribozomal RNA ile yapılan çalışmalar incelendiğinde en çok 18S rRNA, 28S rRNA, ITS1 ve ITS2 bölgelerinin kullanıldığı belirlenmiştir (Caterino vd. 2000). Filogeni çalışmalarda en çok kullanılan ribozomal genlerin de, 18S rDNA, ITS1 ve ITS2 olduğu belirtilmiştir (Doolittle, 1999).

1.3.3.3. Nükleer protein kodlayan genler

Proteine kodlanan lokuslardan bazıları böcek moleküler sistematik çalışmalarında kullanılmaktadır (Caterino vd. 2000; Friedlander vd. 1992). Bu genlere örnek olarak α -amilaz (*amy*) (Maczkowiak ve Da Lage 2006), Alkol dehidrogenaz (*adh*) (Rowan ve Hunt 1991), uzama faktörü-1-alfa (*EF-1 α*) (Yang vd. 2000), ksantin dehidrogenaz (*xdh*) (Houde vd. 1989) genleri gösterilebilir. Ancak bu genlerin; bazı dezavantajlarının olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmamaktadırlar (Caterino vd. 2000). Bu dezavantajlar;

- Düşük kopya sayısına sahip olmalarından dolayı çoğaltılmalarının zor oluşu.
- Pseudogenler.
- Büyük intronlar içermeleridir.

1.3.3.4. Mitokondriyal DNA (mtDNA)

Ökaryotik hücrelerde solunum olayının gerçekleştiği organel mitokondridir. Mitokondrilerin çekirdekten bağımsız olarak kendilerine özgü ve ifade olabilen DNA'ları bulunmaktadır. Çekirdek DNA'sından farklı olarak mitokondriyal DNA (mtDNA)'nın hücrede fazla sayıda bulunması önemli bir özelliktir ve bu özelliğinden dolayı moleküler genetik çalışmalarında yeterli miktarda mtDNA izole edilebilmektedir (Rokas vd. 2003). Maternal kalıtım (genetik materyalin yalnızca anneden yavrulara aktarılması) gösteren mtDNA, çift zincirli, halkasal yapıda ve aerobik solunumda görev alan genleri içermektedir ve toplam genetik materyalin % 0.3'ünü oluşturmaktadır (Rokas vd. 2003).

MtDNA, böceklerde genetik varyasyon ve filogenetik çalışmalar için oldukça fazla tercih edilen bir belirteçtir. MtDNA gen bölgeleri akraba böcek türlerinin tarih içindeki değişimini belirlemek amacıyla filogenetik ve popülasyon genetiği çalışmalarında kullanılmaktadır. MtDNA'nın moleküler teknikler ile yapılan çalışmalarda tercih edilmesinin nedeni genom büyüklüğünün yaklaşık 14-17 kb olmasıdır. MtDNA, boyutu küçük ve elde edilmesi kolay olması nedeniyle birçok moleküler yöntemin (DNA dizileme, PCR, RFLP, SNP, v.s.) kullanımına elverişlidir (Smith 1991). mtDNA genomu birçok canlı grubu arasında önemli benzerlikler sergilemektedir ve nükleer DNA'da olduğu gibi intron bölgeleri içermediklerinden dolayı farklı türlerin karşılaştırılması mümkündür (Brown 1985).

Aynı taksonomik sınıfta yer alan canlılarda mtDNA'nın gen içeriği ve düzeninin bazı türlerde farklı olmakla birlikte bazı türlerde ise aynı olması da evrim çalışmaları açısından önemli bir avantajdır (Crozier vd. 1991).

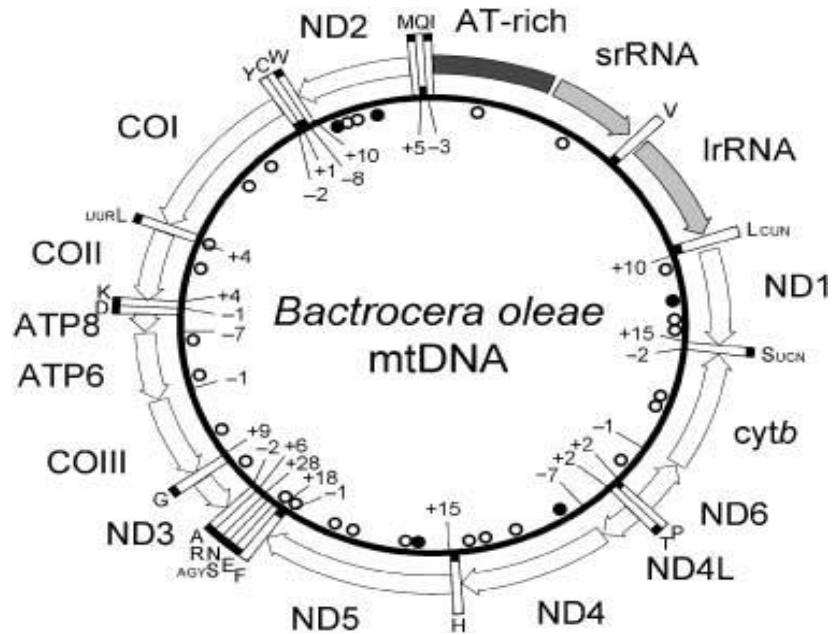
mtDNA'nın moleküler çalışmalarda kullanılmasının bir diğer sebebi de mtDNA'da bulunan gen bölgelerinin evrimleşme hızlarının farklı olmasıdır. Bu nedenle farklı tür veya aynı türlerin aralarındaki ilişkinin incelendiği filogenetik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Smith vd. 1991). Avise (1991) yılında yaptığı çalışmada, mtDNA'nın D-loop bölgesinin mutasyon hızının diğer kısımlarına göre %2-4 kat, nükleer DNA'ya göre ise en az 10 kat daha hızlı olduğunu bildirmektedir. mtDNA'nın etkili bir tamir mekanizmasından yoksun olması (Bogenhagen 1999), histon proteinlerinin olmaması, oksidatif fosforilasyon ile açığa çıkan yüksek mutajenik etkiye sahip oksijen radikalleriyle fiziksel ilişki içerisinde bulunması

(Richter, 1988) gibi faktörler, mtDNA'da meydana gelen polimorfizmin nükleer DNA'dan daha yüksek oranda görülmesinin muhtemel sebeplerini oluşturmaktadır.

mtDNA'nın mutasyon hızının nükleer DNA ile karşılaştırıldığında daha yüksek olmasından dolayı aynı jenerasyon içerisindeki mutasyonları dahi gösterebilmesi, maternal kalıtım özelliği taşıması, rekombinasyon göstermemesi, bir hücre içerisinde çok fazla sayıda kopyasının bulunması ve haploid özellik göstermesi (Cann vd. 1987; Rokas vd. 2003) gibi avantajlarıyla bireylerin filogenisindeki nasıl, nerede ve ne zaman gibi sorularına daha net cevap sunabilmekte ve alternatif belirteç olarak genetik çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu belirteçlerin kullanılmasıyla, yakın zamanda birbirinden ayrılan türlerin tarih içinde farklılaşmasının ve bir türün başka bir coğrafik alana yerleşmesi sonucu oluşan farklılıkların genetik temellerinin iyi bir şekilde anlaşılmasını sağlamıştır (Behura, 2006).

Zeytin sineği mitokondriyal genomu 15.815 nükleotid uzunluğunda halkasal bir moleküldür. Bu molekül 13 protein (COI-III, ND1-6 ve 4L, sitokrom *b*, ATPaz 6 ve ATPaz 8), iki ribozomal alt ünite (1rRNA ve srRNA) ve 22 transfer RNA'yı kodlamaktadır (Şekil 1.9.) (Nardi vd. 2003). Filogenetik çalışmalarda özellikle birkaç mitokondriyal DNA gen bölgesi (12S rDNA, 16rDNA, Cytb, ND1 ve COI) daha çok tercih edilmektedir (Hwang ve Kim, 1999).



Şekil 1.9. Zeytin sineği mitokondriyal DNA'sının şematik gösterimi (Nardi vd. 2003).

1.3.3.5. Satellit DNA

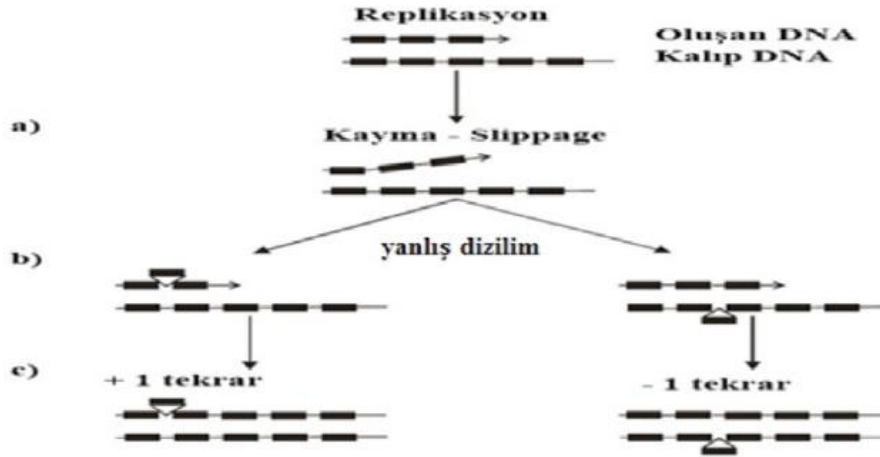
Bir türe ait popülasyonlar gibi evrimsel açıdan birbirine yakın olan canlı gruplarının karşılaştırılmasında mikrosatellitler yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra popülasyonlarda yakın zamanda meydana gelen bir olayın (darboğaz etkisi, genetik sürüklenme ve inbreeding gibi) izlerinin aranacağı durumlarda da en çok kullanılan genetik işaretlerden biri mikrosatellitlerdir (Bruford vd. 2003).

DNA, sezyum klorid yoğunluk gradienti içinde santrifüj edildiğinde, ana bir bant oluşur. Bu DNA'nın esas bölümünü gösterir. Buna ek olarak; üç ek bant daha bulunmaktadır (satellitler). Bunlar; 100-6500 baz çifti (bç) tekrarlardan oluşan klasik satellit DNA, 10-20 bç tekrarlı minisatellitler ve 2-6 bç tekrarlı mikrosatellitlerdir ve genellikle kodlanmayan (noncoding) bölgelerde bulunurlar (Passarge, 1995).

Mikrosatellit (Litt ve Luty, 1989) veya basit dizi tekrarları (Tautz vd. 1989) olarak adlandırılan DNA'nın art arda gelen tekrar birimleri ökaryotik genomlarda yaygın şekilde bulunmaktadır (Hoelzel, 1995). Bu tekrar grupları (AT)_n, (GT)_n, (ATT)_n veya (GACA)_n motifleri şeklinde olabilmekte ve n ardışık tekrar sayısını belirtmektedir. Polimorfik bir lokusta tekrarların sayısı 5'ten 100'e kadar değişebilmektedir. Tekrar birimlerinin sayısındaki farklılıktan dolayı mikrosatellitler, yüksek derecede polimorfiktir. Tekrar ünitelerinin uzunluğuna bağlı olarak polimorfizm seviyesi değişmektedir (Saghai vd. 1994).

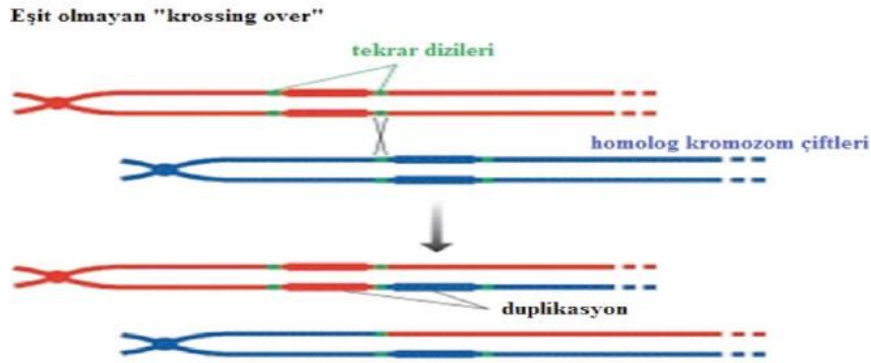
Bu yüksek polimorfizm; genomun diğer kısımlarına oranla yüksek mutasyon oranından kaynaklanmaktadır (Allendorf ve Luikart, 2007). Genomun diğer bölgelerine göre mikrosatellitlerdeki mutasyon oranının fazla olmasının sebebi; tekrar bölgelerinin büyüklüğü, tekrar sayıları ve DNA tekrar bölgelerindeki transkripsiyonun sıklığından dolayıdır (Eisen, 2000). Mikrosatellit lokuslarında mutasyona sebep olan önemli iki mekanizma; DNA replikasyonu sırasında oluşan hatalar ve mikrosatellit tekrarlarında eşit olmayan krossing-overdir (Allendorf ve Luikart, 2007). Maya ve *E.coli* üzerinde yapılan bir çalışmada, mikrosatellitlerde oluşan mutasyonların meydana gelme sürecinde asıl etkili olan mekanizmanın kayma (slippage) olduğu ortaya konmuştur (Henderson ve Petes, 1992). Replikasyon kayması olarak bilinen bu durum tekrar bölgesinin replikasyonu sırasında oluşur ve kayma sonrası, oluşan DNA, kalıp DNA'ya göre ya kısa ya da uzun olur. Sonuç

olarak, mikrosatellitler birkaç tekrar kazanır ya da kaybeder (Şekil 1.10.) (Eisen, 2000; Karhu, 2001).



Şekil 1.10. Polimeraz enziminin kayması sonucu mikrosatellitlerde oluşan mutasyon. a) Replikasyon sırasında DNA polimerazda oluşan kayma b) kalıp ya da oluşan DNA'da yanlış dizilim c) Replikasyonun devam etmesi ve eksik ya da fazla tekrar oluşması.

Mutasyona neden olan diğer mekanizma ise; homolog kromozomlardaki mikrosatellit tekrarlarında crossing-over sırasında tam olmayan bir eşleşmenin olmasıdır (Eisen, 2000) (Şekil 1.11.).



Şekil 1.11. Eşit olmayan crossing over.

Genom içerisindeki mikrosatellit lokusları; oligonukleotit primerler kullanılarak PCR aracılığıyla çoğaltılabilir. Bir popülasyonda; mikrosatellit lokuslarının PCR yöntemiyle çoğaltılması ve jel elektroforezinde yürütülmesi sonucunda, heterozigot ve homozigot bireylere ait molekül ağırlıklarına göre yürüyerek oluşan bantlar jel üzerinde görüntülenebilmektedir (Butler, 2005).

Bunun yanısıra otomatik dizi analiz cihazlarında fragment analizi yapılarak bilgisayar sisteminde özel analiz programlarıyla uzunluğu bilinen standart örnek yardımıyla da analiz edilebilmektedirler. Kapiller elektroforez sisteminin kullanıldığı bu teknikte; sonuçlar allel uzunluklarını gösteren pikler şeklinde elde edilmektedir (Butler, 2005).

1.4. Literatür Özeti

Ekonomik açıdan büyük zararlara sebep olabilen zeytin sineği popülasyonlarının genetik yapısının anlaşılmasına yönelik çalışmalar oldukça azdır. Ülkemizde ise bilinen hiçbir genetik çalışma bulunmamaktadır.

Tsakas ve Krimbas (1974) yılında yaptıkları çalışmada Yunanistan'dan topladıkları 3 farklı zeytin sineği popülasyonundaki polimorfizmi *Est-A* ve *Est-B*, *APH* (alkalin fosfataz), *ADH* (alkol dehidrogenaz), *TO* (Tetrazolim oksidaz), ve *ODH* (Oktanöl dehidrogenaz) lokuslarında çalışmışlar ve bu 3 popülasyona ait 36 allelin frekanslarını bulmuşlardır.

Ochando ve Reyes (2000) yılında yapmış oldukları bir çalışmada Madrid'ten topladıkları 4 farklı zeytin sineği popülasyonlarındaki genetik çeşitliliği 9 lokusta (aldehit-oksidad, asit fosfataz dehidrogenaz, esteraz 1 ve 2, fruktokinaz, heksokinaz, hidroksibütürat-dehidrogenaz, malat dehidrogenaz ve fosfoglukomutaz) izoenzimler vasıtası ile araştırmışlardır.

Augustinos vd. (2002) yılında doğal zeytin sineği popülasyonlarının genom analizinde kullanılabilen 10 adet yeni geliştirilen mikrosatellit belirtecini geliştirmişlerdir.

Nardi vd. (2003) yılında *B. oleae*'nin mitokondrial DNA'sının baz dizi analizini yapmışlardır.

Yine Nardi vd. tarafından (2005) yılında, Pakistan, Afrika, Avrupa (Akdeniz havzası) ve Amerika'dan topladıkları zeytin sineği örneklerinde mikrosatellit ve mitokondrial DNA belirteçleri kullanılarak bu popülasyonlardaki bölgesel ve kıtalararası genetik farklılıklar ve dünya üzerindeki bu organizmanın olası dağılım modelini incelemişlerdir. Sonuçlarında bölgesel farklılığın az, kıtalararası farklılığın

ise daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmış ve bu organizmanın muhtemelen Afrika'dan k3ken aldığını, daha sonra Ortadoğu 3zerinden Akdeniz havzası ve Amerika'ya yayılmış olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada mtDNA ND1 b3lgesi incelenen 3rneklerin hem Afrika hem de Amerika'dan karakterize edilmiş olan mitokondrial DNA haplotiplerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara dayalı olarak Ortadoğu b3lgesinin bu organizmanın kolonizasyonunda (d3nya 3zerindeki dağılımında) 3nemli bir çıkış noktası olabileceği sonucuna işaret etmişlerdir.

Augustinos vd. (2005) 3lkemizden Aydın ilini içeren tek lokasyon olmakla birlikte Akdeniz havzasından 19 farklı lokasyondan topladıkları 3rneklerdeki genetik çeşitliliği 12 farklı mikrosatellit belirteci kullanarak çalışmışlardır. Çalışma sonucunda, bu organizmanın Kıbrıs, İtalya-Yunanistan-T3rkiye ve İber yarım adası olmak 3zere 3 farklı alt populasyon sergilediklerini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra heterozigotluk oranında doğu-batı ekseninde kademeli bir azalma olduğunu ve organizmanın da muhtemelen Ortadoğu'dan Akdeniz havzasına doğru bir yayılış g3stermiş olabileceğini 3ne s3rmüşlerdir.

Augustinos vd. (2008) yılında zeytin sineği'nden 62 farklı mikrosatellit motifi içeren 58 mikrosatellit primeri geliştirmişlerdir. Bunun yanı sıra geliştirdikleri 42 primer çiftinden 31 tanesinde beklenen b3y3kl3kte PCR 3r3n3 elde ettiklerini belirtmişlerdir. Polimorfizm seviyeleri yabani ve laboratuvar sineklerine karşı değerlendirilerek belirteçlerin b3y3k çoğunluğunu (% 93.5) y3ksek oranda polimorfik olarak bulmuşlardır.

Segura vd. (2008) yılında çoğu İber yarımadasından olmak 3zere İsrail, Amerika, İtalya ve Yunanistan'dan toplam 21 farklı lokasyondan topladıkları 3rneklere RAPD-PCR y3ntemi kullanarak genetik çeşitliliği araştırmışlar ve deney sonuçlarında zeytin sineğinin Afrika, Amerika ve Akdeniz havzası olmak 3zere ayrı 3 grupta toplandığını g3stermiştir.

Zygouridis vd. (2009) yılında yaptıkları bir çalışmada ise toplam 5 lokasyondan (Kalifornia (ABD) b3lgesinden 4 farklı lokasyon ve İsrail'den 1 lokasyon) almış oldukları zeytin sineği 3rneklerinde populasyonlar arası genetik ilişkileri 12 adet mikrosatellit belirteci kullanarak incelemişler ve buna g3re Doğu Akdeniz'den batıya doğru bir g3 olabileceğini belirtmişlerdir.

Nardi vd. (2010) zeytin sineği yayılışının zamansal sürecini ve Akdeniz boyunca yabancı zeytinler üzerindeki popülasyonlar ile uyumlu olup olmadığını, zeytin sineğinin yayılış gösterdiği bütün coğrafik alanları ve temel genetik grupları içeren 21 *B. oleae* tam mitokondri genomu kullanarak test etmişlerdir. Sonuçlarında pasif dağılım ve genetik farklılaşma ile ya da insanların aracılık ettiği zeytin kültüre alınması ve dağılımı ile ilgili son yıllardaki yayılışa dikkat çekmişlerdir. Ayrıca zeytin sineğinin zeytinin kültüre alınmasıyla ilgili olarak yabandan kültüre konakçı değişiminin nedeni araştırmışlar ve yabancı zeytinden kültür zeytine eş zamanlı bir geçiş olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bunun dışında *Diptera* ve *B. oleae* intraspesifik ağaçları oluşturulmuş ve bu ağaçlardaki kolların ayrılmalarının zaman taslağını elde etmişlerdir. *B. oleae* mitokondriyal genomunu kullanarak elde ettikleri ağacın, nükleer ve mitokondriyal verilere dayalı daha önce tanımlanmış (Pakistan, Afrika, Akdeniz) üç genetik gruba uygun temel üçlü bir yapı sergilediğini ve oluşturulan ağaçta en az bir alt şubeleşme (East med vs Central/Westmed) olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Afrika örneklerinin Akdeniz örnekleri ile genetik açıdan benzer olduğunu ve Kaliforniya örneklerinde Doğu Akdeniz (muhtemelen Kıbrıs, İsrail ya da Türkiye)'den orjinlendiğini ileri sürmüşlerdir.

Asch vd. (2012) yılında yaptıkları çalışmada Portekiz'den 10 farklı lokasyondan topladıkları zeytin sineği örneklerinde mtDNA'nın 3.815 bp uzunluğundaki 5 farklı bölgesini (ND1, ND2, ND4, COX1, COX2 ve 16s rRNA) çalışmışlardır. Araştırmacılar daha önceden yayınlanan baz dizileri ile birlikte elde ettikleri baz dizilerini birleştirerek popülasyonlarının filocoğrafik analizini gerçekleştirmişlerdir. Network analizi sonucunda Akdeniz popülasyonlarının Doğu Akdeniz-Batı Akdeniz ve İtalic Peninsula (İtalya Yarımadası) olmak üzere üç grup sergiledikleri gösterilmiştir.

Yukarıda bahsedilen çalışmaların ortak sonucu kısaca özetlenecek olursa; bu organizmanın orjin noktası muhtemelen Afrika olup, dünya üzerine yayılma süreci muhtemelen Ortadoğu bölgesinden ülkemiz üzerinden Akdeniz havzasına doğru gibi görünmektedir.

1.5. Amaç

Tez çalışmasının bu bölümünde zeytin sineğinin dünyaya muhtemel yayılım bölgelerinden biri olduğu düşünülen ve yoğun bir şekilde zeytin yetiştiriciliğinin yapıldığı ülkemizin önemli alanlarından olan Güneydoğu Anadolu, Akdeniz, Ege ve Marmara Bölgelerinden, Gaziantep, Hatay, Adana, Osmaniye, Mersin, Balıkesir, Manisa, İzmir, Aydın, Muğla, Çanakkale ve Bursa illerinden toplanan zeytin sineği örneklerinde, popülasyonların genetik yapısı ve birbirlerinden uzaklıklarının 12 adet polimorfik mikrosatellit belirteci kullanılarak anlaşılması amaçlanmıştır. Böylelikle, zeytinliklerde ana zararlı konumundaki zeytin sineği popülasyonlarının genetik karakterizasyonunun tamamlanması amaçlanmaktadır. Bununla birlikte mitokondriyal DNA tarafından kodlanan NADH geninin yüksek polimorfizm gösteren bölgesinin de kısmi baz dizi analizi yapılmak suretiyle daha önce bulunan ve GenBankası'na kaydedilmiş olan 22 farklı haplotiple bu çalışma sonucunda elde edilen mitokondriyal DNA haplotiplerinin karşılaştırılması ve böylelikle hem ülkemizdeki hem de dünya üzerindeki zeytin sineği popülasyonlarının genetik yapılarının ve özellikle Orta Doğu bölgesinden Avrupa kıtasına doğru göç yollarının daha detaylı incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Zeytin Sineği Örneklerinin Toplanması

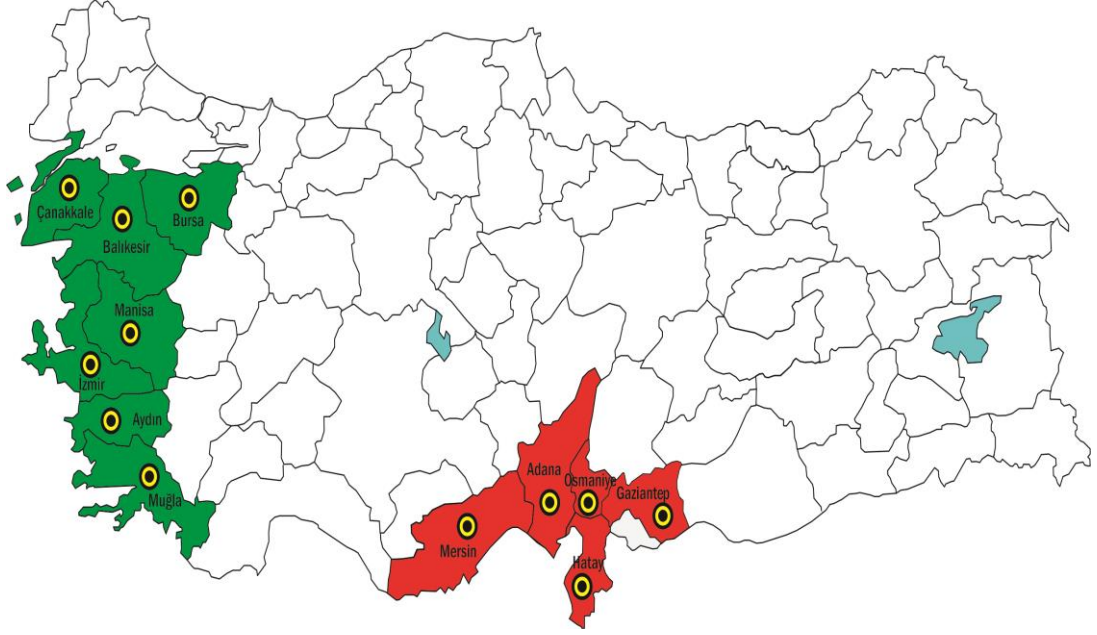
Tez çalışması kapsamında lokasyonlar belirlediğimiz kriterler doğrultusunda tarım il müdürlükleri ile görüşmeler yapılarak belirlenmiştir. Bu kapsamda ülkemizde zeytin yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Güneydoğu Anadolu, Doğu Akdeniz, Ege ve Marmara Bölgelerinden zeytin sineği (*B. oleae*) örnekleri toplanmıştır. Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz Bölgelerinden; Gaziantep, Hatay, Osmaniye, Adana ve Mersin illerinden, Ege Bölgesinden Muğla, Aydın, İzmir, Manisa ve Balıkesir illerinden 3'er farklı lokasyondan Marmara Bölgesinden ise Çanakkale ve Bursa illerinden 4'er farklı lokasyondan vuruklu zeytinler toplanmak suretiyle örneklemeler yapılmıştır. (Çizelge 2.1. ve Şekil 2.1.). Marmara Bölgesinde yer alan Yalova İli, Balıkesir'in Erdek, ve Bursa'nın Mudanya ve Gemlik İlçelerinden toplanan örnekler Bursa İline ait populasyonlar olarak değerlendirilmiştir. Ana karadan farklılaşmaların da gösterilebilmesi amacıyla ada popülasyonu olarak Çanakkale İli sınırları içerisinde bulunan Gökçeada'dan da örnekler toplanmıştır. Sonuç olarak çalışmamızda toplam 12 il ve 38 farklı lokasyon bulunmaktadır. Yapılan arazi çalışmaları sonucunda zeytin sineğinin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yayılım gösterdiği en uç noktanın Gaziantep iline bağlı olan Nurdağı - Zincirli - Islahiye hattı olduğu tespit edilmiş ve bu bölgelerden örneklemeler yapılmıştır. Bu bölgemizde yetiştiriciliğin yapıldığı Kilis, Oğuzeli, Nizip ve komşu ilçelerde gerek bahçe ve gerekse de zeytinyağı fabrikalarında arazi çalışılması yapılmış fakat yeterli sayıda bireye ulaşılacak örnek toplanamamıştır. Arazi tecrübelerine dayanılarak bu durumun sebebinin muhtemelen bölgesel iklim parametreleri (rüzgâr, yağış, nem ve sıcaklık farklılıkları vb.) olduğu kanısına varılmıştır.

Çizelge 2.1. Çalışmamızda kullandığımız zeytin sineği örneklerinin toplandığı il, alt lokasyon ve koordinatlar.

Bölgeler	İller	Alt-Lokasyonlar	Koordinatlar
Marmara	Çanakale	Eceabat	40° 10.8' N 26° 19.2' E
		Geyikli	39° 48.0' N 26° 10.8' E
		Gökçeada	40° 12 0'N 25° 52 5' E
		İntepe	40° 00.0' N 26° 18.0' E
	Bursa	Yalova	40° 39.0' N 29° 16.2' E
		Erdek	40° 25.2' N 27° 46.8' E
		Mudanya	40° 22.2' N 28° 22.8' E
		Gemlik	40° 25.8' N 29° 09.0' E
Ege	Balıkesir	Küçükkuyu	39° 33.0' N 26° 34.8' E
		Zeytinli	39° 34.2' N 26° 43.2' E
		Edremit	39° 33.0' N 26° 34.8' E
	Manisa	Turgutlu	38° 30.0' N 27° 42.0' E
		Salihli	38° 28.2' N 28° 09.0' E
		Saruhanlı	38° 43.8' N 27° 34.2' E
	İzmir	Bornova	38° 27.0' N 27° 13.2' E
		Kemalpaşa	38° 25.2' N 27° 25.2' E
		Menemen	38° 36.0' N 27° 03.0' E
	Aydın	Çine	37° 37.2' N 28° 03.0' E
		Germencik	37° 52.2' N 27° 34.8' E
		İncirliova	37° 49.8' N 27° 42.0' E
	Muğla	Gökova	40° 46.2' N 43° 37.8' E
		Yerkesik	37° 07.8' N 28° 16.2' E
Bayır		37° 19.8' N 28° 06.0' E	

Çizelge 2.1. (devam)

Bölgeler	İller	Alt-Lokasyonlar	Koordinatlar
Akdeniz	Mersin	Silifke	39° 34.2' N 26° 43.2' E
		Tarsus	36° 55.8' N 34° 55.8' E
		Mezitli	36° 49.2' N 34° 46.2' E
	Adana	Kozan	37° 27.0' N 35° 48.0' E
		Kürkçüler	37° 16.2' N 35° 37.8' E
		Karaisalı	37° 13.8' N 35° 03.0' E
	Osmaniye	Cevdetiye	37° 07.2' N 36° 22.2' E
		Kadirli	37° 22.2' N 36° 04.2' E
		Toprakkale	37° 04.2' N 36° 07.8' E
	Hatay	Samandağ	36° 04.8' N 35° 58.8' E
		Altınözü	36° 06.0' N 36° 13.8' E
		Antakya	36° 13.2' N 39° 09.0' E
	Gaziantep	Nurdağı	37° 10.1' N 36° 44.2' E
		Zincirli	37° 07.2' N 36° 39.0' E
		Islahiye	36° 13.2' N 39° 09.0' E



Şekil 2.1. Örneklerin toplandığı illerin haritadaki dağılımı.

Örneklerin toplanması aşamasında ise, belirlenen lokasyonlardaki zeytin bahçelerindeki ağaçlardan vuruklu zeytinler toplanarak Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Biyoloji Bölümündeki laboratuara getirilmiş her bir lokasyona ait vuruklu meyveler özel kafeslerde 25°C sabit sıcaklıkta tutulmuştur (Şekil 2.2. ve Şekil 2.3.). Kafeslerden çıkan erginlerin teşhisi yapılarak etiketlenmiş ve sonraki deney aşamalarında kullanılmak üzere -80°C'de dondurularak saklanmıştır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.2. Zeytin ağaçlarından vuruklu meyvelerin toplanması.



Şekil 2.3. Laboratuara getirilen vuruksu meyvelerin yerleştirildiği kafesler.

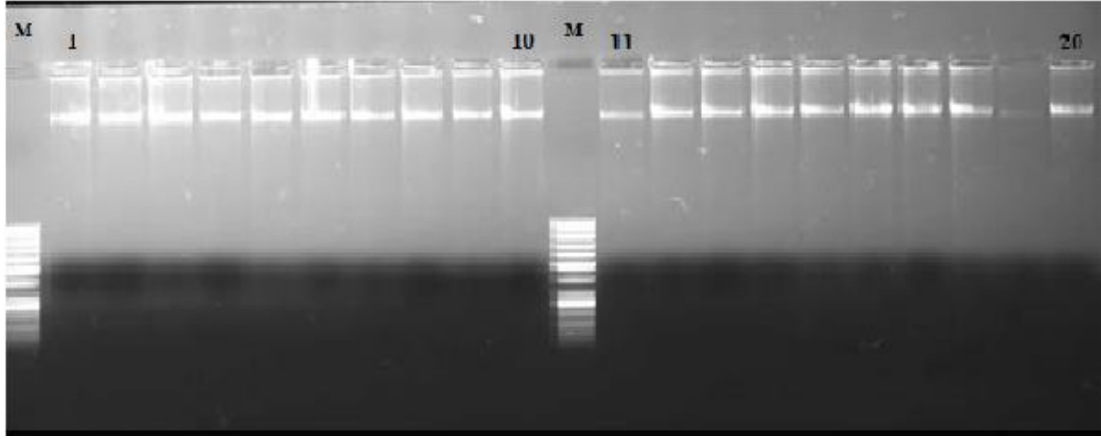


Şekil 2.4. Kafeslerden çıkan ergin bireyler.

2.2. Toplanan Örneklerden Genomik DNA İzolasyonu

On iki ilde 38 lokasyondan toplanan zeytin sineği örneklerinden DNA izolasyonu, Bender vd. (1983) tarafından yapılan lifton metodunda bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu metoda göre DNA izolasyonu aşağıdaki basamaklar uygulanarak gerçekleştirilmiştir;

- Otoklavlanmış eppendorf tüpe alınan birey, üzerine 200 µl lifton tampon çözeltisi (0.1M Tris-HCl, 0.05M EDTA, pH 9.1) ve 50 µl % 0.5'lik SDS eklenerek homojenize edilmiştir.
- Su banyosunda 65 °C'de 30 dakika inkübasyonu takiben üzerine 1 µl Proteinaz K (Fermentas) (20 mg/ml) eklenerek 37° C' de 30 dakika tekrar inkübasyona bırakılmıştır.
- Daha sonra 250 µl 0.6 M sodyum asetat eklenerek 1 saat boyunca buz içerisinde bekletilmiştir.
- Buzdan alınan örnek 14.000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek sıvı olan üst faz dipteki kalıntılardan dikkatli bir şekilde ayrılarak başka bir tüpe alınmıştır.
- Üzerine 250 µl fenol ve 1 damla kloroform: izoamilalkol (24:1) eklenerek 14.000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
- Yine üst faz ayrı bir tüpe alınarak üzerine 125 µl fenol ve 125 µl kloroform: izoamilalkol eklenerek tekrar 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.
- Üst faz yine ayrı bir tüpe alınarak üzerine bu kez 250 µl kloroform: izoamilalkol eklenmiş ve 14.000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjlenmiştir.
- Üstteki faz tekrar başka bir tüpe aktarılarak içerisine 1 µl RNaz (Fermentas) (500U/ml) eklenerek 37° C' de 30 dakika süresince inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra örneklere 500 µl % 96'lık etanol eklenerek 14.000 rpm'de 30 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
- Daha sonra %96'lık etanol uzaklaştırılmış ve üzerine 500 µl % 80'lik etanol eklenerek tekrar 14.000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve bu işlem sonunda alkolün oluşan pelletten uzaklaştırılması amacı ile kurumaya bırakılmıştır.
- Son olarak, pellet 30 µl otoklavlanmış dH₂O'da çözünerek bir gece +4° C' de bekletilmiştir. Örnekler % 1'lik agaroz jelde yürütülerek elde edilen DNA'lar kalite ve yaklaşık miktar bakımından kontrol edilmiştir (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Eceabat ve Samandağ bölgelerinden toplanan örneklerden izole edilen genomik DNA'lar. M: 1 Kb DNA Marker (DNA işaretleyici) Fermantas, 1-10 Eceabat, 11-20 Samandağ.

2.3. Populasyonlardaki Genetik Çeşitliliğin Mikrosatellit Belirteçleri Yardımı ile Belirlenmesi

Populasyonlardaki genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacı ile her lokasyondan 10 adet birey olmak üzere toplam 380 birey 12 adet polimorfik mikrosatellit belirteci kullanılarak taranmıştır. Kullanılan mikrosatellit primer dizileri ve uzunluk aralıkları Çizelge 2.2.' de sunulmuştur. Örnekler 3 farklı okuma grubu şeklinde okutulmuştur. Her bir grupta farklı bant uzunlukları veren 4 farklı mikrosatellit belirteci seçilmiş ve bunlar 3 farklı boya (FAM6, NED ve HEX) ile işaretlenerek okumalar yapılmıştır.

Çizelge 2.2. Çalışmamızda kullandığımız mikrosatellit lokusları.

Lokus / İşaretleme	Tekrar motifi*	Primer dizileri (5'-3')	Uzunluk aralığı	Referans
Bo-D37- 5'ucu FAM6	(CA) ₇ CG(CA) ₃	F: ATAGGCATTGGCAGCGAAG R: CACAGTGGGCCGAAATCAC	172-182	Augustinos vd. (2002)
Bo-D42 - 5'ucu NED	(CA) ₁₀ GA(CA) ₂	F: CAGAGCATCTCGCTTTGG R: TCAACAATCCCAGCAAAAATC	136-172	Augustinos vd. (2005)
Bo-D51 - 5'ucu HEX	(GT) ₁₂	F: TGGAATGCGCTATTTTGTG R: ACTCGTATATACGTACATGG	140-170	Augustinos vd. (2005)
Bo-D52 - 5'ucu FAM6	(GA) ₁₄	F: CGACTTGAAGGACAATTGG R: GGC GTGAGTAGTTTCTATAAGC	111-130	Augustinos vd. (2002)
Bomic15 - 5'ucu FAM6	(AC) ₈	F: CAGCCAACCAGTCAACC R: GTTTGGCTGAAATGGCAGTCC	118-142	Nardi vd. (2005)
Bo-D49 - 5'ucu FAM6	(GT) ₁₃	F: TCGCCTCTTACCTCACAACC R: ACCATCCTTAGTCAGCACAGTC	157-185	Augustinos vd. (2005)

Çizelge 2.2. (devam)

Lokus / İşaretleme	Tekrar motifi*	Primer dizileri (5'-3')	Uzunluk aralığı	Referans
Bo-D54 - 5'ucu NED	(GT) ₁₇	F: CTGACTTCTTGCTTTACACG R: CAGCTTATCTGCTTTAAGTGC	125-153	Augustinos vd. (2002)
Bo-D48 - 5'ucu HEX	(CA) ₁₃	F: GCCATGAATGCAGACCAC R: CCTATTCAAATGCACGCAAAAC	153-165	Augustinos vd. (2005)
Boms59 - 5'ucu FAM6	TGTA(TG) ₁₀	F:AGCGTTACATAAAATATAGCTAC R: TCCCGTAAAGCCATAAAGTC	158-174	Augustinos vd. (2005)
Boms61 - 5'ucu FAM6	(A) ₁₁ (CA) ₁₁ (CA TCACA) ₄ (GA) ₂ (GA) ₈	F: ACTGAAATGCAGCTTATTGGC R: ATGAAGCGACTGGCAGCAG	175-187	Augustinos vd. (2005)
Bo-D53 - 5'ucu NED	(GT) ₁₀	F: TGAAGGTGATGAATGAAAGC R: GGAATGACTGTGAGCAAGC	143-163	Augustinos vd. (2005)
Boms31 - 5'ucu HEX	(GT) ₄ (GCGT) ₆ (GCGT) ₂	F: TGCTTGAGTTGCTCGTTGG R: GCCGCATGACATAAAGAATCG	144-170	Augustinos vd. (2005)

2.3.1. PCR şartları

DNA bölgelerinin çoğaltılması aşaması Augustinos vd. (2002) ile Nardi vd. (2005)'nin yapmış oldukları PCR reaksiyon şartlarında bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 12 primer çifti için Çizelge 2.3.' de verilen PCR reaksiyon karışımı uygulanmıştır.

PCR reaksiyonlarımız Eppendorf Mastercycler Gradient Thermalcycler'da (Şekil 2.6.) gerçekleştirilmiş olup;

Bomic15, Bo-D49, Bo-D54, Bo-D48, Boms59, Boms61, Bo-D53 ve Boms31 primerleri için;

İlk Denatürasyon	95 °C' de 3 dk	} 35 döngü
Denatürasyon	95 °C' de 1 dk	
Bağlanma	52 °C' de 1 dk	
Uzama	72 °C' de 1 dk	
Son Uzama	72 °C' de 10 dk	
	+4 °C	

Bo-D37, Bo-D42, Bo-D51, Bo-D52 primerleri için;

İlk Denatürasyon	95 °C' de	3 dk	} 35 döngü
Denatürasyon	95 °C' de	1 dk	
Bağlanma	51 °C' de	1 dk	
Uzama	72 °C' de	1 dk	
Son Uzama	72 °C' de	10 dk	
	+4 °C		

olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.3. PCR bileşenlerinin konsantrasyonu ve miktarları.

PCR Bileşenleri	
ddH ₂ O	4,66 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
PCR Tamponu (10X)	1 µl
Taq polimeraz (1ünite) (Fermentas)	0,4 µl
DNA (10 ng/ml)	1 µl
Primer ₁ ve primer ₂ (50 pmol)	0,3 µl
MgCl ₂ (1.5mM)	0,64 µl
Toplam reaksiyon hacmi	10 µl

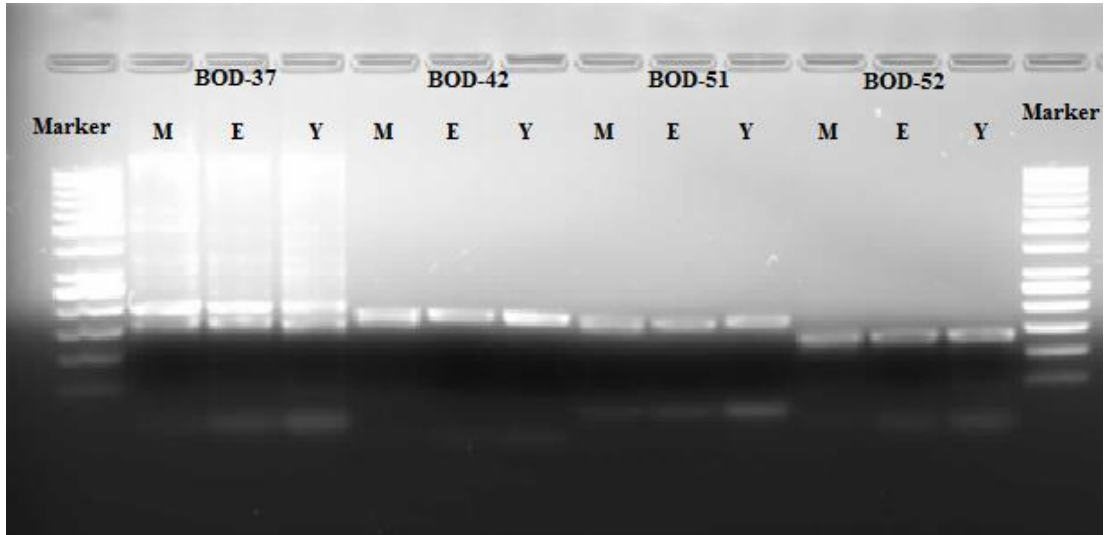


Şekil 2.6. Çalışmada kullanılan PCR cihazları.

Elde edilen PCR ürünler miktar ve kalite açısından kontrol edilmek amacıyla % 2' lik agaroz jelde 1 µl ürün, 1µl boya karıştırılarak 80 Volt sabit akımda yürütülerek jel görüntüleme cihazında görüntülenmiştir (Şekil 2.7. ve Şekil 2.8.). Daha sonra HEX, NED ve FAM6 boyları ile işaretlenmiş 4 farklı primer çifti ile çoğaltılan her bir bireye ait ürünler tek bir tüpte birleştirilmiş ve bant uzunluklarının belirlenmesi amacı ile ilgili firmaya gönderilmiştir.



Şekil 2.7. Çalışmada kullanılan elektroforez jel sisteminin görünümü.



Şekil 2.8. Bo-D37, Bo-D42, Bo-D51 ve Bo-D52 numaraları primer çiftleri kullanılarak Mudanya(M)- Erdek(E) ve Yalova(Y) örneklerinden elde edilen PCR ürünlerine ait bant görünümleri M: 50 bp DNA Marker (DNA işaretleyici) Fermantas.

2.4. Mitokondriyal DNA Haplotiplerin Belirlenmesi

Mitokondriyal haplotiplerin belirlenmesi amacıyla her lokasyondan 7 adet birey olacak şekilde toplam 266 bireyde mtDNA NADH geninin polimorfik olan 574 bç'lik bölgesi Nardi vd. (2005) tarafından uygulanan şartlar izlenerek çoğaltılmıştır. Ancak, kullanılan primer çiftinin (BoND1F: 5'-TTTAGTTGCTTGGTTGTGTATTCC-3' ve BoND1R: 5'-GAAAAAGGTAAAAACTCTTTCAAGC-3') baz dizi analizleri sırasında yeterince verimli çalışmaması üzerine Gen Bankasından bu organizmaya ait tam mitokondriyal genom dizisine ulaşılmış (Erişim numarası: AY210703) ve çoğaltılacak bölgenin dış uçlarına yakın iki bölgeden iki yeni primer dizisi (BoND3EDF: 5'AGTCAATGAGCTTGAACAAGCATGTG-3' ve BoND4EDR: 5'AGGTATTCCTCAACCTTTTTGTGAC-3') dizayn edilerek kullanılmıştır.

PCR reaksiyonlarımız Eppendorf Mastercycler Gradient Thermalcycler'da (Şekil 2.6.) gerçekleştirilmiş olup ilgili bölge BoND3EDF ve BoND4EDR primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır.

Reaksiyon döngü koşulları;

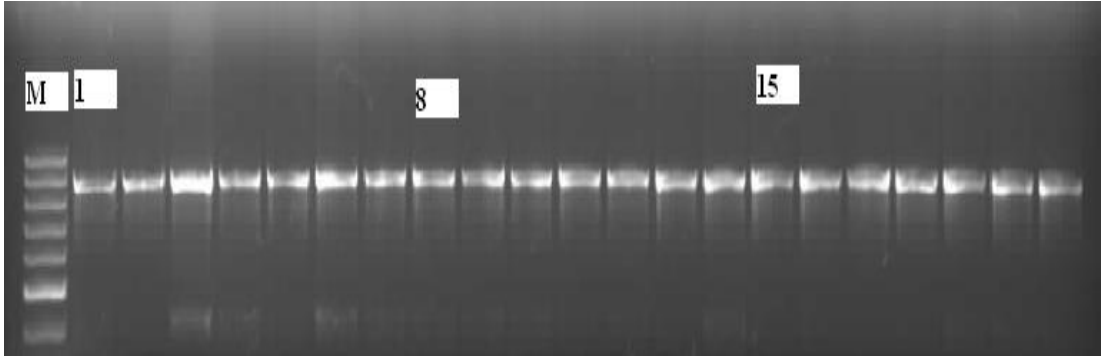
İlk Denatürasyon	94 °C' de 5 dk	
Denatürasyon	94 °C' de 1 dk	} 35 döngü
Bağlanma	59 °C' de 1 dk 10 sn.	
Uzama	72 °C' de 1 dk 30 sn.	
Son Uzama	72 °C' de 10 dk	
	+4 °C	

olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR bileşenlerinin konsantrasyonları ve miktarları Çizelge 2.4.'te sunulmuştur.

Çizelge 2.4. mtDNA ND1 bölgesinin çoğaltılması sırasında kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyon ve miktarları.

PCR Bileşenleri	
ddH ₂ O	11,8 µl
dNTP (10 mM)	5 µl
PCR Tamponu (10X)	2.5 µl
Taq polimeraz (1ünite) (Fermentas)	0,2 µl
Genom DNA (10 ng/ml)	1 µl
Primer ₁ ve primer ₂ (50 pmol)	1,25 µl
MgCl ₂ (1.5mM)	2 µl
Toplam reaksiyon hacmi	25 µl

Elde edilen PCR ürünler yaklaşık miktar ve kalite açısından kontrol edilmek amacıyla % 1.2' lik agaroz jelde 1 µl ürün, 1µl boya karıştırılarak 80 Volt sabit akımda yürütülmüş görüntüleme cihazında görüntülenmiştir (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. BoND3EDF ve BoND4EDR primerleri kullanılarak Antakya Merkez (1-7), Altınözü (8-14) ve Samandağ (15-21) örneklerinden elde edilen PZR ürünlerine ait yaklaşık 900bp'lik DNA bant görünüşleri. M: 100 bp DNA Marker (DNA işaretleyici) Fermentas.

Daha sonra elde edilen ürünün tamamı % 1.2' lik agaroz jelde yürütüldükten sonra jelden dikkatlice kesilmiş ve “QIAGEN” marka jelden DNA izolasyon kiti vasıtası ile izole edilmiştir. Jelden izolasyon basamakları şu şekilde gerçekleştirilmiştir;

- Jelden kesilen ürünler, darası alınan eppendorf tüpe alınarak tartılır.
- Daha sonra tüplere, tartılan miktarın 3 katı kadar QG buffer eklenerek 50 °C'de 10 dk inkübe edilir.
- Tüplere tartım miktarı kadar izopropanol eklenir.
- Örnekler 13.000 rpm'de 1 dk santrifüjlendikten sonra, 500 µl QG buffer eklenerek yeniden 13.000 rpm'de 1 dk santrifüjlenir.

- Tüplere 750 µl PE buffer eklenerek 2 dk. inkübe edilir. Daha sonra ard arda iki kez 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılır.
- Son olarak 32 µl otoklavlanmış dH₂O ilave edilerek 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılır.

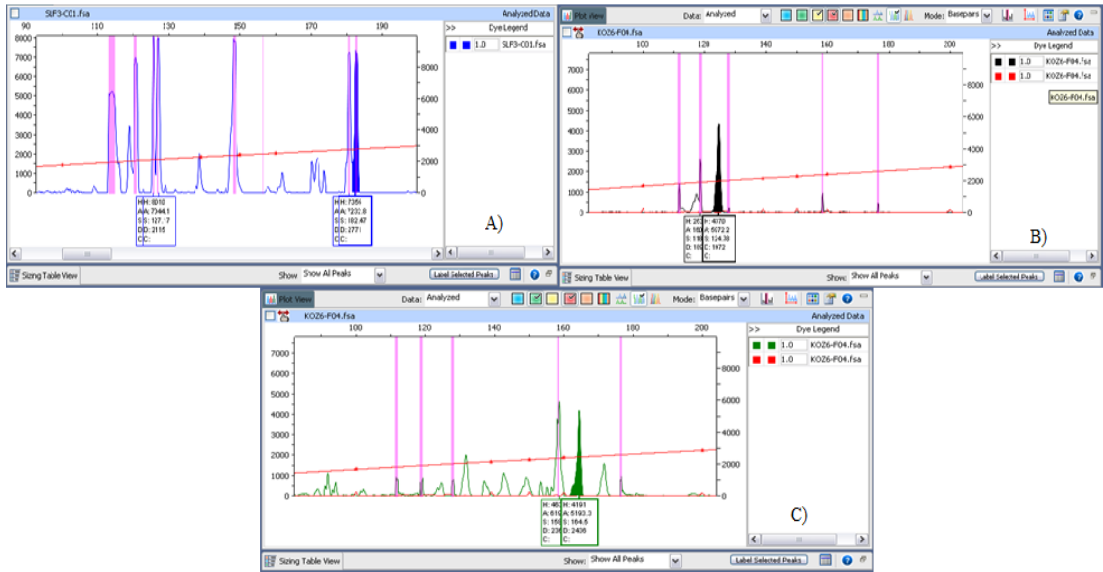
Jelden izolasyon sonucunda elde edilen ürünlerin miktar tayini spektrofotometrede yapılarak baz dizi analizi yaptırılmak üzere ilgili firmaya gönderilmiştir. Her bir örnekte baz dizi analizi BoND1F ve BoND4EDR primerleri ile iki yönlü okumalarla yaptırılmıştır.

2.5. Verilerin Analizi

2.5.1. Mikrosatellit verilerinin analizi

ABI PRISM 3100 cihazında okunan ve tarafımıza gönderilen bant uzunluklarının değerlendirilmeleri Applied Biosystems Peak Scanner programı kullanılarak yapılmıştır (Şekil 2.10. a,b,c). Genotiplerin belirlenmesi özetle şu şekilde gerçekleştirilmiştir; Peak Scanner programında açılan dosyalar tüm bireylerde, her bir mikrosatellit primeri için aralıkta gözlenen en yüksek tepe (peak) değerleri okunarak excel dosyasına kaydedilmiştir. Populasyonlar arası genetik varyasyonu belirlemek amacıyla lokus başına ortalama allel sayısı (n_a), efektif allel sayısı (n_e), gözlenen (H_o) ve beklenen (H_e) heterozigotluk değerleri POPGENE (Yeh ve ark, 1999) versiyon1.31 kullanılarak belirlenmiştir. Yine aynı program kullanılarak Nei'ye göre genetik uzaklık değerleri ve Bonferroni düzeltmesinin ardından populasyonların ki-kare (χ^2) ve olasılık oranı (G^2) değerleri elde edilmek suretiyle Hardy-Weinberg eşitliğinden (HWE) sapma olup olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Lokuslar arası bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) ise POPGENE (Yeh ve ark, 1999) ve GENETIX (Belkhir vd. 2004) programları kullanarak test edilmiştir. Faktoriyal Korrespondans analizi GENETIX (Belkhir vd. 2004) programı kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik ağaç (dendogram) Neighbour-Joining metodu ile POPULATIONS programı versiyon 1.2.29 (Langella, 1999) kullanılarak oluşturulmuştur (100 bootstrapli) ve daha sonra Treewiew programı ile görsel hale getirilmiştir. Moleküler Varyans Analizi (AMOVA) ARLEQUIN (Excoffier vd.

2005) versiyon 3.5 programı kullanılarak 2 farklı populasyon kümelenmesi (doğu-batı) açısından gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, populasyonlara ait bireylerin herhangi bir gruplandırma gösterip göstermediği ise STRUCTURE programı (Falush vd. 2003; Pritchard vd. 2000) ile test edilmiştir. Populasyonlar arasında genetik uzaklıkla coğrafik uzaklık arasında bir korelasyon olup olmadığı sonucuna (uzaklıkla izolasyon) Mantel testi yapılmak suretiyle ulaşılmıştır. Lokasyonlar arasında coğrafik uzaklık www.googleearth.com sitesinden alınmıştır. Allelik zenginlik (AR) ve populasyonlar arası genetik farklılaşma değeri (F_{st}) FSTAT (Goudet J. 2002) versiyon 2.9.3 programı ile elde edilmiştir. Populasyonlar arasındaki gen akış düzeyi (N_{em}) POPGENE (Yeh ve ark, 1999) programı kullanılarak tespit edilmiştir. Son olarak populasyonların darboğaza girip girmedikleri BOOTLENECK programı (Cournet ve Luikart, 1997) kullanılarak test edilmiştir. Buna göre populasyonlardan elde edilen allel frekansı sıklığı ve allel frekansı değerleri excel programına taşınmış ve dağılım grafiği elde edilmiştir.

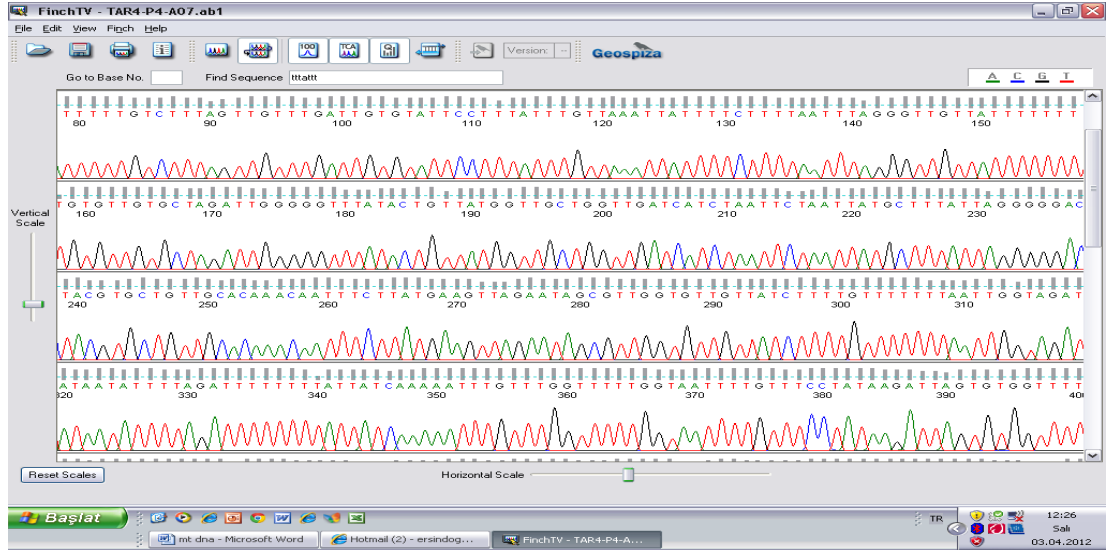


Şekil 2.10. Elde edilen mikrosatellit bantlarının Applied Biosystems Peak Scanner programındaki görünümü. a) FAM6 b) NED c) HEX boyası ile işaretlemiş primerlere ait bant uzunlukları.

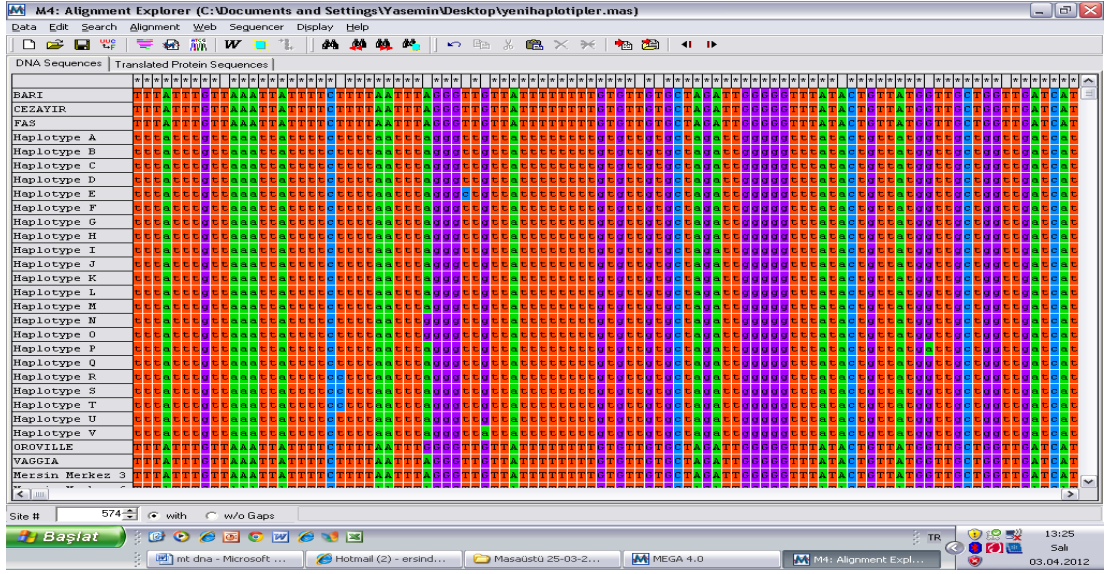
2.5.2. Mitokondriyal DNA haplotiplerinin belirlenmesi

ABI formatlı kromatogram dosyası formatında tarafımıza gönderilen diziler ilk olarak FinchTV programında açılarak (Şekil 2.11.) görsel olarak incelenmiştir. Elde edilen DNA baz dizilerinden öncelikle baz dizi analizi için kullandığımız primer

dizileri çıkarılarak istenilen bölge MEGA5 paket programı (Tamura vd. 2011) içerisinde bulunan CLUSTALW kullanılarak sıraya (alignment) dizilmiştir (Şekil 2.12.). Populasyonlardaki haplotip sayısı, çeşitliliği, dağılımı, haplotiplerdeki nükleotid çeşitliliği DNAsp (ver. 5.0) (Librado ve Rozas 2009) programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen haplotipler arasındaki evrimsel ilişkileri görsel hale getirip irdelemek amacıyla Nardi vd. (2005) yılında, Pakistan, Afrika, Avrupa (Akdeniz havzası) ve Amerika'dan olmak üzere toplam 14 değişik bölgeden toplamış oldukları zeytin sineği örneklerinden üzerinde çalıştığımız bölgeye ait mtDNA haplotipleri (GenBank erişim numaraları AY998304-AY998325 ve GU108459-GU108478) ile birleştirilerek median-joining NETWORK analizi yapılmıştır (ver. 4.6, Bandelt vd. 1999; Polzin ve Daneschmand 2003).



Şekil 2.11. Örneklerden elde edilen baz dizileri FinchTV programında açılarak görsel olarak kontrol edilmiştir.



Şekil 2.12. Örneklerden elde edilen baz dizileri MEGA programında alt alta dizilerek evrimsel analizler sırasında kullanılmak üzere hazır hale getirilmişlerdir.

3. BULGULAR VE İRDELEME

Türkiye’de zeytin sineği popülasyonlarının kolonizasyon sürecini ve bu popülasyonlardaki genetik çeşitliliğin anlaşılabilmesi için, nükleer DNA (mikrosatellit) ve mitokondriyal belirteçler kullanılmak suretiyle doğal zeytin sineği popülasyonlarının genetik yapıları incelenmiştir.

3.1. Mikrosatellit Çeşitliliği

Oniki ile ait 38 alt lokasyondan toplanan 380 adet sineğin 12 mikrosatellit lokusuna dayalı analiz sonucunda oldukça yüksek varyasyon olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.1.). Buna göre; lokus başına ortalama allel sayısı ortalama 13.92 ± 4.94 olarak bulunmuştur ve bu sonuç bize çalışılan popülasyonlarda yüksek seviyede mikrosatellit çeşitliliğini işaret etmektedir. En fazla allel sayısı 23 ile BoD54 lokusunda, en az allel sayısı ise 5 olarak Boms61 lokusunda gözlenmiştir. Ortalama efektif allel sayısı ise 4.48 ± 1.14 olarak bulunmuş olup, en yüksek değer ise 7.63 ile Bomic15 lokusunda en düşük değer ise 3.34 ile BoD37 lokusunda gözlenmiştir. Çeşitlilik, heterozigotluk derecelerine uygun olarak belirlenmiştir. Tüm lokuslar için ortalama gözlenen (H_o) ve beklenen (H_e) heterozigotluk değerleri sırasıyla 0.78 ± 0.08 ve 0.77 ± 0.05 olarak bulunmuştur. H_o değeri 0.69 (Boms61 ve BoD53) ile 0.91 (Bomic15) arasında; H_e değeri ise 0.70 (BoD37) ile 0.87 (Bomic15) arasında gözlenmiştir. Her bir lokus için popülasyonlara göre mikrosatellit allellerinin coğrafik dağılımları da belirlenmiştir. Tüm popülasyonlarda belirlenen allellerin sayısı 4 ila 16 arasında değişmektedir. En yüksek sayıda özel allel (private allel) (> 5) BoD51 lokusunda gözlenmiştir. BoD48 ve Boms61 lokuslarında ise özel allel gözlenmemiştir. Özel allellerin çok düşük frekanslarda gözlemlenmesinden dolayı popülasyonlar arası genetik çeşitliliğin belirlenmesine yönelik çalışmalarda belirteç olarak kullanılma ihtimalleri düşüktür.

Çizelge 3.1. Türkiye’deki zeytin sineği örneklerinin lokus bazında mikrosatellit çeşitliliği. N: Örnek sayısı, n_a : Ortalama allel sayısı, n_e : Ortalama etkili allel sayısı, H_o : Gözlenen heterozigotluk, H_e : Beklenen heterozigotluk.

Lokus	N	n_a	n_e	H_o	H_e
Bo-D52	374	15.00	5.13	0.82	0.81
Bo-D37	374	11.00	3.34	0.74	0.70
Bo-D42	374	17.00	4.42	0.77	0.77
Bo-D51	373	17.00	4.16	0.70	0.76
Bomic15	363	18.00	7.63	0.91	0.87
Bo-D49	363	18.00	5.12	0.90	0.81
Bo-D54	363	23.00	3.82	0.72	0.74
Bo-D48	360	11.00	4.36	0.79	0.77
Boms59	373	11.00	3.89	0.81	0.74
Boms61	373	5.00	3.97	0.69	0.75
Bo-D53	369	9.00	3.48	0.69	0.71
Boms31	372	12.00	4.50	0.78	0.78
Ortalama	369	13.92	4.48	0.78	0.77
Standart Sapma		4.94	1.14	0.08	0.05

Bonferroni düzeltmesinin ardından (Rice, 1989), taranan mikrosatellit primerleri açısından çalışılan bütün popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı, %5 güven aralığı kullanılarak, hem χ^2 hem de G^2 analizleri kullanılarak test edilmiş ve bütün popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olduğu bulunmuştur. Popülasyonlar arası ortalama genetik farklılaşma değeri, $F_{st}=0.03$ olarak bulunmuştur ki bu durum, Wright (1978)’e göre, çalıştığımız popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın çok az olduğu sonucuna işaret etmektedir. Popülasyonlar arası ortalama gen akış miktarı, N_{em} , ise 8.36 olarak bulunmuştur [$N_{em}=(1-F_{st}) / 4F_{st}$]. Bununla birlikte tüm lokuslardaki genotipler arasında

istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir bağlantı dengesizliği (Linkage-disequilibrium) gözlenmemiştir ve tümü bağımsız olarak dikkate alınmıştır.

Çizelge 3.2., oniki lokusa göre analizi yapılan oniki zeytin sineği popülasyonundaki toplam çeşitlilik seviyelerini göstermektedir. Ortalama allel sayısı (n_a) 7.58 (Adana) ile 9.50 (Mersin) arasında ve allelik zenginlik (AR) 7.05 (Bursa) ile 8.88 (Mersin) arasında değerler sergilemiştir. Ortalama gözlenen (H_o) ve beklenen (H_e) heterozigotluk değerleri dikkate alındığında, genetik çeşitlilik farklı popülasyonlar arasında homojen bir şekilde dağılıyor gibi görülmektedir. Gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerleri sırasıyla 0.75 (Muğla) ile 0.82 (Aydın) arasında ve 0.74 (Bursa, Manisa, and Adana) ile 0.78 (Mersin, Osmaniye ve Gaziantep) arasında gözlenmiştir. Bununla birlikte, iki bölge arasında; ortalama efektif allel (n_e), özel alleller (n_p) ve özel allel frekansları (A_p) istatistiki olarak anlamlı bulunmuşlardır ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test). Sonuçlar Ege popülasyonları için: $n_e = 4.01$, $n_p = 1$, $A_p = 0.01$ ve Akdeniz popülasyonları içinde: $n_e = 4.36$, $n_p = 3.4$, $A_p = 0.03$ şeklindedir. Toplamda düşük frekansı olan 24 yeni özel allel bulunmuştur ve bunlardan 17 tanesi Akdeniz bölgesinden örneklenen popülasyonlara aittir. Özel allel sayısının örneklem büyüklüğüne bağlı olduğu bildirilmekle birlikte (Slatkin, 1985; Nei, 1987), Bursa, Çanakkale ve Manisa popülasyonlarında özel allel bulunamamıştır. Çalışılan popülasyonlar arasında Mersin popülasyonu ortalama allel, ortalama etkili allel, allelik zenginlik, yüksek frekanslı özel allel (≥ 0.04), ve beklenen heterozigotluk değerleri açısından en yüksek seviye genetik çeşitlilik sergilemiştir. Diğer popülasyonlarla karşılaştırıldığında ise Bursa popülasyonunda düşük varyasyon değerleri gözlenmiştir.

Çizelge 3.2. Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan zeytin sineği örneklerindeki genetik çeşitlilik. N: Örnek sayısı, n_a : Ortalama allel sayısı, AR: Allelik zenginlik, n_e : Ortalama etkili allel sayısı, n_p : Özel allel sayısı A_p : Özel allel frekansı, H_o : Gözlenen heterozigotluk, H_e : Beklenen heterozigotluk, ns, İstatistiki olarak önemli değil; *, İstatistiki olarak önemli $P < 0.05$.

Bölgeler	Lokasyonlar	N	n_a	AR	n_e	n_p	A_p	H_o	H_e	
Ege	Çanakkale	40	8.00	7.14	3.98	0	0	0.76	0.75	
	Bursa	40	8.00	7.05	3.91	0	0	0.76	0.74	
	Balıkesir	30	8.00	7.58	3.99	3	0.03	0.78	0.75	
	Manisa	30	8.08	7.64	3.92	0	0	0.78	0.74	
	İzmir	30	8.25	7.81	3.91	1	0.01	0.78	0.75	
	Aydın	30	8.25	7.86	4.25	1	0.01	0.82	0.77	
	Muğla	30	7.75	7.50	4.13	2	0.02	0.75	0.76	
	Ortalama			8.05	7.51	4.01	1	0.01	0.78	0.75
Akdeniz	Mersin	30	9.50	8.88	4.71	5	0.04	0.79	0.78	
	Adana	30	7.58	7.20	3.93	3	0.03	0.77	0.74	
	Osmaniye	30	9.00	8.44	4.48	3	0.03	0.77	0.78	
	Hatay	30	8.00	7.52	4.22	3	0.03	0.77	0.76	
	Gaziantep	30	9.00	8.42	4.49	3	0.02	0.80	0.78	
	Ortalama			8.61	8.09	4.36	3.4	0.03	0.78	0.77
	İstatistiki Önem Testi			ns	ns	*	*	*	ns	ns

Popülasyonlar arasındaki genetik ilişkiler F_{ST} değerlerin karşılaştırılması vasıtasıyla belirlenmiştir (Çizelge 3.3.). F_{ST} değerleri -0.00197 (Muğla-Çanakkale arasında) ile 0.05146 (Aydın-Adana arasında) arasında değişmiştir. Tüm örnekler arasında F_{ST} değerlerinin istatistiki analizi, çalışılan popülasyonların muhtemel 2 alt gruba

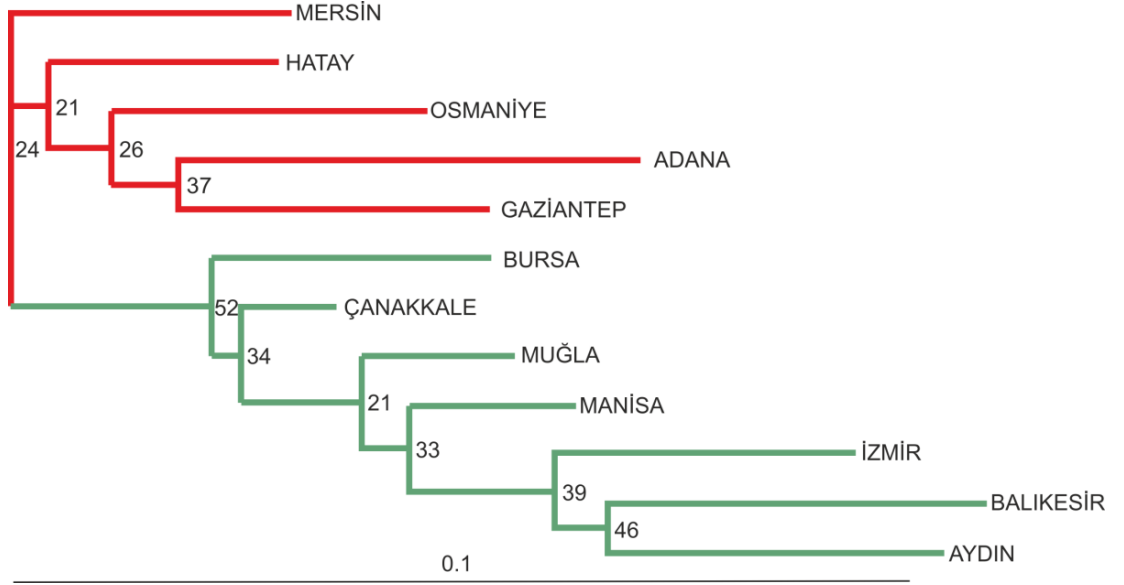
ayrıldığı sonucunu göstermiştir. Farklı önem dereceleri olmakla birlikte Akdeniz popülasyonları Ege bölgesi popülasyonlarından anlamlı bir şekilde farklı görünmektedir. Bununla birlikte bölgeler içindeki genetik farklılaşma değeri düşük bulunmuştur. Bu düşük farklılaşma, düzgün topografi, kesintisiz devam eden dikim alanları ve bu bölgelerdeki iller arasında gerçekleşen yoğun zeytin ticareti ile açıklanabilir.

Akdeniz ve Ege popülasyonları arasındaki genetik varyasyon dikkate alınmak suretiyle 2 ana coğrafik grubu içeren popülasyonlar ayrılarak data analizi yapılmış ve bunun sonucunda da F_{ST} değeri 0.01379 ($P < 0.001$) olarak bulunmuştur. Bu iki coğrafik bölge arasındaki uzaklık 700 kilometreden daha fazladır. Bu uzaklık dikkate alındığında Türkiye'deki zeytin sineği popülasyonları için gen akış düzeyi, bu organizmanın genetik yapısını etkileyen önemli bir faktör olarak nitelendirilebilir.

Çizelge 3.3. Zeytin sineği popülasyonları arasındaki F_{ST} değerleri ve bu değerlere göre popülasyon farklılaşmalarının önem dereceleri. *P < 0.05; **P < 0.001; *P < 0.0001.**

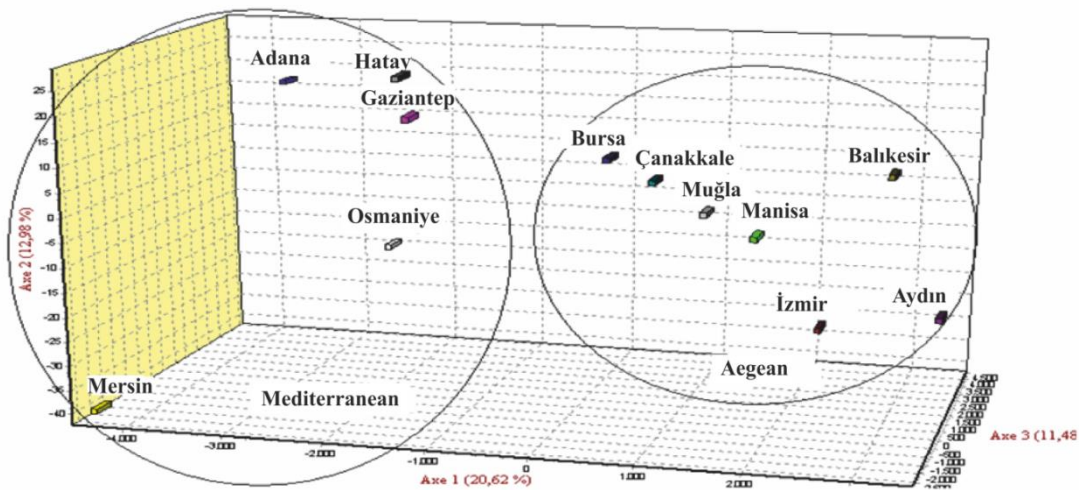
Bölgeler	Popülasyonlar	Çanakkale	Bursa	Balıkesir	Manisa	İzmir	Aydın	Muğla	Mersin	Adana	Osmaniye	Hatay	Gaziantep
Ege	Çanakkale	---											
	Bursa	0.00345	---										
	Balıkesir	0.00442	0.01827***	---									
	Manisa	0.00162	0.0102	0.01388	---								
	İzmir	0.00972*	0.02423**	0.01293*	0.00353	---							
	Aydın	0.0086**	0.01947***	0.00819	0.00947	0.00509	---						
	Muğla	-0.00197	0.00121	0.00222	-0.0039	0.00441	0.00286	---					
Akdeniz	Mersin	0.00324*	0.01004*	0.0273***	0.01444*	0.02049**	0.03082***	0.00277	---				
	Adana	0.0233***	0.03339***	0.05037***	0.03281***	0.04616***	0.05146***	0.02965***	0.01244	---			
	Osmaniye	0.01357*	0.0242**	0.033***	0.01697	0.02075*	0.02151**	0.00792	0.00519	0.01362	---		
	Hatay	0.01024*	0.0084	0.03237***	0.01796*	0.02742**	0.02914***	0.00694*	0.00396	0.01742***	0.00448	---	
	Gaziantep	0.0059	0.01647***	0.02358***	0.01226	0.01789**	0.01635**	0.00041	0.00863	0.01126	0.00763	0.00798	---

12 popülasyona ait genetik uzaklığa dayalı oluşturulan Neighbor Joining (NJ) ağacı Şekil 3.1.'de sunulmuştur. Her ne kadar dalların birçoğu düşük bootstrap değerlerine sahip olmalarına rağmen elde edilen ağaçta Akdeniz ve Ege popülasyonlarının iki ana grupta toplandıkları gözlenmiştir.



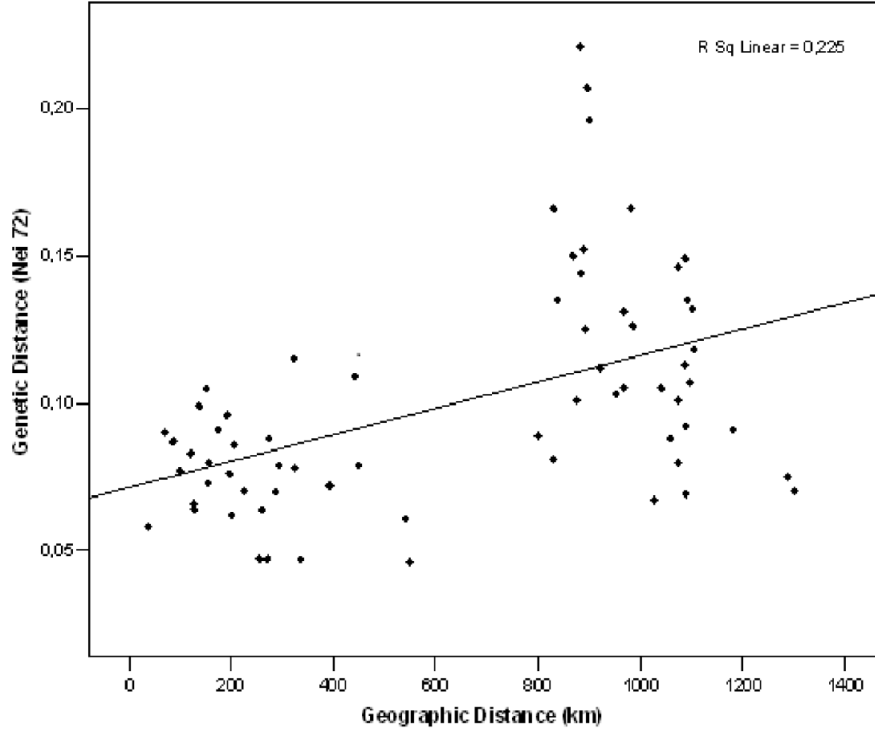
Şekil 3.1. Çalışılan 12 ile ait Neighbor Joining (NJ) dendrogramı.

Türkiye'deki zeytin sineği popülasyonlarının genetik yapısını analiz etmek için Faktöriyel Korrespondans Analizi (FCA) gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucunda da köksüz NJ ağacında gözlenen gruplara (Akdeniz ve Ege) benzer bir topoloji elde edilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Faktöriyel Korrespondans analizinde 12 ile ait gruplanmanın 3 boyutta gösterimi.

Mikrosatellit belirteçleri kullanılarak Mantel testi gerçekleştirilmiş ve çalışılan popülasyonlar arasında uzaklıkla orantılı bir izolasyon olup olmadığı analiz edilmiştir (Şekil 3.3.). Sonuçlar genetik ve coğrafik uzaklık arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Spearman Rank korelasyon katsayısı = 0.4738; Mantel P < 0.002).



Regions	Location	Distance (Km)
Mediterranean	Gaziantep	0
	Osmaniye	137
	Hatay	188
	Adana	223
	Mersin	302
Aegean	Bursa	1071
	Manisa	1091
	İzmir	1116
	Aydın	1131
	Muğla	1132
	Balıkesir	1233
	Çanakkale	1349

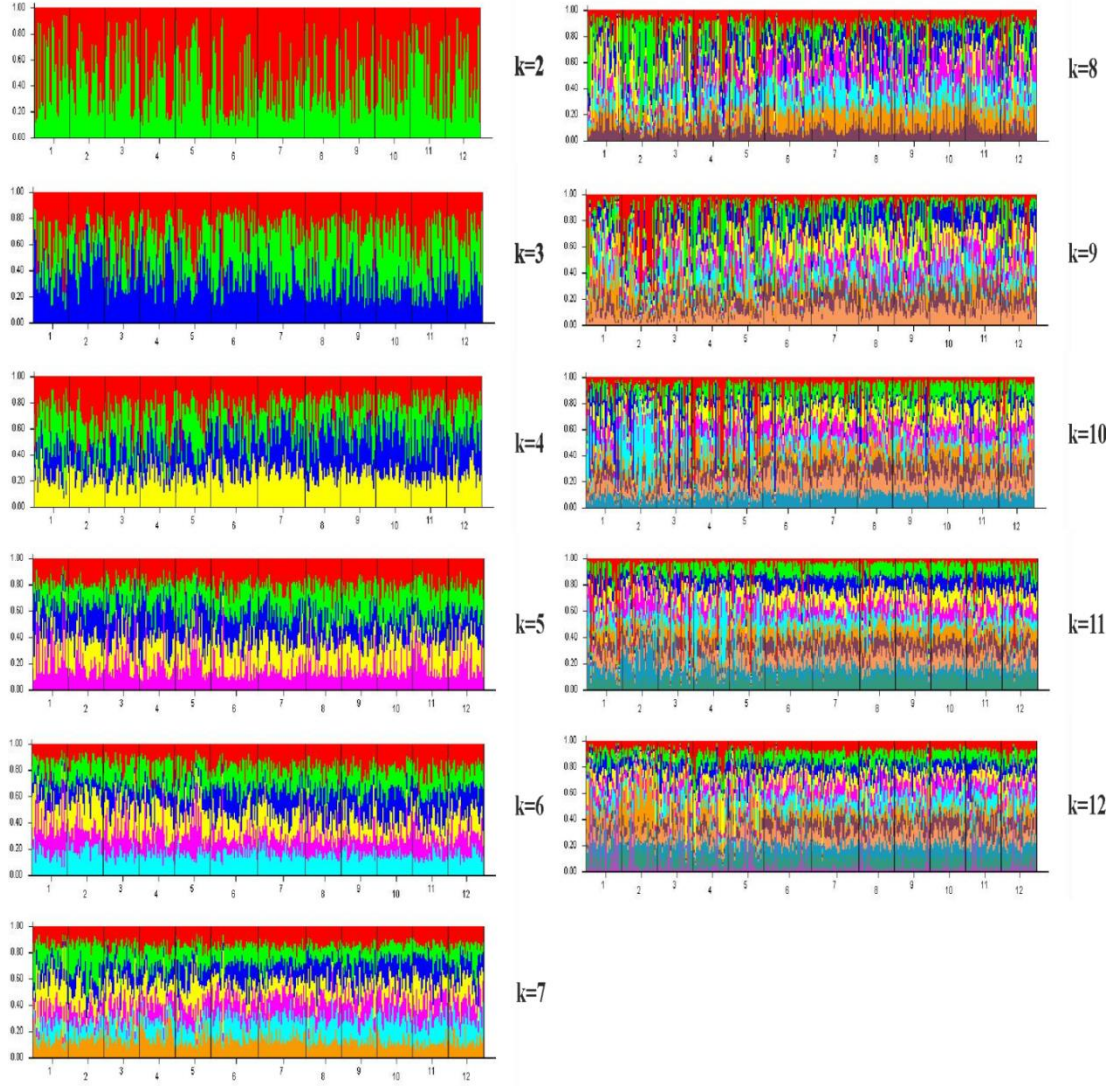
Şekil 3.3. Genetik uzaklık değerleri ve popülasyonların coğrafik uzaklıkları (km) arasındaki korelasyonu gösteren grafik.

Popülasyonlar arasındaki homojenite testi AMOVA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda popülasyonlar NJ dendrogramında kümelenen 2 coğrafik gruba (Ege ve Akdeniz bölgeleri) uygun şekilde gruplandırılmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.4.'te özetlenmiştir. AMOVA gruplar arasındaki bölgesel yapılanmayı doğrulamıştır ($P < 0.0019$). AMOVA sonucunda genetik varyasyona temel katkının bireyler arası (% 97.85) varyasyondan kaynaklandığı sonucuna ulaşılmıştır. Popülasyonlar arası / grup içi genetik varyasyonun ise düşük (% 0.91) olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.4. Moleküler varyans analizi (AMOVA)

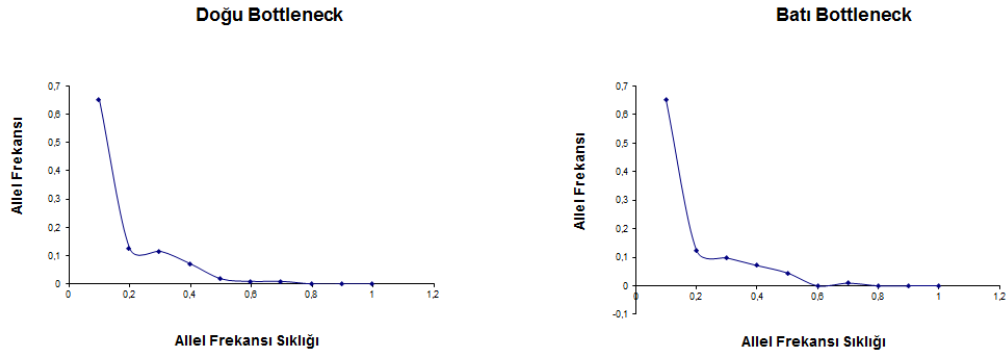
Yapı	Varyasyonun Kaynağı	%Toplam varyans	Fiksasyon indeksi
İki Ana Bölge	Gruplar arası	1.24	$F_{CT} = 0.01238$
	Populasyonlar arası / gruplar içerisinde	0.91	$F_{SC} = 0.00924$
	Bireyler içerisinde	97.85	$F_{ST} = 0.01379$

Mikrosatellitlere dayalı popülasyonların genetik yapılarının analizi için ayrıca STRUCTURE programı kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4.). Analiz sonucunda farklılaşma olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, K=2 ile K=12 arasında gruplandırmalar yapılan analiz sonucunda önemli bir genetik farklılaşma gözlenmemiştir.



Şekil 3.4. Analize tabi tutulan 12 ilden elde edilen mikrosatellit verilerine dayalı olarak elde edilen STRUCTURE analiz grafiği. k 2-12 (varsayılan grup sayısı).

Popülasyonların darboğaza girip girmediklerini test etmek amacıyla Bottleneck programı (Cournet ve Luikart, 1997) kullanılmıştır. TPM analizine dayalı gerçekleştirilen bu test sonucunda elde edilen veriler excel programında açılarak allel frekanslarına bağlı dağılım grafikleri elde edilmiştir. Ege ve Akdeniz popülasyonları birleştirilerek elde edilen dağılım grafiklerinde popülasyonlar standart L-dağılımı sergilediklerinden dolayı popülasyonların daha önce bir darboğaza (bottleneck) girmedikleri sonucuna ulaşılmıştır ($P > 0.05$) (Şekil 3.5.). 12 ile ait dağılım grafikleri Ek. A'da sunulmuştur.



Şekil 3.5. Doğu ve Batı popülasyonlarına ilişkin Bottleneck grafikleri.

3.2. mtDNA Analizi

Doğu Akdeniz'den Avrupa'ya doğru bu türün yayılım hikayesinin anlaşılması açısından, Türkiye'deki zeytin alanlarının tamamından örneklenen 12 zeytin sineği popülasyonunun genetik çeşitliliği, haplotip filogenisi ve demografik hikayesi mitokondriyal ND1 geninin kısmi baz dizi analizi yapılarak incelenmiştir. Çalışılan toplam 266 bireyde değişken dizi formunda (variant sequence form) 44 haplotip elde edilmiştir. Bu haplotiplerden 35 tanesinin ülkemize özgü olduğu, 9 tanesinde daha önceki yapılan çalışmalarda haplotiplerle ortak olduğu belirlenmiştir (Nardi vd. 2005; Nardi vd. 2010). Ülkemize özgü çok fazla sayıda haplotipin elde edilmesi bölgemizdeki zeytin sineği popülasyonlarının yayılım sürecinin çeşitli yönleriyle anlaşılabilmesi için güçlü bir araç sağlamaktadır. Yeni belirlenen haplotipler JX271833-JX271867 erişim numaraları ile Gen Bankasına kaydedilmişlerdir.

Haplotipler birbirlerine benzer olup, aralarındaki baz değişiklikleri 1 ila 8 nükleotid arasında değişmektedir (delesyon yada insersiyon gözlenmemiştir). Tüm popülasyonlar için genetik çeşitlilik verileri Çizelge 3.5.'de sunulmuştur. Haplotip çeşitliliği (h) 0.49524 (Hatay) ile 0.93651 (Bursa) arasında değişmektedir. Tüm popülasyonlar için haplotip çeşitliliği (h) değeri 0.812 ± 0.019 'dur ve daha önce elde edilen Akdeniz havzasındaki haplotip çeşitliliği (h) değerine benzer (0.79 ± 0.04)'dir (Nardi vd. 2005). Haplotipler arasındaki nükleotid çeşitliliği (π) 0.0009 (Hatay) ile 0.0048 (Bursa) arasında değişmektedir ve tüm popülasyonlar için ortalama nükleotid çeşitliliği (π) 0.003 ± 0.0001 'dir. Bursa ve Çanakkale popülasyonlarından farklı sayıda örneklem yapılmasına karşın popülasyonlardaki haplotip sayıları 3 (Hatay) ile

15 (Bursa) arasında değişmiştir. Ege ve Akdeniz bölgeleri için ortalama haplotip sayısı (Hp), haplotip çeşitliliği (h) ve nükleotid çeşitliliği (π) değerleri sırasıyla; Ege popülasyonlarında Hp = 9.57, h = 0.854 ve π = 0.0038; Akdeniz popülasyonlarında Hp = 6.6, h = 0.6504 ve π = 0.002'dir. Hatay popülasyonu dışında tüm popülasyonlar yüksek seviyede genetik varyasyon göstermiştir. 574 baz çiftinde (bç) 38 tane polimorfik bölge bulunmaktadır (toplam uzunluğun % 6.62'si), bu 38 bölgenin 17 tanesi singleton yani mutasyon tek bir haplotip baz dizisinde gerçekleşmektedir ve 21 tanesi de parsimony informatif bölgeler olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. Zeytin sineği popülasyonlarındaki haplotip çeşitliliği. N: Örnek sayısı, Hp: Haplotip sayısı, h: Haplotip çeşitliliği, π : nükleotid çeşitliliği.

Bölgeler	Popülasyonlar	N	Hp	h	π
Ege	Çanakkale	28	9	0.8148	0.0036
	Bursa	28	15	0.9365	0.0048
	Balıkesir	21	8	0.8476	0.0036
	Manisa	21	8	0.8238	0.0039
	İzmir	21	10	0.9	0.0037
	Aydın	21	11	0.8904	0.0042
	Muğla	21	6	0.7619	0.0030
	Ortalama		9.57	0.854	0.0038
Akdeniz	Mersin	21	9	0.6809	0.0025
	Adana	21	8	0.7238	0.0023
	Osmaniye	21	7	0.7428	0.0025
	Hatay	21	3	0.4952	0.0009
	Gaziantep	21	6	0.6095	0.002
		Ortalama		6.6	0.6504

Tez çalışmasından elde edilen ve daha önceki çalışmalarla aynı olan haplotipler Çizelge 3.6.'da sunulmuştur. Daha önceki bir çalışmada az sayıda zeytin sineği kullanılmasına rağmen (45 sinek), 8 lokasyondan 11 farklı haplotip Akdeniz havzasında tanımlanmıştır (İsrail-Haifa ile Portekiz-Paradale arasında) (Nardi vd. 2005). Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında Türkiye'nin batı bölgesinden toplanan örnekler ile Akdeniz havzasının Avrupa örnekleri oldukça sıkı ilişki içerisindedir ve 10 haplotip'in 6 tanesini paylaşmaktadırlar. Bu ortak haplotiplerin sayısı Portekiz'den 1/4, Fransa'dan 2/3, İtalya'dan 3/4'dür. Yunanistan, İsrail ve Türkiye'den daha önceki çalışmalardan elde edilen haplotiplerinde tamamı ortak

haplotip olarak bulunmuştur. Amerika'da daha önceden tanımlanan 5 farklı haplotip bulunmaktadır (Nardi vd. 2005) ve haplotip L dışında (Meksika-Ensenada'da ve Kenya-Burguret Forest'da bulunan) bu 5 haplotipin 4 tanesi çalışmamızda gözlenmiştir. Bu haplotiplerden 2 tanesi (haplotip N ve O) Amerika kıtasına spesifiktir ve çalışmamızda bu iki haplotipi bölgesel bir spesifiklik olmaksızın yüksek frekansta gözlemlenmiştir (Çizelge 3.6. ve Çizelge 3.7.). Pakistan ve Afrika'dan daha önceki çalışmalarda rapor edilen 10 haplotip Akdeniz popülasyonlarının kaynağı gibi görünmektedir (Nardi vd. 2005). Çalışmamızda daha önceden rapor edilen Afrika örneklerinden (Nardi vd. 2005) yalnızca Haplotip A ortak haplotip olarak bulunmuştur (Çizelge 3.6.). Yapılan başka bir çalışmada daha önceden belirlenmiş 4 haplotip (H1, H2, H4 ve H17) Akdeniz havzasından örneklenen 11 birey kullanılarak tanımlanmıştır (Nardi vd. 2010). Bunlardan 3 tanesi H1, H2 ve H4 çalışmamızda gözlenmiştir ancak Portekiz-Paradale ve Cezayir-Sig City'de bulunan H17 herhangi bir örnekte gözlenmemiştir (Çizelge 3.7.).

Çizelge 3.6. Daha önceki çalışmalarla ortak bulunan haplotiplerin listesi.

Haplotip Adı	Tanımlanan Lokasyon	GenBankası Erişim Numarası	Kaynak	Çalışmamızdaki Ortak Haplotip
	Kenya-Burguret Forest			
	Kaliforniya-Santa Barbara			
Haplotip A	İsrail-Haifa	AY998304	(Nardi vd. 2005)	
	Meksika-Ensenada			
	Türkiye-Osmaniye			H1
Haplotip-Morocco	Fas- Marrakesh	GU108474	(Nardi vd. 2010)	
Haplotip-Catania	İtalya-Catania	GU108471	(Nardi vd. 2010)	
Haplotip-Haifa2	İsrail-Haifa	GU108472	(Nardi vd. 2010)	
Haplotip-Osmaniye1	Türkiye-Osmaniye	GU108465	(Nardi vd. 2010)	
Haplotip N	Meksika - Ensenada	AY998317	(Nardi vd. 2005)	
	Kaliforniya - Santa Barbara			
Haplotip-Oroville	Kaliforniya - Oroville	GU108475	(Nardi vd. 2010)	
Haplotip-Osmaniye2	Türkiye - Osmaniye	GU108461	(Nardi vd. 2010)	H2
Haplotip-Haifa1	İsrail-Haifa	GU108460	(Nardi vd. 2010)	
Haplotip-SantaBarbara	Kaliforniya - SantaBarbara	GU108479	(Nardi vd. 2010)	
	Fransa-Les Matelles			
	İtalya - Montecuccio			
Haplotip I	İtalya - Portoferraio	AY998312	(Nardi vd. 2005)	
	İtalya - Catania			
	Yunanistan-Athens			H4
	Meksika-Ensenada			
Haplotip-Bari1	İtalya -Bari	GU108459	(Nardi vd. 2010)	
Haplotip-Bari2	İtalya -Bari	GU108460	(Nardi vd. 2010)	
Haplotip-Vaggia	İtalya -Vaggia	GU108464	(Nardi vd. 2010)	

Çizelge 3.6. (devam)

Haplotip Adı	Tanımlanan Lokasyon	GenBankası Erişim Numarası	Kaynak	Çalışmamızdaki Ortak Haplotip
Haplotip F	Portugal-Paradela Italy-Portoferraio	AY998309	(Nardi vd. 2005)	H7
Haplotip H	Fransa-Les Matelles İsrail-Haifa	AY998311	(Nardi vd. 2005)	H8
Haplotip J	İtalya - Montecucco İtalya -Catania	AY998313	(Nardi vd. 2005)	H10
Haplotip K	Yunanistan - Athens	AY998314	(Nardi vd. 2005)	H11
Haplotip O	Kaliforniya -Santa Barbara	AY998318	(Nardi vd. 2005)	H13
Haplotip G	Yunanistan - Athens	AY998310	(Nardi vd. 2005)	H14

Mitokondriyal haplotipler, Türkiye zeytin sineği popülasyonları arasında farklı şekilde dağılım göstermişlerdir. Çizelge 3.7.'de haplotipler, frekansları ve *B. oleae* popülasyonları arasındaki dağılımları listelenmiştir. 4 haplotip, H1, H2, H4 ve H8 yüksek frekansta ve oldukça yaygın olarak bulunmuştur ve çalışmamızdan elde edilen 266 baz dizisinin % 75.1'ini içermektedir. H1 ve H2 çalışılan tüm popülasyonlarda ortak haplotiplerdir ve Türkiye'de yaygın olarak bulunmaktadır. Çalışılan 266 baz dizisinin % 37.7'sini içeren haplotip H1 ülkemiz için dominant haplotiptir ve Akdeniz örneklerinin % 60'ı ve Ege örneklerinin % 40'ı H1 içerisinde yer almaktadır. İkinci sırada yaygın haplotipler H2 ve H8 % 13.1 oranında bulunmaktadır. Haplotip 2'nin % 52'sini Akdeniz ve % 48'i Ege örnekleri oluşturmaktadır. Bununla birlikte, % 11.2 ile dördüncü yaygın haplotip olan haplotip H8 ve H4 yalnızca Türkiye'nin batısından örnekleri içermektedir ve Ege bölgesinden örneklenen bireylerin frekansı % 83'dür.

Haplotiplerin genetik grupları ile bireylerin coğrafik kaynakları arasında son şeklini henüz almamış birliktelikler gözlenmiştir. Haplotip H10 ve haplotip H27 sırasıyla Akdeniz ve Ege bölgelerine spesifiktir. Bunun yanında kalan 7 haplotipin her biri birden fazla bölgede gözlenmiştir. Haplotip H23 Çanakkale'nin bir alt lokasyonu

olan ve Gökçeada'da gözlenmiştir ve bu haplotip Gökçeada'ya özgü gibi görünmektedir.

Çizelge 3.7. Türkiye'deki zeytin sineği popülasyonlarındaki mitokondriyal haplotiplerin illere göre dağılımı. Ortak haplotipler Çizelge 3.6'da verilmiştir. Haplotip lokasyonları parantez içinde verilmiştir. * Nardi vd. 2005'den elde edilenleri, ** Nardi vd. 2010'dan elde edilen haplotipleri simgelemektedir. Mer: Mersin; Ada: Adana; Osm: Osmaniye; Hat: Hatay; Gantp: Gaziantep; Man: Manisa; İzm: İzmir; Muğ: Muğla; Ayd: Aydın; Çnkl: Çanakkale; Besr: Bahkesir; Bur: Bursa

Haplotip/ Lokasyon	Ege							Akdeniz				
	Çnkl	Bur	Besr	Man	İzm	Ayd	Muğ	Mer	Ada	Osm	Hat	Gantp
H1	8	5	4	7	5	2	9	12	11	10	14	13
H2	1	3	3	4	3	2	1	2	3	4	6	3
H3											1	
H4	7	3	7	5	1	4	3					
H5	1		1									
H6	1		1	1								
H7	1				1							
H8	7	4	2	1	4	6	5	1	2	3		
H9			2									
H10						1						
H11		1				1						
H12		2		1		1						
H13						1		1	1	1		
H14					1	1						
H15		1				1		1	1	1		1
H16						1						
H17 Haplotip B* (Paradale- Portekiz, Les Matteles- Fransa) ve Haplotip Alg** (Sig city- Cezayir)												
H18		1										
H19		1										
H20		1										

Çizelge 3.7. (devam)

Ege								Akdeniz				
Haplotip/ Lokasyon	Çnkl	Bur	Besr	Man	İzm	Ayd	Muğ	Mer	Ada	Osm	Hat	Gantp
H21		1								1		
H22										1		
H23	1											
H24	1	1										
H25	1	1										
H26		1										
H27	1											
H28 Haplotip C* (Paradale- Portekiz)												
H29 Haplotip D* (Paradale- Portekiz)												
H30 Haplotip E* (Catania- İtalya)												
H31 Haplotip L* (Burguret fst-Kenya, Ensenada- Meksika)												
H32 Haplotip M* (Burguret forest- Kenya)												
H33 Haplotip P* (Burguret forest - Kenya)												
H34 Haplotip Q* (Burguret forest - Kenya)												

Çizelge 3.7. (devam)

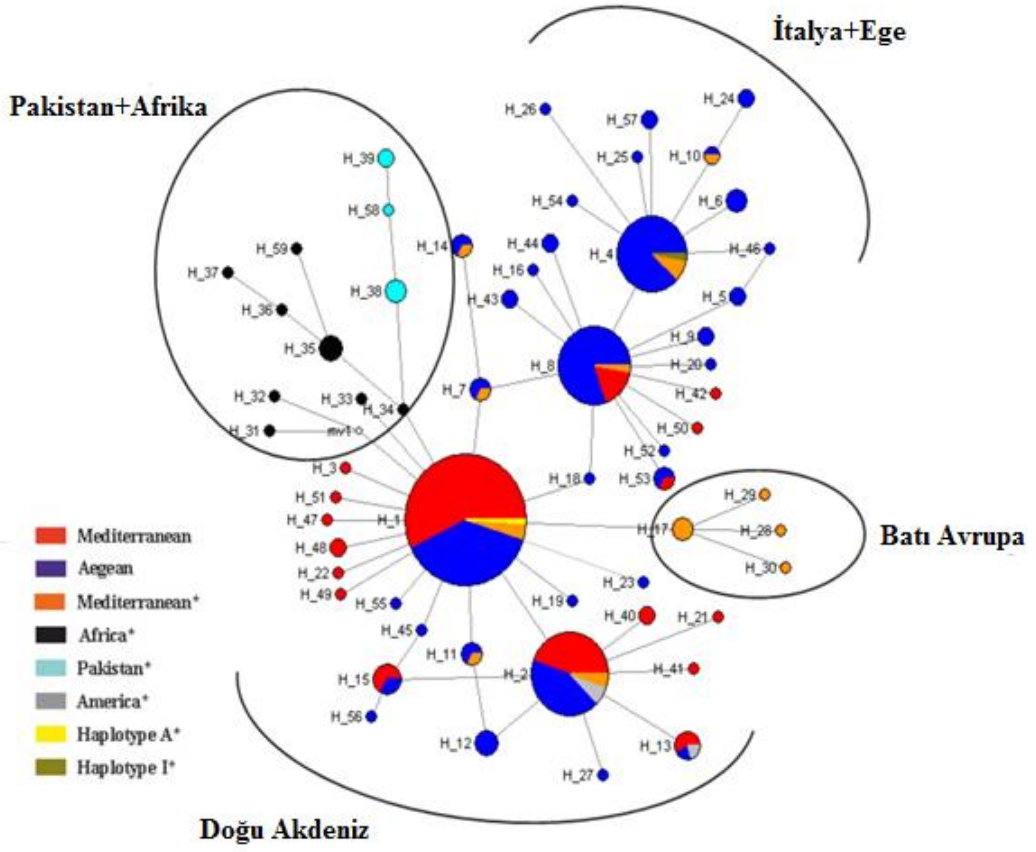
Ege								Akdeniz				
Haplotip/ Lokasyon	Çnkl	Bur	Besr	Man	İzm	Ayd	Muğ	Mer	Ada	Osm	Hat	Gantp
H35 Haplotip R* (Burguret forest - Kenya, Paarl Mountain- G.Afrika)												
H36 Haplotip S* (Paarl Mountain- G.Afrika)												
H37 Haplotip T* (Paarl Mountain- G.Afrika)												
H38 Haplotip U* (Cherat- Pakistan, Malakand- Pakistan)												
H39 Haplotip V* (Cherat- Pakistan, Malakand- Pakistan)												
H40												2
H41												1
H42												1
H43					2							
H44					2							
H45					1							
H46					1							
H47									1			
H48								1	1			
H49									1			

Çizelge 3.7. (devam)

Ege								Akdeniz				
Haplotip/ Lokasyon	Çnkl	Bur	Besr	Man	İzm	Ayd	Muğ	Mer	Ada	Osm	Hat	Gantp
H50								1				
H51								1				
H52		1										
H53							2	1				
H54							1					
H55				1								
H56				1								
H57		2										
H58 Haplotip Mlknd**-(Cherat- Pakistan, Malakand- Pakistan)												
H59 Haplotype Paarl Mnt**(Paarl Mountain- G.Afrika)												

Daha önceden yayınlanmış baz dizileri ile beraber (GenBankası erişim numaraları AY998304-AY998325 ve GU108459-GU108478) çalışmadan elde edilen mitokondriyal haplotipler arasındaki ilişkiler Network programı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.6.). Haplotipe dayalı network analizi, Türkiye'deki ve Dünya'daki zeytin sineği popülasyonları arasındaki filogenetik ilişkileri ve genetik yapının durumunun daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Network analizi sonucunda Akdeniz havzasında 3 farklı grubun varlığı ortaya çıkmaktadır. Bu gruplar Doğu Akdeniz-Amerika, Türkiye'nin batısını içine alan İtalya-Ege ve Batı Avrupa (İber grubu)'dır. Daha önceki çalışmalara uygun olarak (Nardi vd. 2005; Nardi vd. 2010), Pakistan ve Afrika haplotipleri oldukça iyi yapılanma göstererek güçlü bir filocoğrafik yapı sergilemişlerdir ve Akdeniz haplotiplerinden oldukça iyi bir şekilde farklılaşmışlardır. Bununla birlikte Portekiz-Paradale'den elde edilen

haplotip H7 Türkiye’de Ege bölgesi örnekleri ile birlikte gözlenmesine karşın (Çizelge 3.7.) Portekiz, İtalya ve Cezayir’den elde edilen haplotipler H17, H28, H29 ve H30 Batı Avrupa grubunu oluşturmuşlardır. Türkiye’de bulunan dört ana haplotip (H1, H2, H4 ve H8) daha önceden tanımlanan haplotipler ile birlikte network’de yüksek frekansta konumlanmışlardır. Geri kalan haplotipler düşük frekanslarda gözlenmiştir ve bu dört ana haplotipe birkaç mutasyonla bağlanmışlardır. En yaygın haplotip olan H1’in baz dizisi daha önceden tanımlanmış haplotip A ile % 100 benzerliğe sahiptir (Nardi vd. 2005). Nardi ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada bu haplotipin toplam frekansı % 0.30 olarak gözlenmiştir, tez çalışmamızda ise bu haplotipin frekansı % 37.7 olarak bulunmuştur. Çalışmadan elde edilen sonuçlar Nardi ve arkadaşlarının çalışmaları ile birleştirildiğinde haplotip H1 doğu Akdeniz ve Amerika’daki zeytin sineği popülasyonları için yaygın haplotip gibi görünmektedir. Daha sonra haplotip A ile aynı olan başka bir haplotip Fas örneklerinde bulunmuştur (Nardi vd. 2010). Haplotip N ile aynı baz dizisine sahip olan ve ikinci en yaygın haplotip olan H2 yalnızca Meksika, Amerika (Nardi vd. 2005) ve Amerika haplotip Oroville (Nardi vd. 2010) örneklerinde belirlenmiştir. H13 içerisinde bulunan haplotip O yalnızca Amerika’da (Nardi vd. 2005) rapor edilmiştir ve bu haplotip bir mutasyonla H2’ye bağlıdır. Bu haplotip ayrıca Amerika kıtasına spesifik gibi görünmektedir. Diğer bir yaygın haplotip olan H8, H1 haplotipine iki mutasyonla bağlıdır ve bu haplotip batı örneklerinde predominanttır (en yaygın) ve bu haplotipin yalnızca % 17’si Akdeniz’e ait baz dizilerinden oluşmaktadır. Haplotip 4 yalnızca Türkiye’nin batısından örnekleri içermektedir ve daha önceki çalışmalardan elde edilen Bari ve Vaggia haplotipleri ile aynı baz dizilerine sahiptir (Nardi vd. 2010). Haplotip I Avrupa’daki en yaygın ve geniş dağılım gösteren haplotiptir (Nardi vd. 2005). Haplotip 10 içerisindeki haplotip J İtalya’da bulunmuştur (Nardi vd. 2005) ve bir mutasyonla haplotip H4’e bağlıdır. Haplotip H8 dışında bu haplotip ve diğer haplotipler bir ya da iki mutasyonla birbirlerinden ayrılmışlardır ve tamamı Türkiye’nin batısından elde edilmiştir. Haplotip H4 İtalya-Ege grubuna spesifik gibi görünmektedir.



Şekil 3.6. mtDNA analizi sonucu elde edilen network grafiği.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının ilk bölümünde Doğu Akdeniz'den Avrupa'ya doğru *B. oleae* popülasyonlarının potansiyel yayılım yollarının ve genetik farklılaşmalarının şeklinin aydınlatılması hem mitokondriyal hem de nükleer DNA markerları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Türkiye Doğu Akdeniz bölgesinin önemli bir parçasıdır fakat bu türün analizi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olmasından dolayı tür hakkında bilinenler nispeten azdır (Nardi vd. 2005; Augustinos vd. 2005).

4.1. Mikrosatellit Bulgularına Göre Türkiye'deki *B. oleae* Popülasyonlarının Yapısı

Mikrosatellit analizleri sonucunda elde edilen veriler iki temel sonucu ortaya çıkarmıştır: (i) Türkiye'deki zeytin sineği popülasyonlarında yüksek seviyede genetik varyasyon bulunmaktadır; (ii) Ege ve Akdeniz popülasyonları arasındaki önemli farklılaşma derecesi bu türün muhtemelen doğudan batıya doğru yayıldığına işaret etmektedir.

Bazı araştırmacılara göre, zeytin sineğinin çevresel çeşitlilik derecesi ile genetik çeşitlilik derecesi arasında korelasyon bulunmaktadır (Gillespie ve Langley, 1974; Yong, 1992). Genetik çeşitliliğin ve belkide ayrışmanın artmasında, ekolojik farklılıkların potansiyeli öne sürülmüştür (Abrahamson ve Weis, 1997; Downie vd. 2001). Çalışmamızda sıkı bir şekilde monofag bir tür olan *B. oleae*, geniş bir alanda bu tip olasılıklarla karşılaşmıştır. Bu çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan ve 12 polimorfik mikrosatellit markerı kullanılarak analizi yapılan zeytin sineği popülasyonları arasında yüksek seviyede bir genetik varyasyon gözlenmiştir. Bu sonuç, bölgesel coğrafik ölçekte genetik varyasyonun yüksek seviyede bulunduğu rapor edildiği diğer literatür çalışmaları ile uyum göstermektedir (Nardi vd. 2005; Zygouridis vd. 2009; Augustinos vd. 2005; Segura vd. 2008). Elde edilen bu yüksek seviyedeki genetik varyasyonun temel sebeplerinden bir tanesi bu

türün Doğu Akdeniz havzasında uzun süreden bu yana var olması sayılabilir. Yakın Doğu yabani zeytin bitkisinin kültüre alınması hemen hemen M.Ö 4000 yıllarında meydana gelmiştir (Nardi vd. 2010; Zohary ve Hopf, 2000; Lumaret vd. 2004) ve arkeolojik kalıntılar Anadolu'da zeytinin ilk kez M.Ö 3000-2000 yılları arasında işlendiğini göstermektedir (Oybak, 2005). Ancak, muhtemelen bu türün evrimsel hikayesi zeytin bitkisi kültüre alınmadan evvel yabani zeytinler üzerinde meydana gelmiş gibi görünmektedir (Nardi ve Frati, 2011). Anadolu'da özellikle Mersin iline bağlı Tarsus ilçesinde en eski zeytin tohumu kalıntıları Neolitik çağı içine alan M.Ö 8000-5000 yıllarına aittir (Özdoğan ve Başgelen, 2007). Zeytinliklerin ülkemizde geniş bir alanı kaplaması ve zeytin sineği popülasyonlarının uzun bir süreden beri bulunmasından dolayı popülasyonların oldukça yoğun ve etkili olmaları genetik varyasyona katkıda bulunan diğer bir faktördür.

Cluster analizi Türkiye'de iki alt popülasyonun varlığına işaret etmektedir; Bunlar Akdeniz ve Ege popülasyonlarıdır. Düşük bootstrap değerleri olmasına karşın NJ ağacı (Şekil 3.1.) ve Faktöriye Korrespondans Analizi (FCA) (Şekil 3.2) bu iki temel alt grubun varlığını desteklemektedir. Mikrosatellit belirteçleri kullanılarak gerçekleştirilen Mantel testi sonucunda popülasyonlar arasında coğrafik uzaklık ile genetik uzaklık arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Buda uzaklıkla izolasyon olduğunu göstermektedir.

Zeytin sineği popülasyonlarının Akdeniz havzasının Avrupa kısmına doğru kolonizasyon ve yayılım hikayesini açıklamak için 3 temel hipotez öne sürülmüştür, fakat popülasyonların dağılım süreçlerinin altında yatan sebepler kısmen belirsiz görünmektedir (Zygouridis vd. 2009; Nardi vd. 2010; Augustinos vd. 2005; Segura vd. 2008). Çalışmadan elde edilen SSR verileri, yüksek sayıdaki düşük frekanslı aleller ile birleştiğinde bu organizmanın Doğu Akdeniz'den Kuzey Akdeniz havzasına doğru batı yönünde dağılım sergilediğini göstermektedir (Zygouridis vd. 2009; Augustinos vd. 2005). Akdeniz popülasyonları çok sayıda özel allelleri ve yüksek seviyede genetik varyasyon değerleri ile en polimorfik popülasyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Daha önceden de belirtildiği gibi zeytin sineği popülasyonlarının doğu-batı yönünde kolonizasyonu polimorfizm derecesindeki düşüş ile birlikte olur ve zeytin kültivasyonunun batıya doğru yayılımına bağlıdır (Zygouridis vd. 2009; Augustinos vd. 2005). Ayrıca, arkeolojik verilere göre zeytinler Anadolu'dan Yunan adaları ve Yunanistan'a taşınmışlardır (Başoğlu, 2009).

Popülasyonlar arasında gözlenen yüksek seviyedeki gen akışı ($Nem = 8.36$) Türkiye'deki zeytin sineği popülasyonlarını homojenize etmek için yeterli değil gibi görünmektedir. SSR belirteçleri Türkiye'de zeytin sineği popülasyonları arasındaki genetik çeşitlilik ve farklılaşmayı ortaya çıkarmıştır. Bu farklılaşmanın muhtemelen 3 sebebi bulunmaktadır. Bu sebeplerden birincisi, kesintisiz devam eden konukçu kaynakları, gen akışını engelleyici doğal bariyerlerin olmaması ve Türkiye'nin Suriye sınırında zeytin sineği için uygun iklimsel koşulların bulunmasıdır. Bu durum Orta Doğu'dan Türkiye'nin Akdeniz havzasına doğru bu popülasyonların dağılımı için doğal bir hat oluşturmaktadır. Örneğin, güneyden kuzeye doğru ya da tam tersi yönde. Farklı araştırmacılar zeytin sineğinin, coğrafik yayılım için yüksek seviyede yayılma kapasitesine sahip olduklarını bildirmişlerdir (Rice vd. 2003; Fletcher, 1989b; Fletcher, 1989c). Yeni zeytin alanlarının dikimi, zeytinin taşınması ve zeytin ticareti gibi insanların aracılık ettiği durumlar ile doğudan batıya kadar zeytin alanlarının dağılımının daha az sürekli olması ikinci sebep olarak nitelendirilebilir. Üçüncü sebep olarak tarımsal amaçlı insektisit kullanımı yoğunluğundaki lokal değişikliklerin, bölgeler arasındaki varyasyonu devam ettirmek için yeterince güçlü olması düşünülebilir. Türkiye'nin batı bölgelerinde oldukça geniş zeytin alanları bulunmaktadır ve bu popülasyonlara uzun zamandan bu yana uygulanan ilaçlamalardan dolayı yoğun bir seleksiyon baskısı vardır.

Çalışmamızda Mersin popülasyonu en yüksek genetik varyasyon sergilemiştir. Bu yüksek varyasyonun iki sebebi olabilir: birincisi, Mersin'in M.Ö 2000-1200 yılları arasında Anadolu'da zeytin yetiştiriciliğinin yapıldığı ilk yerleşim yerlerinden bir tanesi olmasıdır (Oybak, 2005; Başoğlu, 2009). Bu varyasyonun diğer bir nedeni de zeytin kültivasyonunun sistematik bir şekilde yapıldığı Akdeniz adalarından biri olan Kıbrıs ile Türkiye arasındaki en yakın ilin bu olması sayılabilir. Kıbrıs ile Mısır ve Yunan adaları gibi diğer Akdeniz ülkeleri arasında yoğun bir şekilde gerçekleşen zeytin ticareti tarihsel süreç boyunca Mersin ilinden deniz vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir (Başoğlu, 2009).

4.2. MtDNA Bulgularına Göre Türkiye'deki *B. oleae* Popülasyonlarının Yapısı ve Haplotip Analizi

MtDNA sonuçlarımız zeytin sineği popülasyonlarının Doğu Akdeniz'den Avrupa'ya doğru yayılımının anlaşılması için önemli bilgiler sağlamaktadır. MtDNA analizi sonucunda 3 temel sonuca ulaşılmıştır; (i) Türkiye'nin batısındaki zeytin sinekleri Akdeniz havzasındaki İtalya-Ege sinekleri ile çok yakından ilişkili gibi görünmektedir; (ii) zeytin sineği popülasyonları Kuzey Akdeniz havzasını Türkiye vasıtasıyla istila etmişlerdir; (iii) Türkiye Amerikan zeytin sineği popülasyonlarının muhtemel kaynağıdır.

Mikrosatellitlerden elde edilen sonuçlardan farklı olarak mitokondriyal veriler, Akdeniz bölgesine oranla Ege bölgesinde daha yüksek seviyede genetik çeşitlilik (haplotip sayısı, haplotip çeşitliliği, nükleotid çeşitliliği) olduğunu göstermiştir (Çizelge 3.5.). Bu farklılığın bir nedeni haplotip H1'in Türkiye'nin güneydoğusunda baskın olmasıdır. Bu farklılık mikrosatellit ve mtDNA belirteçlerinin farklı evrimsel paternlerinin bir sonucu olabilir. MtDNA anneden kalıtım gösterir, mikrosatellitlerle karşılaştırıldığında oldukça yavaş evrimleşir ve genetik sürüklenmeye daha fazla eğilimlidir (Shi ve ark 2012).

MtDNA haplotipleri kullanılarak Akdeniz havzasının popülasyon yapısı daha önce çalışılmıştır fakat bu çalışmada popülasyon seviyesinde genetik farklılaşma tanımlanamamıştır (Nardi vd. 2005). Doğu ve orta/batı Akdeniz popülasyonları arasındaki net bir filogenetik ayrışma, sınırlı sayıda örnekte tüm mitokondriyal genomun baz dizi analizinden sonra rapor edilmiştir (Nardi vd. 2010). Şimdiye kadarki çalışmalardan elde edilen sonuçlara paralel olarak, network analizi sonuçlarımız Akdeniz havzasında 3 ana grubun varlığını doğrulamaktadır (Asch vd. 2012). Bu gruplar; Doğu Akdeniz-Amerika, İtalya-Ege- Türkiye'nin Batısı ve Batı Avrupa (İber grubu)'dur. Çalışmamızda Doğu Akdeniz-Amerika ve İtalya-Ege popülasyonlarının arasında kesin bir ayrılma olmamasına rağmen, Türkiye bu her iki alt popülasyonu içeriyor gibi görünmektedir (Şekil 3.6.). Nardi vd. (2005) tarafından Yunanistan'dan Fransa'ya kadar olan bölgede daha önceden tanımlanmış 10 haplotipin dışında Avrupa'ya özgü 6 haplotip (H4, H7, H8, H10, H11 ve H14) (Çizelge 3.6. ve Çizelge 3.7.) farklı frekanslarda olmakla birlikte özellikle Türkiye'nin batısında gözlenmiştir. Bu yaygın haplotipler network grafiğinde farklı

alanlarda dağılım göstermişlerdir (Şekil 3.6.). 3 haplotipin dışında Türkiye’de tanımlanan 2 haplotipten başlamak üzere İtalya-Ege popülasyonunun sınırları Türkiye’nin batı kıyılarından Fransa’ya doğru uzanıyor gibi görünmektedir. Buna ek olarak M.Ö 600’lerde Foçalıların kültüre alınmış Anadolu zeytinlerini Türkiye’den Fransa’ya (Marsilya) taşıdıklarından bahsedilmektedir (Başoğlu, 2009). Tarih boyunca zeytin bitkisinin bu şekilde taşınması orta Avrupa ile batı Türkiye arasında bu yaygın haplotiplerin görülmesini açıklamaktadır. Ancak bu konunun açığa kavuşturulması için orta Avrupa’dan örnekler üzerinde daha detaylı baz dizi analizleri gerçekleştirilmelidir. Network grafiğindeki H17, H28, H29 ve H30 (Şekil 28) haplotiplerini içeren batı Avrupa grubu esasen batı Avrupa’da ve kuzeybatı Afrika’da tanımlanmıştır (Çizelge 3.7.).

Arabistan’a özgü zeytin varyeteleri İber yarımadasına M.S 8. yüzyıldan sonra girmişlerdir (Augustinos vd. 2005). Bu durum Anadolu gruplarının batı Avrupa gruplarından ayrılmasını açıklayabilir. Ege bölgesine spesifik olan haplotip H4, Avrupa’da yaygın haplotip olan haplotip I’yı içermektedir (Çizelge 3.6.) ve bir mutasyon farkla Avrupa’ya özgü haplotip J ile bağlantılıdır (Şekil 3.6.). H8 batı örneklerinde baskın olan haplotiptir ve H1 ve H4 arasında geçiş bölgesi gibi görünmektedir.

Afrika’dan yalnızca bir haplotipin paylaşıldığı H1 özellikle Türkiye’nin güneydoğusunda en yaygın ve fazla sayıda görülen haplotiptir. Amerika örnekleri için spesifik olan haplotip H2 çalışılan tüm alanlarda oldukça yüksek frekansta bulunmaktadır. Amerika’ya spesifik diğer bir haplotip olan H13, H2’den bir mutasyonla farklılaşmıştır ve Türkiye’nin iki farklı bölgesinde de gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar Amerikan popülasyonlarının Orta Doğu’dan orijinlendiğini desteklemektedir (Nardi vd. 2005; Zygouridis vd. 2009). Tez çalışmamızda bu spesifik haplotiplerin yüksek frekansta ve geniş dağılım gösteren şekilde bulunması Amerika’da bulunan zeytin sineği popülasyonlarının muhtemel orijininin Türkiye olduğunu göstermektedir. Ancak, bu kıtadan sınırlı sayıda baz dizisi olduğu unutulmamalıdır.

SSR verilerimizin sonucunda da önerildiği gibi, network analizine dayalı haplotiplerin dağılımından da doğu (Akdeniz), batı (Ege) yönünde yayılma olduğu anlaşılmaktadır. Ege bölgesinin 10 haplotipten 6 tanesini Doğu ve Orta Avrupa ile paylaşıyor olması, bu türün Avrupa’yı Türkiye vasıtasıyla istila ettiğini

göstermektedir. Başka bir deyişle zeytin sineği yayılımı Akdeniz havzasının kuzey kısmı vasıtasıyla gerçekleşmiştir. Türlerin bu şekilde batı yönünde yayıldığı gözlenmesi daha önceden bu konuda ifade edilen doğu batı yönündeki yayılım hipotezini desteklemektedir (Augustinos vd. 2005).

Bu çalışmada oldukça geniş bir alanda çok sayıda sinek kullanıldığı göz önünde bulundurulursa, Doğu Akdeniz-Amerika ve İtalya-Ege gruplarında yer alan doğal zeytin sineği popülasyonlarında daima ilave haplotiplerin var olabileceği mümkün olmakla birlikte bu haplotipler network'ün kenarlarında ya da uçlarında yer alacaktır. Genomların diğer kısımlarından yapılacak baz dizi analizi çalışmalarından elde edilecek haplotiplerin analizi Orta Doğu'dan Avrupa'ya doğru bu zararlının yayılımının anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Zeytin sineği yabani ve kültür zeytinlerindeki en önemli zararlılardan bir tanesidir. Laboratuvar ve saha gözlemleri, dişi zeytin sineklerinin bazı kültür zeytini varyetelerine karşı güçlü bir yumurtlama tercihi sergilediklerini göstermiştir (Gümüşay vd. 1990; Neuenschwander vd. 1985; Iannotta vd. 1999; Hannah ve Zalom, 2008). Zeytinlerde larval performanstaki varyeteye göre değişen bu gibi farklılıklar, organizmanın yeni bir çevreye girmesi durumundaki adaptasyon dinamiğinin ve popülasyon büyümesini etkileyen yayılma alanı ve istilanın başarılmasında etkilere sahiptir. Zeytin sineği bir alana girer girmez sinek popülasyonunun kuruluş süresi zeytin varyetesinin bulunuşundan etkilenebilmektedir (Hannah ve Zalom, 2008). Zeytin sineğinin, zeytin kültürlerine duyarlılığı hakkında daha fazla bilgi, gelecekte bu organizmanın kolonizasyon prosesinin ve dağılımının açıklığa kavuşturulmasında yardımcı olacaktır. Ayrıca bu organizmadaki mtDNA bölgelerinin daha fazla gen bölgesinde çalışılması yayılış hikayesinin daha net bir şekilde anlaşılmasına olanak sağlayacaktır.

BÖLÜM 2

5. GİRİŞ

İnsanoğlu, asırlar boyunca besin ihtiyacını daha kaliteli ve verimli şekilde karşılamak için çeşitli şekillerde zararlı türler ile mücadele etme gereği duymuş ve bu amaçla değişik yöntemlere başvurmuştur. Zararlılarla mücadelede kullanılan bu yöntemleri genel olarak 4 ana grupta toplamak mümkündür. Bunlardan ilki, zararlıların yaşam biçimleri ve bunlarla mücadele konusunda halkın çeşitli yollarla bilgi sahibi yapılmasının amaçlandığı kültürel mücadeledir. İkinci yöntem mekanik mücadeledir ve bu yöntemde zararlıların yaşama ortamları ve üreme bölgeleri çeşitli yollarla ortadan kaldırılmaya çalışılır. Üçüncü yöntem olan biyolojik mücadeledir ise, zararlıya yönelik doğal düşmanlar kullanılmak suretiyle zararlılar kontrol altına alınmaya çalışılır. Bu yöntemin en önemli özelliği doğaya herhangi bir zarar vermemesidir. Fakat uygulamadaki zorluklar, verimin düşük olmasından dolayı ekonomik olmaması ve bazı durumlarda hedef olmayan türleri de yok etmesi nedeniyle çok tercih edilmemektedir. Dördüncü ve zararlılarla mücadelede en yaygın kullanılan mücadele yöntemi ise, kimyasal mücadeledir. Bu yöntemde, çeşitli kimyasal ilaçlar kullanılarak zararlı türlerinin yok edilmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla zararlı popülasyonlar ile mücadelede kullanılan kimyasal ilaçlara genel olarak pestisit adı verilmektedir (Koçak, 1998).

Artan nüfusa bağlı olarak insanoğlu yaşamsal faaliyetlerinden en önemlisi olan beslenme ihtiyacını karşılamak adına birim alandan daha fazla verim elde etme adına çeşitli kimyasallara başvurmuştur. Halen artarak devam eden bu mücadelede pestisitler en yaygın şekilde kullanılan gruptan bir tanesidir. Pestisit kullanımındaki temel amaç, insanoğlunun temel besin kaynaklarını oluşturan kültür bitkilerinde ekonomik zarar oluşturan böceklerin, yabancı otların ve mikroorganizmaların etkilerinin ortadan kaldırılarak verim ve kalitenin

arttırılmasıdır. Pestisit kullanımı; ekonomik ya da sağlık sorunlarının çözümü aşamasında, daha ekonomik, düşük maliyetli, kullanımı kolay ve kısa sürede daha hızlı etki gösteren kimyasallar olmalarından dolayı zararlı organizmalara karşı yapılan mücadelede en sık başvurulan yöntemdir.

Zarar oluşturan canlıların öldürülmesinde kullanılan pestisitler;

- İnsektisit (Böcek öldürücü)
- Herbisit (Yabani ot öldürücü)
- Fungusit (Mantar öldürücü)
- Rodentisit (Kemirgen öldürücü)
- Mollusit (Yumuşakçaları öldüren)
- Nematisit (Nematodları öldüren)
- Akarisit (Akarları öldüren) vb. şeklinde sınıflandırılmış kimyasalların tümünü içermektedir (Öncüer 2004).

İnsanoğlunun, tarihin ilk zamanlarından bu yana çeşitli kimyasal maddeleri ve bitkilerden elde ettikleri ekstraktları pestisit olarak kullandıkları bilinmektedir. M.Ö 1500'lere ait bir papirüste bit, pire ve yabani arılara karşı insektisitlerin hazırlanışına dair kayıtlar bulunmuştur. M.Ö 1000 yılında kükürt insektisit ve fungusit olarak, Eski Yunan'da 3000 yıl önce sülfür, Çin'de M.Ö 900 yılında arsenik tarım zararlılarına karşı ve 1960'da tütün ekstraktları insektisit, duman da fumigant olarak kullanılmıştır (Ağar vd. 1991; Kuyucu, 2007). 20.yüzyılın başlarından itibaren de yeni kimyasalların geliştirilmesiyle beraber pestisit kullanımı hız kazanmıştır (Kuyucu, 2007). 1940'lardan sonra pestisit üretiminde organik kimyadan yararlanılmış, diklorodifenoltrikloroethan (DDT) ve diğer iyi bilinen insektisit ve herbisitler keşfedilmiştir.

1940'lı yıllara kadar insektisitler inorganikler ve bitkisel kökenliler olmak üzere iki ana gruba ayrılmışlardır (Gillott, 1995). İnorganik insektisitler arasında; arsenikli bileşikler (arsenik trioksit, kalsiyum arseniat, kurşun arseniat, sodyum arseniat), civalı bileşikler (civa klorit), fosforlu bileşikler (sodyum florit, sodyum alüminyum florit), kükürt ve selenat bulunmaktadır. Bu bileşiklerden günümüzde yalnızca sodyum alüminyum florit ve kükürt halen kullanılmaktadır. Diğer insektisitler ise oldukça toksik ve ağır metal olmalarından dolayı kullanımları yasaklanmıştır

(Öncüer, 2004). Bitkisel kökenli insektisitler ise çeşitli bitkilerden elde edilen nikotin alkaloidleri, retonoid ekstraktları ve piretroidlerdir (Öncüer, 2004).

1939 yılında Paul Miller tarafından DDT'nin keşfedilmesiyle birlikte pestisitler sentetik olarak üretilmeye başlanmıştır. DDT'nin keşfedilmesinden günümüze kadar geçen sürede organoklorlu, organofosforlu, karbamatlı ve piretroid grubu çok sayıda pestisit üretilmiş ve yaygın şekilde kullanılmıştır (Kuyucu, 2007). Organofosfat grubu insektisitler düşük fitotoksitesisi ve çabuk parçalanma oranına sahip olduğundan, memeli ve kuşlarda düşük toksik etkiye sahip olmaları gibi özelliklerinden dolayı 1960'lerden bu yana yaygın şekilde kullanılmaktadır. Organik sentetik pestisitlerin üretildiği 1940'lı yılları takiben 1960'lı ve 70'li yıllarda zararlılarla mücadele noktasında pestisit kullanımı artarak devam etmiş, 1980'li yıllarda ise en yüksek seviyeye ulaşmıştır. 1990'ların ikinci yarısından itibaren ise pestisit kullanımı nispeten azalmaya başlamıştır (Pedigo, 1996). Bugüne dek 6000 kadar sentetik bileşiğin pestisit olarak patenti alınmış fakat bunların yaklaşık 600 kadarı ticari olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde tarımsal açıdan önem taşıyan kültür bitkilerinde zararlıların sebep olduğu ürün kayıpları % 30-35'lere varmaktadır. Bu nedenle de pestisitlerin bu zararlılarla mücadelede daha uzun yıllar kullanım potansiyeline sahip olacağı düşünülmektedir (Anonim, 2013f).

Kimyasal pestisitlerin bu derece yaygın ve yüksek oranda kullanımının sonucu olarak pestisitlerin çok yüksek bir seçim baskısı oluşturduğu ortamlarda evrimsel süreçlerin bir sonucu olarak canlılar adaptasyon göstererek direnç kazanmaktadırlar (Şekil 5.1.) (Denholm vd. 2002).



Şekil 5.1. Dünyada insektisitlere dirençli böcek sayısının yıllara göre artışı (Denholm vd. 2002)

Kazanılan direnç genetik kökenlidir ve sonraki döllere de aktarılabilir. Dünya Sağlık Örgütü direnci ‘normal 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. Direnç oluşumu sonucunda her yıl kullanılan kimyasal miktarı giderek artmaktadır. Bu nedenle ciddi bir çevresel kirlilik ve bunun sonucunda da hedef dışı organizmaların etkilenmesi söz konusu olmaktadır (Plapp, 1984). İnsektisit direncinin evrimi zararlı böcek popülasyonlarının kontrolü açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır. Ekonomik açıdan zarar oluşturan böcek popülasyonlarında insektisitlere karşı direnç genetiğinin çalışılabilmesi ve mücadele stratejilerinin geliştirilebilmesi için, dirence neden olan genlerin belirlenmesi ve metabolizmasının anlaşılması oldukça önem arz etmektedir. Kayıtlara göre ilk olarak 1914 yılında San Jose kabuklu biti (*Quadraspidiotus perniciosus*)’nin kükürt kullanımına bağlı olarak (lime sülfür) karşı direnç geliştirdiği tespit edilmiştir. 1946 yılında karasineklerin (*Musca domestica*), o yıllarda yoğun bir şekilde kullanılan bir kimyasal olan DDT’ye karşı direnç kazandığı ortaya çıkmıştır (Tobias vd. 1946). DDT’nin keşfinden günümüze kadar geçen sürede birçok tür bir veya birden fazla insektisite karşı direnç geliştirmiştir ve bu türlerin %97’si tarımsal ve tıbbi öneme sahiptir (Georghiou, 1986; Kuyucu, 2007).

Birçok zararlı türünde, çeşitli direnç yönetim senaryoları ile direncin gelişim sürecinin önceden tespit edilmesini sağlayacak oldukça az bilgi bulunmaktadır. Direnç oluşumunu etkileyen faktörler; biyolojik faktörler, genetik faktörler ve işlevsel faktörler olmak üzere üç grupta incelenebilir. Biyolojik faktörler, nesil süresi, her nesilde oluşan birey sayısı ve göç’tür. Genetik faktörler, dirençte rol oynayan genlerinin frekansı ve baskınlığı, dirençli bireylerin başarısı, farklı direnç alellerinin başarısı şeklinde ifade edilebilir. İnsektisit kimyası ve kullanımı işlevsel faktörler arasındadır ve bu faktörler insanoğluna bağlıdır ve insektisit direncinin evriminde önemli rol oynamaktadır (Koçak, 1998). Sonuç olarak direncin tam olarak gelişmemesinden dolayı direnç genetiği hakkında belirgin detaylar iyi bir şekilde belirlenmemektedir. Bu kapsamda, direnç yönetim programları oluşturulurken popülasyonlardaki direnç mekanizmalarının ve dirençli-duyarlı genotiplerin uyumsal farklılıklarının belirlenmesi oldukça önemlidir (Roush, 1989).

Popülasyonlardaki direnç seviyelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan iki yöntem bulunmaktadır. Bunlardan birincisi bioassay yöntemidir. Bu yöntemde doğadan toplanan bireylere çeşitli dozlarda insektisit uygulaması yapılmak suretiyle populasyonun % 50 sini öldüren dozun yani LD50 (Lethal Dose, Öldürücü Doz) ve LC50 (Lethal Concentration, Öldürücü Konsantrasyon) değerlerinin bulunması amaçlanır. Ancak bu yöntem çok fazla bireye ihtiyaç duyulması ve organizmadaki potansiyel direncin tam olarak belirlenememesi, gibi açılardan dezavantajlara sahiptir. İkinci ve bioassay yöntemine göre daha spesifik olan yöntem ise biyokimyasal ve moleküler biyoloji teknikleri ile direnç seviyesinin belirlenmesidir. Bu metotta hem az sayıda örneğe ihtiyaç duyulması hem de organizmadaki potansiyel insektisit direnç seviyesinin daha spesifik olarak belirlenebilmesi mümkündür (Han vd. 1998; Kristensen, 2005; Başkurt vd. 2011).

5.1. Genel Bilgi

5.1.1. İsektisitler

Sentetik organik insektisitler, organik bağlarda karbon atomuna klor veya fosfor elementlerinin bağlanması yoluyla elde edilirler (Öncüer, 2004). Sentetik insektisitlerin 4 temel grubu böceklerle mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar, organoklorin, piretroid, organofosfat ve karbamat grubu insektisitlerdir. Bu insektisitlerin birçoğu sinir sistemine yönelik toksik etki göstermektedirler. Gelişmiş canlılarda sinir sistemi en duyarlı sistemlerin başında gelir. Bu insektisit gruplarından organofosfatlar, diğer insektisit gruplarına oranla çok daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Delen vd. 2005).

5.1.1.1. Organoklorinler

Sentetik olarak üretilmiş ilk insektisit grubudur ve en iyi bilinen üyesi DDT'dir. 1874 yılında sentezlenmesine karşın böcek öldürücü olarak 1939 yılından sonra kullanılmaya başlanmıştır ve bitki koruma alanında kimyasal yöntemlerin gelişimine çok önemli katkılarda bulunmuştur. Bu sınıf insektisitler lipitlerde yüksek derecede çözünme ve çevre koşullarına dayanıklı olmaları nedeniyle uygulama bölgelerinde

uzun süre kalırlar. Bu insektisitler memelilerde yağ ve karaciğer dokularında biriktiklerinden dolayı çevre ve besin kirliliklerine yol açmaktadırlar. Çevre ve sağlık açısından bu olumsuz durumdan dolayı bu insektisitlerin üretimi ve kullanılmaları birçok ülkede yasaklanmıştır. Temas zehri olarak etkileyen bu grup insektisitlerin birinci derecede etki yerleri böceklerin sinir hücre membranlarındaki Na^+/K^+ kanallarıdır. Bu insektisitler Ca^{+2} - Mg^{+2} ATP'azları da inhibe edebilirler. Bu grubun bilinen başlıca üyelerine örnek olarak DDT, dieldrin, aldrin, lindan ve endosülfan gibi insektisitler verilebilir (Şanlı, 1998).

5.1.1.2. Karbamatlar

Karbamat grubu insektisitler fenol ve fenol türevlerinden elde edilirler. Karbamat grubu insektisitler, organofosforlu insektisitlerle benzer şekilde merkezi sinir sisteminde bulunan kolinesteraz enzimini inhibe etmek suretiyle etkilerini meydana getirirler. Organofosfatlardan iki yönüyle farklılık gösterirler. Birinci fark bu insektisit grubunun kolin esteraz enziminin anyonik yanı ile kompleks oluşturabilen bazik özellik taşıyan bir azot grubuna sahip olmasıdır. İkinci önemli fark ise, karbamat grubu insektisitlerin inhibisyon etkilerinin dönüşümlü olmasıdır. Karbaril, pirolan, dimetan ve karbafuran karbamat grubu insektisitlere örnek olarak verilebilir (Şanlı, 1998).

5.1.1.3. Piretroidler

Pyrethrum cinsine ait belirli türlerin insektisit özelliğinin keşfedilmesinden sonra 1949 yılında ilk sentetik piretroid olan Allethrin üretilmiştir. Bu insektisit ışıktan çabuk bozduğundan dolayı başlarda sadece ev zararlıları ile mücadelede kullanılmış daha sonraları ışığa dayanıklı piretroidlerin 1973 yılında sentezlenmeleri ile birlikte tarımsal mücadelede de kullanılmışlardır. Bu grup insektisitler düşük doz uygulamalarda bile oldukça yüksek toksik etki gösterirler ve hızlı yere serici (knock-down) özellikleri bulunur. Üretilmeleri pahalı olmakla birlikte organofosfat ve karbamatlara oranla düşük konsantrasyonlarda uygulanmalarından dolayı daha avantajlıdır. Kalıcılığı düşük ve toksisitesi yüksektir bununla birlikte memeliler üzerinde toksik etkisi düşüktür (Elliot vd. 1978). Piretroidler voltaj duyarlı sodyum kanalı üzerine toksik etki gösterirler (Rinkevich vd. 2006; Taşkın vd. 2011). Piretroid

grubu insektisitler Tip-I ve Tip II olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Tip I piretroidler yere serici etkinliği olan sinirsel uyarılara yol açarlar. Tip II piretroidler ise öldürücü ve sinirsel iletimi engelleyici yönde etki yaparlar (Şanlı, 1998). Bu grubun üyeleri arasında permetrin, tetrametrin, piretrinler sipermetrin ve deltametrin gibi insektisitler yer alır (Dent, 2000).

5.1.1.4. Organofosfatlar

Organofosfatlar ikinci dünya savaşı sırasında sinir gazı olarak kimyasal savaşta kullanılmış daha sonraları ise insektisit özelliklerinin keşfedilmesiyle insektisit olarak kullanılmışlardır. Dünyada pestisit tüketiminin hemen hemen yarıya yakını bu grup insektisitler oluşturmaktadır (Ünal ve Gürkan, 2001). Organofosfatlı insektisitler sinir sistemindeki asetilkolinesteraz (AKE) enziminin doğal substratı konumundaki asetil kolini taklit ederek bu enzime geri dönüşümsüz şekilde bağlanarak etki gösterirler. Bunun sonucu olarak organizmada sinyal iletimi sürekli devam eder ve motor kasların sürekli çalışmasına bağlı olarak organizmanın ölümüne yol açar (Ünal ve Gürkan, 2001; Lockridge vd. 1997).

Kullanılmaya başlanmalarıyla birlikte organoklorlulara oranla çevreye daha az zarar vermelerinden dolayı pek çok mücadele programında organoklorlu insektisitlerin yerini almışlardır. Bu insektisitlerin bir kısmı böcekler üzerinde sistemik etkili olup (tüm vücudu etkileyen), diğer bir kısmı ise kontak ve mide yolu ile etki gösterirler. Organofosfatlar fosfat grubuna eklenmiş farklı alkollerden oluşan esterler olarak da bilinir ve alifatikler, feniller ve heterosiklikler olarak üç grupta toplanırlar (Matsumura, 1985; Pedigo, 1996). Bu grubun temsilcileri arasında malathion, parathion, diklorvos, diazinon, malaoxon ve paraokzon yer almaktadır (Şanlı, 1998; Öncüler, 2004).

5.1.2. Türkiye ve Dünya’da insektisit kullanımı

Ülkemiz ekonomisinde tarımın büyük bir payı bulunmaktadır. Buna bağlı olarak artan nüfusun ihtiyaçlarının karşılanması ve tarımsal üretimin artırılması için verimli tohum kullanımı, sulama ve gübreleme gibi çeşitli yöntemlerin yanı sıra zararlıların sebep olduğu ve yaklaşık % 35'lere varan ürün kayıplarının önlenmesi de

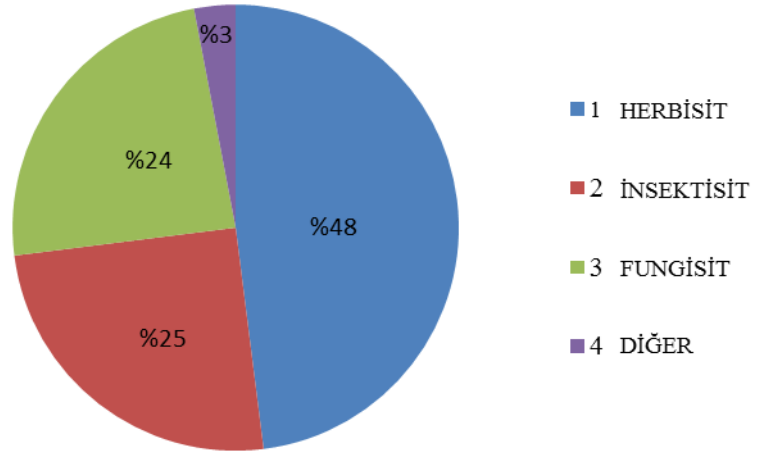
gerekmektedir (Anonim, 2013f). Bu amaçla ülkemizde ve dünyada, kolay uygulanan, etkili ve düşük maliyetli olan pestisit kullanımı karşımıza çıkmaktadır. Ülkemizde bu tür zararlılarla mücadelede insektisitler, herbisitler ve fungusitler kullanılmaktadır (Ünal ve Gürkan, 2001; Delen vd. 2005).

Son yıllarda dünya pestisit tüketimindeki artış hızında düşüş görülmekle birlikte 1983-1993'de % 3.4 olan artış oranı, 1993-1995 arasında % 18.5'e yükselmiştir (Lorbeer vd. 2001). Türkiye'de yıllık pestisit tüketim değerleri, 1979-2007 yılları arasında % 270 oranında artış göstermiştir. Bu değer yıllık olarak % 9.64'lük bir artışa karşılık gelmektedir. Pestisit tüketimimiz, 2002 yılında 12.199 ton iken, 2006 yılında yaklaşık % 50 artış ile 18.258 ton ve 2007'de de % 24.22 artarak 22.681 ton olmuştur (Çizelge 5.1.) (Durmuşoğlu vd. 2010).

Çizelge 5.1. Türkiye'de etki ettikleri canlı gruplarına göre 1979-2007 yılları arasında etkili madde olarak pestisit tüketimi (ton) (Durmuşoğlu vd. 2010).

Pestisit grupları	1979	1987	1994	1996	2002	2006	2007
İnsektisitler	2288	3303	2065	3027	2251	3406	7304
Akarisitler	203	240	192	223	297	219	315
Yağlar	1595	2147	2147	2871	2428	2144	2447
Fumigant ve Nematisitler	316	322	531	1077	1559	2650	3031
Rodentisitler ve Mollusisitler	5,6	2,1	2,5	3,3	1,8	6,7	11,0
Fungusitler	1537	2612	2201	2951	1964	4432	4945
Herbisitler	2452	3495	3903	3644	3697	5400	4638
TOPLAM	8396	12112	10872	13797	12199	18258	22681

Dünyadaki toplam pestisit üretimi yıllık 3 milyon ton civarındadır (Delen, 2008). Bunların % 48'ini herbisitler oluşturmaktadır. Bunu % 25 ile insektisitler, % 24'ilede fungusitler takip etmektedir. Herbisitler ve insektisitler, kullanımın % 70'den fazla bir bölümünü kapsamaktadır. Diğer pestisit grupları ise % 3'lük bir paya sahiptir (Şekil 5.2.) (Tiryaki vd. 2010; Öztürk,1997). Dünya pestisit piyasasındaki tüketim payının % 80'i gelişmiş ülkelerin iken Türkiye'nin payı % 0,6'dır (Durmuşoğlu vd. 2010; Kantarcı 2007).



Şekil 5.2. Pestisit gruplarına göre dünyada tarım ilacı kullanımı (Delen, 2008).

Dünyada pestisit gruplarının tüketim oranlarında yıllara bağlı olarak önemli değişiklikler olmuştur. İnsektisit, fungusit/bakterisit tüketim oranları azalmış buna karşın herbisit tüketim oranında artış olmuştur. Herbisitlerin tarım ilaçları içerisinde tüketim oranı 1960 yılında % 20 iken 2005’de bu oran % 48’e yükselmiştir (Çizelge 5.2.). 2007 yılı rakamlarına göre dünyada en fazla pestisit tüketimi olan ülkeler arasında Fransa, Japonya ve Almanya ilk sıralarda yer almaktadır (Zhang vd. 2011).

Çizelge 5.2. Dünyada pestisit tüketiminin değişimi (Milyon \$) (Zhang vd. 2011).

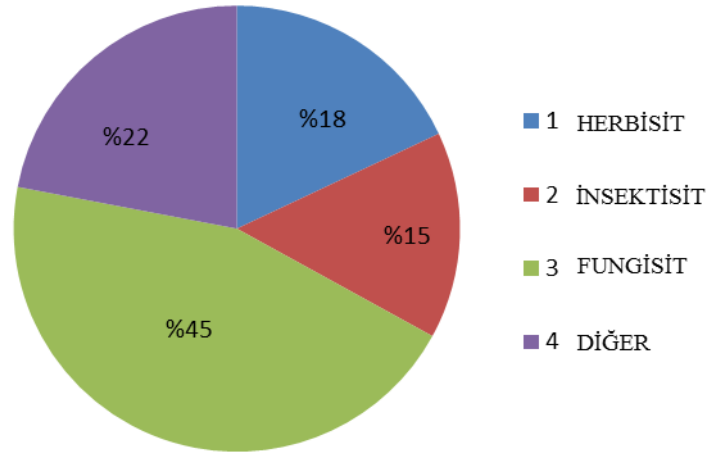
	1960		1970		1980		1990		2000		2005	
	Satış	%	Satış	%	Satış	%	Satış	%	Satış	%	Satış	%
İnsektisit	310	36,5	1,002	37,1	4,025	34,7	7,655	29,0	7,559	27,9	7,798	25,0
Herbisit	170	20,0	939	34,8	4,756	41,0	11,625	44,0	12,885	47,5	14,971	48,0
Fungusit	340	40,0	599	22,2	2,181	18,8	5,545	21,0	5,306	19,6	7,486	24,0
Diğer	30	3,5	159	5,9	638	5,5	1,575	6,0	1,354	5,0	936	3,0
Toplam	850	100	2,700	100	11,600	100	26,400	100	27,104	100	31,191	100

Türkiye’de birim alanda kullanılan ilaç miktarı gelişmiş ülkelerle kıyaslandığında düşük seviyelerdedir. Türkiye’de ilaç kullanımı Akdeniz ve Ege bölgelerinde yoğunlaşmaktadır. Entansif (yoğun) tarım yapılan bu bölgelerde pestisit kullanımının ülkemiz ortalamasının çok üzerinde olduğu ve gelişmiş ülkeler düzeyine yakın olduğu söylenebilir. Türkiye’de yıllar itibariyle pestisit tüketimleri Çizelge 5.3.’te görülmektedir. Türkiye’de pestisit üretimi 2011 yılı itibarı ile 40.000 ton olup pestisit

tüketiminde sırasıyla en fazla fungusit (% 45), herbisit (% 18) ve insektisit (% 15)'ler yer almaktadır (Şekil 5.3.) (Canik ve Yüksel, 2012).

Çizelge 5.3. Türkiye’de pestisit kullanım miktarları (kg) (Canik ve Yüksel, 2012).

Yıllar	İnsektisit	Fungusit	Herbisit	Akarisit	Rodentisit	Diğer	Toplam
2004	-	-	-	-	-	-	41.223,053
2005	-	-	-	-	-	-	43.362,627
2006	7.628,215	19.899,724	6.955,585	901,999	2,877	9.987,399	45.375,799
2007	21.045,.632	16.706,631	6.668,653	966,488	50,925	3.277,315	48.715,644
2008	9.250,719	17.862,861	6.176,508	737,123	351,095	5.613,346	39.991,651
2009	9.913,897	17.395,950	5.960,852	1.532,728	77,610	2.302,300	37.183,337
2010	7.175,831	17.545,584	7.451,591	1.039,739	147,404	5.343,714	38.703,862
2011	6.119,933	18.123,614	7.406,602	1.061,609	421,426	6.977,775	40.110,958



Şekil 5.3. Pestisit gruplarına göre Türkiye’de tarım ilacı kullanımı (Canik ve Yüksel, 2012).

Türkiye’de yoğun bir şekilde kullanılan insektisitlere bakıldığında zaman ya çok zehirli ya da zehirli kimyasalların kullanıldığı görülmektedir (Delen vd. 2005). Bu nedenle çevre ve insan sağlığı açısından daha düşük risk taşıyan insektisitlerin ruhsatlandırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

5.1.3. Böceklerde direnç ve direnç tipleri

Günümüzde yapılan çalışmalar sonucunda, insektisitlerin yaygın ve yoğun kullanımına bağlı olarak böceklerin insektisitlere karşı direnç geliştirdiği görülmüştür. Direnç temel evrimsel süreçlerin bir sonucudur. Popülasyonlara uygulanan kimyasal uygulamaları sonucu, bazı bireyler hayatta kalabilirler ve bu durum genetik farklılıklara bağlı olabilir. Bu sağ kalım sonucunda üreme yeteneği olan bireyler uygulanan kimyasala direnç gösterecek ve bu karakteri sonraki nesillere aktaracaktır. Böylelikle popülasyonun devam eden nesillerinde bu özellikteki bireyler daha fazla sayıda bulunacaktır (Georghiou 1986).

Doğal popülasyonlar çevresel faktörlere bağlı olarak çeşitli seçim baskılarına maruz kalırlar. Pestisitlerde insanlar tarafından yapay olarak üretilmiş bir seçim baskısı oluşturur. Bu seçim baskısına bağlı olarak popülasyon, oluşan bu yeni duruma adaptasyon gösterir ve allel frekansında bir değişim gözlenir. Yani uygulanan kimyasala bağlı olarak dirençli allellerin popülasyon içi frekansı artış gösterir (Georghiou ve Lagunes-Tejeda,1991).

Böcekler, davranışsal, fizyolojik ve biyokimyasal olmak üzere iki temel mekanizma vasıtasıyla direnç geliştirirler (Plapp, 1984).

5.1.3.1. Davranışsal Direnç

Canlının doğal davranışı ya da davranış modifikasyonları ile temas yüzeyinden sakınma veya kontak süresini azaltma şeklinde olan direnç tipidir. Davranışsal dirençte temel durum zararlının insektisit uygulandığı bölgeden uzaklaşma veya kendini koruma altına alma eğilimi göstermesidir (Plapp, 1984). Bu duruma örnek olarak sivrisineklerin ilaçlanan bölgelerde dinlenmemesi ve üreme alanlarını değiştirmesi (Şanlı, 1998), elma içi kurtlarının meyve içine girmek için meyveyi kemirdiğinde ilaçlı meyve ise parçayı yutmayıp dışarı atması ve bazı ambar böceklerinin kullanılan kimyasala maruz kalmamak için stigmalarını uzun süre kapalı tutmaları verilebilir (Öncüer, 2004).

5.1.3.2. Fizyolojik ve biyokimyasal direnç

Bu direnç mekanizması alınan insektisit miktarının azaltılması, hızla parçalanması ve hedef enzimde meydana gelen değişiklikler olmak üzere 3 grupta incelenebilir.

5.1.3.2.1. Vücuda alınan insektisit miktarının azaltılması

Bu mekanizma, zararlıların vücutlarının dış kısımlarındaki değişimlere bağlı olarak geliştirdikleri direnç tipidir (Plapp, 1984). Örneğin dış iskeletin pestiside karşı daha az geçirgen olması, pestisit vücutta depolanması veya canlı zarar görmeden insektisit atılması, vücudun sık kıllı olması ve kütikulanın kalın olması gibi özelliklerle canlı insektisitlere karşı direnç geliştirmektedir (Öncüer, 2004; Şanlı, 1998). *M. domestica* ile yapılan çalışmalar sonucunda, 3. kromozomda bulunan *pen* geninin bu direnç tipinin oluşumu ile ilgili olduğu bulunmuştur (Hemingway ve Ranson 2000). Bu direnç şekli sentetik pestisitlerin kullanımı ile çok büyük oranlarda ortaya çıkmaktadır (Şanlı, 1998).

5.1.3.2.2. Vücuda alınan insektisit hızla parçalanması

Gözlenen bu direnç mekanizmasında insektisitlerin, hızlı bir şekilde parçalanmak suretiyle daha az toksik olan öncü bileşiklere dönüştürülmesi gerçekleşir. Bu durum ya farklı enzim formları ile ya da az bulunan enzim miktarının artırılması ile gerçekleştirilir (Hemingway ve Ranson 2000). İnsektisit detoksifikasyonunda görev alan enzimler esterazlar, P450-monooksijenazlar ve glutatyon -s-transferazlar'dır. Bu enzimlerde mutasyonlara bağlı olarak meydana gelen değişimler sonucunda insektisitlerin hızlı bir şekilde parçalanması ve canlıya zarar vermeyecek forma dönüştürülebilmesi mümkün olmaktadır (Plapp, 1984). Bunun yanı sıra insektisiti metabolik olarak yavaş parçalayan bir genin amplifikasyonu ile kopya sayısının artırılması direnç kazanılmasında rol almaktadır (Hemingway ve Ranson 2000).

5.1.3.2.2.1. Esterazlar

Esteraz enzimleri karboksilik asitlerin ester bağlarını hidrolize ederler. Feromon ve hormon metabolizması, sindirim sistemi ve sinir iletimi, üreme davranışı ve insektisitlere direnç gibi birçok mekanizmada esterazların rolü bulunmaktadır (Claudianos vd. 1999; Oekeshott vd. 1993). Esteraz enzimleri sülfhidril ve eserin sülfatla verdikleri reaksiyonlara göre asetil esterazlar, aril esterazlar, karboksil esterazlar ve kolin esterazlar olmak üzere 4 gruba ayrılırlar. Asetil esteraz enzimleri sülfhidril, organofosfat ve eserin sülfat inhibitörlerinden hiçbiri ile reaksiyona girmezler ve genellikle asetik asit gibi alifatik substratları tercih ederler. Aril esterazlar yalnızca sülfhidril grubu taşıyan inhibitörler ile inhibe edilir ve genellikle aromatik substratları tercih ederler. Karboksil esterazlar ise yalnızca organofosfatlarca inhibe edilirler ve asetik asitten daha uzun alifatik esterleri substrat olarak tercih ederler. Kolin esterazlar, organofosfat ve eserin sülfat inhibitörleri ile inhibe olurlar ve diğer alifatik ve aromatik esterler dışında kolinesterleri substrat olarak tercih ederler. Bu esteraz gruplarından karboksil ve kolin esterazlar organofosfat inhibisyonunda önemli rol almaktadırlar (Oekeshott vd. 1993).

5.1.3.2.2.2. Glutathion -s-transferaz (GST) enzimi

Glutathion-S-Transferazlar (GST) insektisitlere karşı dirençte görev alan diğer bir enzim grubudur. GST'ler bütün metazoanlar ve bitkilerde bulunurlar ve insektisitlerinde içinde bulunduğu ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunun gerçekleştirildiği sistemlerden bir tanesidir. GST enzimleri zararlı bileşikleri indirgenmiş glutathion ile birleştirmek suretiyle bu bileşikleri zararsız formlara dönüştürürler. Bu enzimler bazı böceklerde insektisitlerin toksik etkilerine karşı temel bir savunma olarak yer almaktadırlar (Hemingway vd. 2004; Enayati vd. 2005).

5.1.3.2.2.3. *Monooksijenazlar*

Monooksijenaz gen ailesi; böcekler, bitkiler, memeliler, kuşlar ve bakteriler gibi bütün aerobik organizmalarda bulunur ve oksijenli solunumun ETS evresinde görev alan sitokrom proteinlerini kodlarlar. Sitokrom P450'nin bağlı olduğu bu grup; ilaçlar, pestisitler ve bitki toksinlerinin katabolizması ve anabolizmasında, hormonlar, yağ asitleri ve steroidler gibi endergonik bileşiklerin düzenlenmesinde görev yapan önemli bir metabolik sistemdir. Sitokrom P450, monooksijenaz sisteminde merkezi oksidazın görevini yapan bir hemoproteindir ve çok geniş bir substrat grubu üzerine etki göstermektedir. Bu nedenle organizmada bu enzimi kodlayan genlerin birçok kopyası bulunmaktadır. Ökaryotlarda P450'ler endoplazmik retikulum ve mitokondrilerde bulunur (Jeffrey, 1999).

Böcek monooksijenazlarının; beslenme, büyüme ve gelişme, pestisitlere karşı direnç ve bitki toksinlerine tolerans gibi birçok rolü bulunmaktadır. Böceklerde P450 redüktaz ve sitokrom b5' in direnç gelişiminde rol oynadığı bildirilmiştir. P450'nin varlığı ilk kez 1967'de karasinekte kaydedilmiştir ve memeli P450 redüktazına benzerlik gösterir. P450 redüktaz ve b5 'in seviyelerindeki artışın monooksijenaza bağlı insektisit direnci ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. P450'ler organofosfatların insektisit aktivitesini engelleyerek etki gösterirler (Jeffrey, 1999). P450 enzimlerinin piretroit grubu insektisitler için detoksifikasyonda, organofosfat grubu insektisitler için de hem aktivasyon hem de detoksifikasyonda rol aldığı rapor edilmiştir (Scott ve Zhang, 2003).

5.1.3.2.2.4. *Gen amplifikasyonu yolu ile direnç kazanılması*

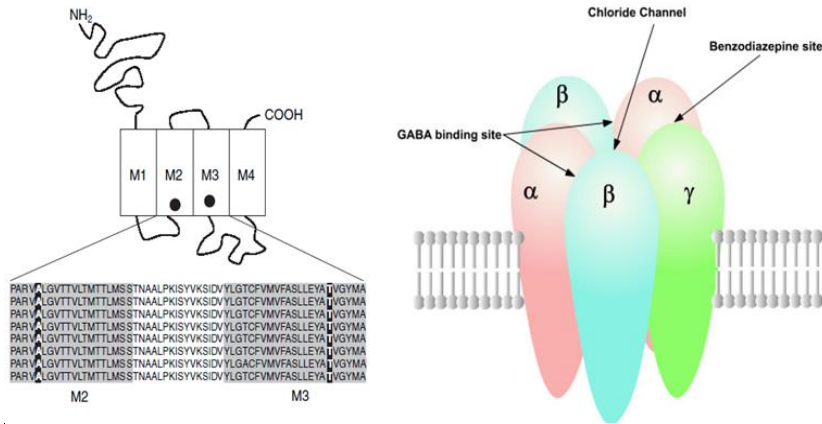
Genin fazla ifade olması (over-ekspresyon) ile direnç gelişiminde, gen ekspresyonunun düzenlenmesi ile gen ürününün miktarının yani enzim miktarının değişimi söz konusudur (Hemingway, 2000). Bu direnç tipi; canlıda, insektisiti parçalama kapasitesi düşük spesifik bir karboksilesteraz geninin, genom içerisinde kopya sayısı artırılarak enzimin miktarında artış sağlanması böylelikle de yüksek konsantrasyondaki enzim ile insektisitin yeterli oranda etkisiz hale getirilmesi şeklinde gerçekleşir. Bu dirençte insektisit hedef bölgelere ulaşmadan zararsız forma dönüştürülür ve organizma hayatta kalır (Guerro, 2000; Hemingway, 2000).

5.1.3.2.3. Hedef enzimde meydana gelen değişiklikler

Bu durum asetilkolinesteraz enziminde olduğu gibi insektisitlerin enzimin hedef bölgelerine bağlanarak enzimi inhibe etmesinin engellenmesi için hedef enzimlerde meydana gelen değişiklikler vasıtasıyla insektisite karşı duyarsızlaşma olarak tanımlanabilir. Bu şekilde direnç kazanım mekanizmalarına; sikloiden insektisitlerinin hedefi olan γ -aminobütirik asit (GABA) reseptörlerinde (Richard vd. 1993), DDT ve piretroidlerin hedefi olan voltaja duyarlı sodyum kanal proteinlerinde (Williamson vd. 1993) ve organofosfat ve karbamat grubu insektisitlerin birincil hedefi olan asetilkolinesteraz (AKE) enziminde (Aldridge, 1950) rastlanır. Temel olarak direnç insektisite hedef olan bölgelerin insektisite karşı duyarsızlaşması ile kazanılır (Villate vd. 2000).

5.1.3.2.3.1. γ -aminobütirik asit (GABA) reseptörleri

GABA reseptörleri α , α , β , β , δ olmak üzere 5 alt üniteden oluşan Cl^- iyon kanalı formunda bir proteindir. Alt ünitelerin herbiri M1, M2, M3, M4 isimli 4 adet trans membran helikse sahiptir. Bunlardan M2 heliksi merkezi bir transmembran kanalını çevreler. Bunun yanı sıra GABA reseptör kanalının amino ucunda ligand bağlanması bölgesi bulunur (Şekil 5.4.). GABA inhibitör bir nörotransmitterdir ve hücre içine Cl^- iyon geçişini arttırmak suretiyle hücrenin uyarılmasını engeller. GABA reseptörlerinin insektisitlere karşı duyarsızlaşması alt ünitelerden birini kodlayan *rdl* geninin üretmiş olduğu proteindeki Ala302Ser mutasyonu ile gerçekleşmektedir (Gupta, 2007).



Şekil 5.4. Rdl GABA reseptörünün şematik gösterimi (Goff vd. 2005).

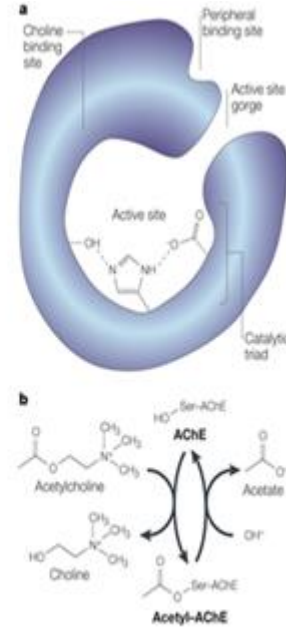
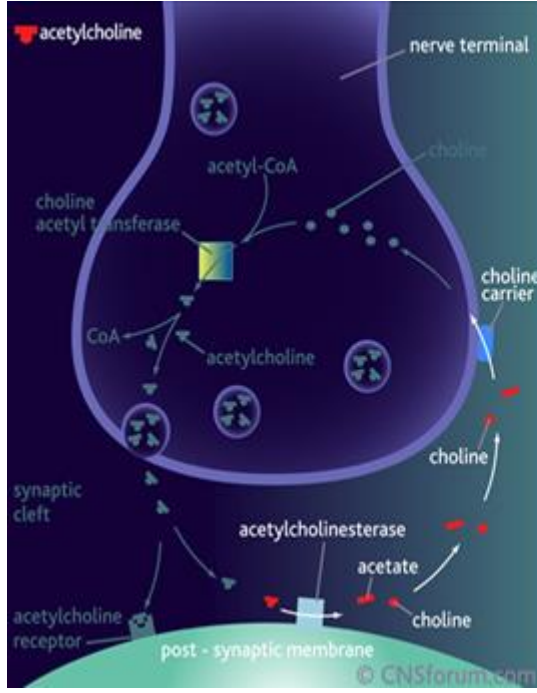
5.1.3.2.3.2. Sodyum kanal proteini

Voltaja duyarlı sodyum kanal proteinleri, sinir hücrelerinde bulunurlar ve piretroid grubu insektisitlerin vücuttaki birincil hedefleridirler. Bu proteinlerde hedef bölgedeki duyarsızlaşma karasineklerde çalışılmış ve Leu1014Phe mutasyonunun direnç kazanımında rol aldığı belirtilmiştir. İlaveten daha yüksek piretroid kullanımına bağlı olarak Met918Thr mutasyonunun olduğu da tespit edilmiştir (Soderlund ve Knipple, 2003; Rinkevich vd. 2006; Taşkın vd. 2011). Taşkın vd. 2011 yılında yaptıkları çalışmada Türkiye'den örnekledikleri *M. domestica* örneklerinde Vssc1 duyarlı allel frekanslarını Ege için 0.75 ve Akdeniz için 0.69 olarak bildirmişlerdir (Taşkın vd. 2011).

5.1.3.2.3.3. Asetilkolinesteraz (AKE) enzimi

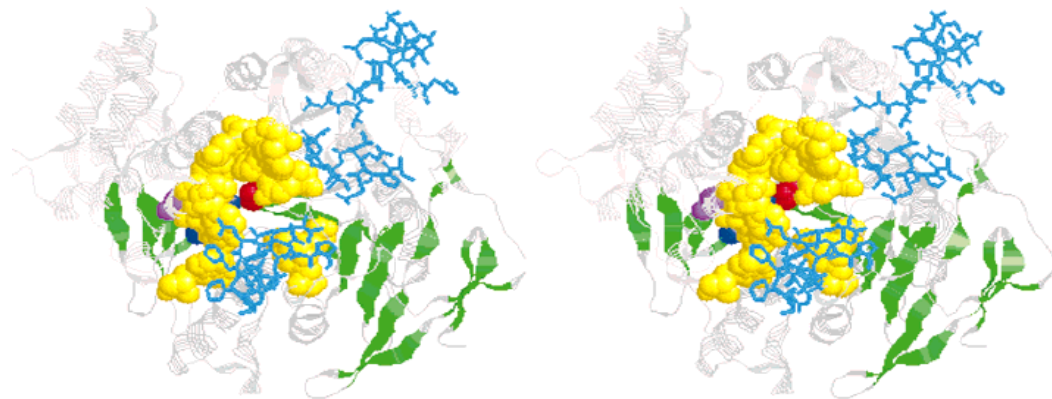
Kolinesterazlar iki büyük gruba ayrılırlar, bunlar AKE ve butirilkolinesteraz (BKE)'dir. Böceklerde, *Ace* geni tarafından kodlanan AKE enzimi kolinerjik sinapsisinde nörotransmitter asetilkolini hidrolizler ve asetil kolin seviyesini düzenler. Asetilkolin (ACh) sinir iletilerinin sinapslardan geçişini kolaylaştırır. ACh, AKE enzimi tarafından kolin ve asetata dönüştürülür (Chen vd. 2001).

AKE enziminin sinir hücrelerindeki fonksiyonu ise şu şekilde gerçekleşmektedir; sinir hücrelerinde akson boyunca sodyum ve potasyum kanalları bulunmaktadır. Uyarı geldiğinde sodyum kanalları açılır ve sinir hücresi depolarize olur. Uyarı yeterince şiddetli olursa aksiyon potansiyeli oluşur. Sodyum kanallarının açılmasına bağlı olarak potasyum kanalları açılarak hücre repolarize olur. Hücre dışına potasyum çıkışı olur. Aksiyon potansiyeli sinir ucuna geldiğinde kalsiyum kanalları açılır. Bu sırada; krebs döngüsünden ayrılan asetilkoenzimA ve kolin, kolinasetiltransferaz enzimi ile asetilkolini oluşturur. Hücreye giren kalsiyum veziküllerde biriken asetilkolinin presinaptik boşluğa salınmasını sağlar. Daha sonra asetilkolin post sinaptik membranda bulunan reseptöre bağlanır ve uyarının post sinaptik hücreye geçişini sağlar. Uyarının iletimini takiben asetilkolinesteraz enzimi asetilkolini asetat ve koline ayırır. Kolin tekrar kullanılmak üzere presinaptik hücreye geri döner (Şekil 5.5.) (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 5.5. Asetilkolin esterazın sinir hücrelerindeki fonksiyonu (Anonim, 2013g).

Asetilkolinesteraz enziminin 3 boyutlu yapısı ilk kez Sussman vd. (1991) tarafından *Torpedo californica*'da detaylı bir şekilde belirlenmiştir. Oakeshott vd. (1999) yılında yaptıkları çalışmada; *T. californica*'da enzimin α heliks ve β tabakalarından oluştuğunu, aktif merkezin çevresinde 14 rezidünün bulunduğunu (sarı renkli), aktif merkezde serin (kırmızı)-glutamat (lacivert) ve histidinin (mor) katalitik üçlüyü oluşturduğunu ve son olarak da molekülün yüzeyinde, üç adet substrat bağlanma bölgeleri (mavi) olduğunu belirtmişlerdir. Yeşil renkli bölgelerde β -kırıklı yapıyı göstermektedir (Şekil 5.6.).



Şekil 5.6. AKE enziminin 3 boyutlu yapısı (Oakeshott vd. 1999).

Zararlılarla mücadelede son 40 yılı aşkın süredir yaygın olarak kullanılan böcek ilaçları içerisinde organofosfatlar ve karbamatlar en çok kullanılanlar arasındadır. Organofosfat grubu insektisitlerin birincil hedefleri sinir sisteminde asetilkolinesteraz enzimidir. Bu enzimin organofosfat ve karbamat grubu insektisitlerin vücut içerisindeki primer hedeflerinden biri olduğu *Drosophila melanogaster* (Morton ve Singh, 1982), *Musca domestica* (Devonshire, 1975) ve *Bactrocera oleae* (Zouros vd. 1968)'da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Organofosfat ve karbamat grubu insektisitler asetilkolin analogu olarak çalışırlar (benzer yapısal formüle sahiptirler ve böylece reseptör ile aynı yerlerden bağ yapabilirler) ve AKE enziminin aktif bölgesinde bulunan serin aminoasidini fosforlayarak veya karbamatlayarak bu enzimin geri dönüşümsüz ya da çok düşük seviyede geri dönüşümlü olarak inhibe olmasına yol açarlar. Bu durumda asetilkolin hidroliz olmasına rağmen, insektisitler, enzim-substrat kompleksi olarak sabit kalırlar. Böylelikle, asetilkolin sinapslarda birikerek asetilkolin reseptörlerinin kalıcı olarak açık kalmasına sebep olur ve de canlılığın ölümü gerçekleşir (Chen vd. 2001).

Asetilkolinesteraz enziminin normal koşullarda ve insektisit varlığındaki çalışma mekanizması şu şekildedir; normal koşulda enzim substrat ile reaksiyona girerek ürünü oluşturur. Ancak ortamda insektisit varsa enzim insektisit fosforlanmış ya da karbamatlanmış kısmı ile birleşir. Enzimin bu fosfor ya da karbamat grubundan ayrılmasının çok uzun süre almasından dolayı bu süreç geri dönüşümsüz olarak kabul edilir (Shi, 2002).

Russell vd. 2004 yılında yaptıkları çalışmada böceklerde organofosfat ve karbamat grubu insektisitlere AKE enzimi temelinde meydana gelen duyarsızlaşma mekanizmalarını detaylı bir şekilde açıklamışlardır. Araştırmacılar biyodenemeler ve biyokimyasal analiz verilerinin karşılaştırılması sonucunda başlıca iki modelin hedef bölgelerin karbamat ve organofosfatlara karşı direnç gösterdiğini ileri sürmektedir. Model I direncinde organofosfatlara oranla karbamat grubu insektisitlere karşı daha yüksek seviyede direnç oluşumu söz konusudur. Model II direncinde direnç seviyeleri hem karbamatlar hemde organofosfatlar için yaklaşık olarak eşit seviyelerdedir ve hatta bazı durumlarda organofosfatlara özgüdür. Diptera ile bu direnç modeli üzerine yapılan moleküler araştırmalar göstermiştir ki gösterilen direncin AKE aktif bölgesinde bulunan kanalın kısıtlanmasından ve insektisit bu

kanal üzerindeki katalitik bölgelerle bağlanmasını kısıtlanmasından kaynaklanmaktadır.

Bunun yanı sıra çeşitli böcek türlerinde bu insektisitlere bağlı olarak AKE enziminin hedef bölgesinde meydana gelen mutasyonlara bağlı oluşan direnç gelişimi çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Fournier vd. 1992; Mutero vd. 1994; Williamson vd. 1992; Kozaki vd. 2001; Vontas vd. 2002; Kakani vd. 2008b).

İnsektisite duyarsızlık, böcek türleri arasında çeşitlidir; çünkü farklı mutasyonlar, direnç ve farklı *Ace* gen ürünleri sağlayabilmektedir. Yüksek Diptera'lar haricinde (*D. melanogaster*, *M. domestica*, *L. cuprina* ve *B. oleae*) bugüne kadar yapılan takson çalışmalarında eski bir duplikasyon sonucu korunmuş görünen *Ace-1* ve *Ace-2* olmak üzere iki adet *Ace* gen ürünü sivrisineklerde (Malcolm vd. 1998) ve aphidlerde [*A. gossypi* (Li vd. 2002) ve *M. persicae* (Nabeshima vd. 2003)] bulunmaktadır.

Sivrisineklerde, en az üç türün popülasyon alanlarında dirençle ilişkili *Ace-1* lokusunda Gly119Ser mutasyonu yüksek seviyede karbamat direncini vermektedir (Weill vd. 2003). *Culex tritaeniorhynchus*'larda *ace-1*'deki farklı mutasyon (Phe331Trp, *Torpedo*) organofosfat ve karbamat direnci ile ilişkilidir (Nabeshima vd. 2004); ayrıca bu kodon, *M. persicae* ve *Tetranychus urticae*'lerde mutasyona uğramıştır (Anazawa vd. 2003).

D. melanogaster'lerde sadece tek bir *Ace* geni, *Ace-2* bulunmaktadır (Weill vd. 2003; Fournier vd. 1989) ve dirençli soylarda çeşitli nokta mutasyonları tanımlanmıştır (Mutero vd. 1994; Menozzi vd. 2004). Dirençli *M. domestica*'nın *Ace* geninde 5 mutasyon rapor edilmiştir (Walsh vd. 2001). Zeytin sineğinde ise aktif merkezde 2 mutasyon (Gly488Ser ve Ile214Val) (Şekil 5.7.) (Hawkes vd. 2005) ve bunun yanı sıra ekzon10 içerisinde bulunan 9 baz çifti (bç)'lik delesyon tanımlanmıştır (Şekil 5.8.) (Kakani vd. 2008b). Gly488Ser, zeytin sineği için özgünken, Ile214Val, hem *D. melanogaster* hem de *M. domestica*'da tespit edilmiştir.

A Gly488Ser

```

                                     488
                                     S      Dirençli
                                     AGC
CACACCAGCTGGGTTGGTAATCCGGGTTTGGAAAATCAGCAGCAAATCGGGCGCGCAGTGGGCGATCAC
H T S W V G N P G L E N Q Q Q I G R A V G D H Duyarlı

TTCTTCACCTGCCCGACTAATGAGTATGCCCAAGCGTTG
F F P T C T N E Y A Q A L
```

B Ile214Val

```

                                     V
                                     GTA      Dirençli
GGCTTACCCGTGCTTATTTGGATTTACGGTGGTGGCTTCATGACCGGCACCTGCCACACTGGGATATATAC
G L P V L I W I Y G G G F M T G T A T L D I Y Duyarlı
                                     214

AATGCG .....GCACCCGGCAATGTGGGGTTGTGGGATCAGGCATTGGCTATACGTGGCTG
N A      A F G N V G L W D Q A L A I R W L
```

Şekil 5.7. Zeytin sineği *Ace* exon 6 (A) ve exon 3 (B)'deki mutasyon bölgeleri (Hawkes vd. 2005).

```

wt   TGAAGTCAAACCATCATCCGCTTCCTCCCTGCAACAACAGCAACAACACTTGCTACTG
mut  TGAAGTCAAACCATCATCCGCTTCCTCCCTGCAACAACA-----CTTGCTACTG
      E V K P S S A S S L Q Q Q Q Q H L L L

wt   CAACAAAGGAGCATCGTGGCGTTCATGTTGGCGCTGTC
mut  CAACAAAGGAGCATCGTGGCGTTCATGTTGGCGCTGTC Delesyon Bölgesi
      Q Q R S I V A F M L A L
```

Şekil 5.8. Zeytin sineği *Ace* exon 10 mutasyon bölgesi (Kakani vd. 2008b).

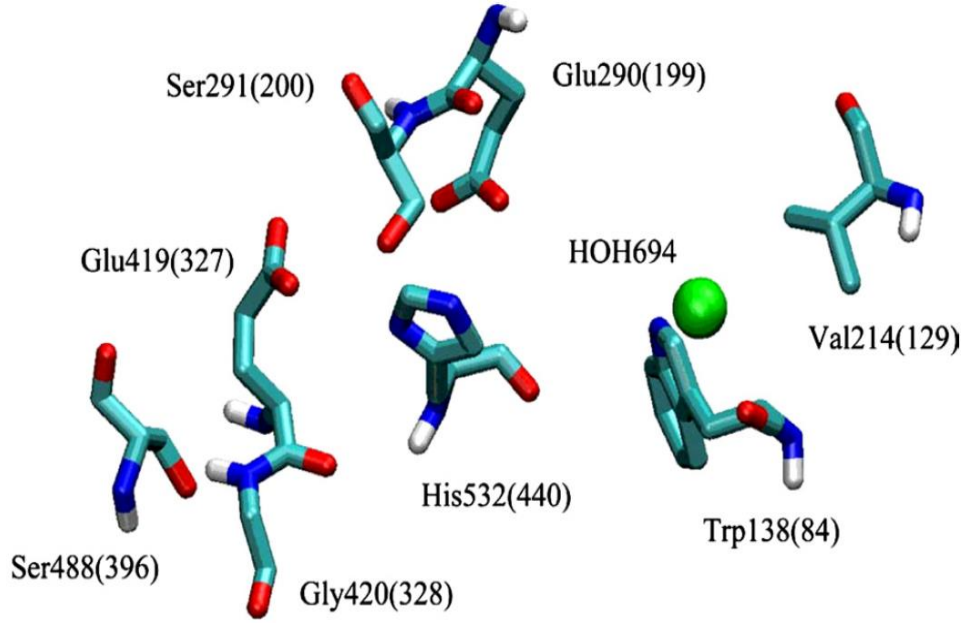
Zeytin sineğinde AKE enzimini kodlayan *Ace* geni 2023 nükleotid uzunluğundadır ve bu genin kodlamış olduğu protein 674 aminoasitten oluşmaktadır (Genbank erişim no: AF452052) (Hawkes vd. 2005). Gly488Ser mutasyonu, aktif merkezin yapısını bozan büyük serin yapısı nedeniyle sterik engel yaratarak insektisit toleransını sağlamaktadır ve böylelikle de insektisit erişimini engellemektedir (Vontas vd. 2002; 2003). Sadece bu mutasyon insektisite karşı 8 kat direnç sağlamaktadır. Gly488Ser mutasyonu genellikle, Ile214Val ile bağlantılı olarak ortaya çıkmıştır ve bu kombinasyonla insektisit direncinin 16 kat arttırdığı, Avrupa'dan toplanan tüm zeytin sineği örneklerinde bulunmuştur (Vontas vd. 2001). Shi ve arkadaşları (2004)

yılında *D. melanogaster* ile yaptıkları çalışmada Ile214Val mutasyonunun insektisitlere bağlanma oranını düşürerek, ek bir tolerans sağlandığını belirtmişlerdir. Gly488Ser değişikliği, göreceli olarak büyük insektisit moleküllerinin inhibisyonunu azaltıyor gibi görünse de, asetilkolin tarafından erişimi etkileyebilir. Buna ek olarak, hem substrat dönüşümü hem de organofosfat inhibisyonunda kovalent bağlanmayı şekillendirmek için, 488Ser'in O γ 'si ve komşu Gly420'nin amid protonu arasındaki potansiyel hidrojen bağı, katalitik Glu419 [*Torpedo* 327]'un hareketini engelleyebilir. Bundan dolayı, insektisitlerin zararlı etkilerini sınırlayıcı Gly488Ser değişikliği, ayrıca uygun koşullar altında asetilkolin dönüşümünü de gerçekleştirebilir. Asetilkolinin hidrolizi sırasında, açılasyon biçimlemesinden boyutları etkilenen substratların ikincil kataliz prosesinden (Glu290 ve suyun doğrudan etkilendiği bazik kataliz) geçtiği düşünülmektedir. Bu durum ancak, Glu290'a [*Torpedo* 199] komşu pozisyonda bir su molekülünün mevcut olmasıyla gerçekleşmektedir (Selwood vd. 1993).

Ile214 [*Torpedo* 129], aktif merkezde değildir, fakat Trp138'e [*Torpedo* 84] çok yakın bir konumda bulunur. Valin, gerçekte bu enzim için yabancı-tip bir aminoasittir (Zhu ve Clark, 1995; Simon ve Massoulie, 1997). Valinin olduğu ve suyun çözücü molekül olarak tanımlandığı tüm yapılarda, bir molekül su, Trp138'e (*Ace* 2 yapısında HOH694, Şekil 5.9.) bitişik olarak bulunur. İzolösine göre valin aminoasitinin olması (daha küçük), aktif merkeze komşu su molekülünü gömülü hale getirmeyi kolaylaştırmaktadır.

Aktif merkezden, olası bir arka kapının (back door) aracılığıyla, hidroliz reaksiyonunun ilk ürününün kaçışının düzenlenmesinde, Trp138 kilit aminoasit olarak gösterilmiştir (Ripoll vd. 1993; Bartolucci vd. 1999). Arka kapı, Trp138'in [*Torpedo* 84] hareketi, çevresindeki aminoasitlerle, muhtemelen de komşu pozisyon 214'le düzenlenmektedir. İzolösünün rotasyonu, triptofanın hareketine ve reaksiyon ürünlerinin etkinleştirilmesine izin vermektedir. Ancak, valin mutasyonu ile (daha küçük yan zincirine sahip olmasından dolayı) reaksiyon ürünlerinin çıkışı daha kolay olmaktadır. Eğer Gly488Ser'in sterik engeliyle katalitik aktiviteden ödün verilirse, pozisyon 214'de izolösinden valine küçük bir değişiklikle, asetilkolin katalitik prosesi kolaylaştırılır ve bu durum nörotransmitter dönüşümünü arttırmada yeterli olabilir. Bu nedenle, Ile214Val ve Gly488Ser arasında sıkı bir bağlantı olduğu düşünülmektedir. Çünkü Gly488Ser yalnızken AKE'nin fonksiyonuna daha az zarar

verirken, bu mutasyonların kombinasyonu, insektisit duyarsızlığını sağlamaktadır (Hawkes vd. 2005).



Şekil 5.9. AKE enzimidaki katalitik aminoasitler (Hawkes vd. 2005).

Kakani vd. (2008b) yılında yaptıkları çalışmada enzimin katalitik merkezinin dışında bulunan bir mutasyonun ($\Delta 3Q$) rolünü açıklamışlardır. $\Delta 3Q$ ekzon 10 içerisindeki üç aminoasitlik bir delesyondur. *Drosophila* ve *Musca* türlerinde yapılan detaylı analizler AKE enziminin ana formunun membrana bağlı dimer olduğunu göstermektedir. AKE enzimi, aktivitesini ya da substrata afinitesini önemli bir seviyede değiştirmeyen birkaç post-translasyonel modifikasyona uğramaktadır. Ancak AKE'nin düzgün fonksiyonu için, etkili bir katalitik aktiviteye ek olarak enzimin doğru lokasyonu da gerekmektedir (Fournier vd. 1992; Mutero ve Fournier, 1992; Chaabihi vd. 1994; Estrada-Mondaca vd. 1998).

AKE'nin düzgün lokasyonunda en önemli rolü oynayan modifikasyon, enzimin hidrofobik karboksil-terminal domaininde olan bir bölünme ve bunun glycosylphosphatidylinositol (GPI) çapa (anchor) ile değişimidir. GPI birçok hücre yüzey proteininin plazma membranına sabitlenmesinde görev almaktadır (Massoulie vd. 1993).

$\Delta 3Q$ mutasyonu, üç glutamin aminoasiti delesyonu ile uzun (16 amino asitlik) hidrofilik bağlanma bölgesini kısaltır ve böylece proses için gereken ön koşulları iyileştirmesinden dolayı gerçekleşmektedir. Mutant $\Delta 3Q$ sineklerde AKE'yi daha

etkin GPI modifikasyonlarına uğramaktadır ve böylece yabancıl tip sineklerden daha fazla sabitlenmiş molekül üretmektedir. Benzer şekilde, $\Delta 3Q$ mutant sineklerde hem etkili asetilkolin metabolizması için hem de insektisit ile etkileşim için yeterli miktarda enzim vardır. Sonuç olarak asetilkolin sinaptik yarığa birikmez ve böcek daha yüksek insektisit dozlarında da hayatta kalabilir (Kakani vd. 2008b).

AKE saniyede 10^4 substrat molekül hidroliz hızı ile bilinen en hızlı enzimlerden biridir ve enzimatik aktivite hızı, sadece substratına difüzyon hızı ile sınırlıdır (Quinn, 1987). Büyük miktarlarda insektisit bulunduğu durumlarda büyük oranda enzim normal fonksiyonunu yerine getirmektedir ve böcek bu durumu GPI sabitlenmesinin optimizasyonu ile telafi etmektedir. Böylece enzimin lokasyonu kolaylaştırılmış olmaktadır ve sinaptik yarığa daha fazla enzim getirilmektedir (Kakani vd. 2008b).

5.2. Literatür Özeti

Ülkemiz ekonomisinde önemli bir yeri olan zeytin yetiştiriciliğinde, verim ve kalitenin artırılması büyük bir önem taşımaktadır. Zeytin sineğinin genetik yapısının aydınlatılması, bu organizmanın orijini ve dünya üzerindeki yayılımının anlaşılmasına katkıda bulunmasının yanı sıra zeytin alanlarında büyük ekonomik kayıplara yol açan bu canlının kontrolü diğer bir deyişle populasyonların ekonomik zarar eşiğinin altında tutulması için de son derece önemlidir.

Zeytin sineğinde AKE enzimini kodlayan, nükleer bir gen olan, *Ace* geninde meydana gelen nokta mutasyonlar sonucu bu enzimde ekzon3 içerisinde Ile214Val ve ekzon6 içerisinde Gly488Ser değişikliklerinin (Vontas vd. 2002), ve ekzon10 bölgesinde meydana gelen 9 bç'lik (3 amino asit) bir delesyonun (Kakani vd. 2008b) organofosfat insektisitlerine karşı direnç gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir.

Stasinakis vd. (2001) *B. oleae*'nın biyodeneme ve *Est-A* ve *Est-B* lokuslarının jel elektroforezi yöntemini kullanarak, laboratuvar popülasyonlarının dimethoate direnci için başarılı bir şekilde seçildiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında insektisitlere bağlı olarak allel frekanslarında değişim olduğunu gözlemlemişlerdir.

Hawkes vd. (2005) Akdeniz havzasından, Yunanistan, Arnavutluk, İtalya, Fransa ve İspanya'dan olmak üzere topladıkları zeytin sineği örneklerinde *Ace* geninde enzimin 214 ve 488 numaralı aminoasit pozisyonlarını kodlayan bölgelerini PCR-RFLP yöntemi ile incelemişler ve populasyonlarda bu iki mutasyonun frekansını bulmuşlardır. Buna göre bu iki mutasyon sıklığının, organofosfat insektisit kullanım yoğunluğuna da bağlı olarak, Yunanistan-İtalya-Arnavutluk'ta çok yüksek olduğu Fransa-İspanya doğrultusunda ise giderek azaldığını belirlemişlerdir.

Nardi vd. (2006) yaptıkları çalışmada ise Pakistan, Afrika, Avrupa (Akdeniz havzası) ve Amerika'dan 17 farklı lokasyondan toplamış oldukları örneklerde *Ace* geninin kısmi baz dizi analizini (ekzon 3 ve ekzon 6) yaparak bu iki mutasyonun populasyonlardaki görülme sıklığını bulmuşlardır. Ekzon 3 için gen çeşitliliği değerlerini Pakistan, Afrika, Akdeniz, Orta Doğu ve Amerika için sırasıyla; 0.35, 0.94, 0.49, 0.91 ve 0.77 ve ekzon 6 için Pakistan, Afrika, Akdeniz, Orta Doğu ve Amerika için sırasıyla; 0.00, 0.56, 0.49, 0.57 ve 0.60 olarak bildirmişlerdir.

Araştırma sonuçları genel olarak Hawkes vd. (2005) sonuçlarını doğrulamakla birlikte bu iki direnç mutasyonunun, özellikle Ile214Val, orijin noktasının özelde ülkemizin Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgesi genelinde ise Ortadoğu bölgesi olabileceğini ve bu noktadan itibaren organofosfat insektisit baskısında bağlı olarak Akdeniz havzasında doğru bugünkü allelik dağılımın gerçekleşmiş olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Skouras vd. (2007) Yunanistan ve Kıbrıs'tan topladıkları *B. oleae* popülasyonlarının dimethoate direnç seviyelerini sırasıyla 31 ve 9 kat olarak belirlemiştir. Yazarlar, en büyük değer Girit popülasyonunda olmak üzere; 6.3- 64.4 değişim aralığıyla direnç seviyelerinde önemli bir çeşitlilik bulmuşlardır.

Margaritopoulos vd. (2008) α -cypermethrin gibi pyrethroidlere *B. oleae*'ların direncini tanımlamıştır. Yunanistan'daki 20 *B. oleae* popülasyonunun, karboksilesteraz ve glutatyon-s-transferaz aktivitesine bağlı olarak α -cypermethrin hassasiyeti geliştirdiği ve direnç değerlerinin 2.3- 54.7 aralığında olduğunu belirtmişlerdir. Sonuçlarında sitokrom P450 monoooksijenaz aktivitesinin dirençle ilişkili olduğu ve PCR-RFLP testine dayalı olarak Gly488Ser direnç mutasyonunun olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Yazarlar, α -cypermethrin kullanımına devam edilebileceği sonucuna ulaşmıştır fakat artan direnç seviyeleri için devamlı takibin önemine dikkat çekmişlerdir.

Vontas vd. (2011) Tephritidae sineklerinde insektisit direncine ilişkin biyokimyasal ve moleküler temelli mekanizmaları derlemiştir. Araştırmacılar çeşitli insektisit gruplarına karşı oluşan direncin yönetimi üzerine biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanarak takip edilmesine dikkat çekmişlerdir.

Başkurt vd. (2011) yılında 214 ve 488 numaralı aminoasit değişikliği için PCR-RFLP, ekzon10 bölgesi için ise PAGE yöntemi kullanarak yapmış oldukları çalışmada, Ege Bölgesindeki zeytin sineği popülasyonlarının Yunanistan-İtalya-Arnavutluk'ta bulunan oranın altında, Fransa-İspanya'daki oranın ise üstünde bir sıklıkla organofosfat direnç mutasyonlarını taşıdığını göstermiştir. Bunun yanı sıra farklı insektisit mücadele yöntemleri uygulanan ve uzun yıllardır hiçbir insektisit etkisine maruz kalmamış bölgeler arasında organofosfat direnç mutasyonlarının frekansları arasında önemli bir fark bulamamışlardır.

5.3. Amaç

Türkiye’de tarım yapılan alanların büyük bir bölümünde organofosfat grubu insektisitler başta olmak üzere çok yoğun bir insektisit uygulaması yapılmaktadır. Biyokimyasal yöntemler bu alanlardaki direnç seviyelerini tespit etmede kullanışlı olmakla birlikte direnç kazanımına neden olan mutasyonların belirlenmesinde kullanılamamaktadırlar. Bu nedenden dolayı doğal popülasyonlardaki bireylerde *Ace* genindeki direnç kazanımını sağlayan mutasyon frekanslarının moleküler seviyede belirlenmesi oldukça önem arz etmektedir.

Çalışmamızın bu bölümünde, tez çalışmamızın birinci bölümünde belirtilen 12 lokasyondan toplanan zeytin sineği örneklerinde AKE enzimini kodlayan, *Ace* geninin bu organizmada organofosfat insektisit direncinde önemli bir rol oynayan 214 ve 488 numaralı noktaları içeren kısımlarının baz dizi analizi yapılmak suretiyle ve ekzon10 içerisinde bulunan 9 bç’lik delesyon bölgesinin ise poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemi kullanılarak çalışılan bireylerdeki organofosfat direnç mutasyonlarının sıklığının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca 214 ve 488 numaralı bölgelerde enzimde duyarsızlaşmaya yol açan ve daha önceden belirlenen aminoasit değişiklikleri dışında farklı aminoasit değişiklikleri olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Böylelikle zeytin sineği popülasyonlarının genetik olarak potansiyel direnç seviyelerinin belirlenmesi ve daha bilinçli ve etkili ilaçlama stratejilerinin geliştirilmesi ile hem ekonomik kazanç sağlanması hem de doğada sayıları her yıl daha da artan dirençli bireylerin gelişiminin önlenmesi amaçlanmaktadır. Bununla birlikte elde edilen baz dizilerinin dünyanın değişik bölgelerinde ki zeytin sineği örneklerinin çalışılması ile elde edilen ve GenBankası’na kaydedilen *Ace* genine ait diğer baz dizileri ile karşılaştırılarak organofosfat insektisit direnç mutasyonlarının orijini ve yayılımı hakkında daha detaylı bilgiler elde edilmesi de amaçlanmaktadır.

6. MALZEME VE YÖNTEM

6.1. *Ace* Geninin Çoğaltılması ve Kısmi Baz Dizi Analizi

İnsektisit direncinde önemli bir rolü olan *Ace* genindeki organofosfat direnç mutasyon frekanslarının belirlenmesi amacıyla birinci bölümde belirtilen 12 ile ait 38 farklı lokasyondan toplanan zeytin sineği örnekleri incelenmiştir. Her lokasyondan 8 adet birey olmak üzere toplam 304 birey kullanılmıştır.

6.1.1. *Ace* geni ekzon 3 bölgesinin çoğaltılması

Ekzon 3 bölgesine ait 521bç'lik bölgenin çoğaltılması için BoAce_518F: 5'-TACTCAATTTCACTTTCAGCACTC-3' ve BoAce_1040R: 5'-CAACTCACCGACAATAGCG-3' primer çifti kullanılmıştır. Çoğaltma işlemi için Çizelge 6.1.'de verilen PCR reaksiyon karışımı uygulanmıştır ve PCR reaksiyon şartları Nardi vd. (2006)'nın uygulamış olduğu şartlar modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir.

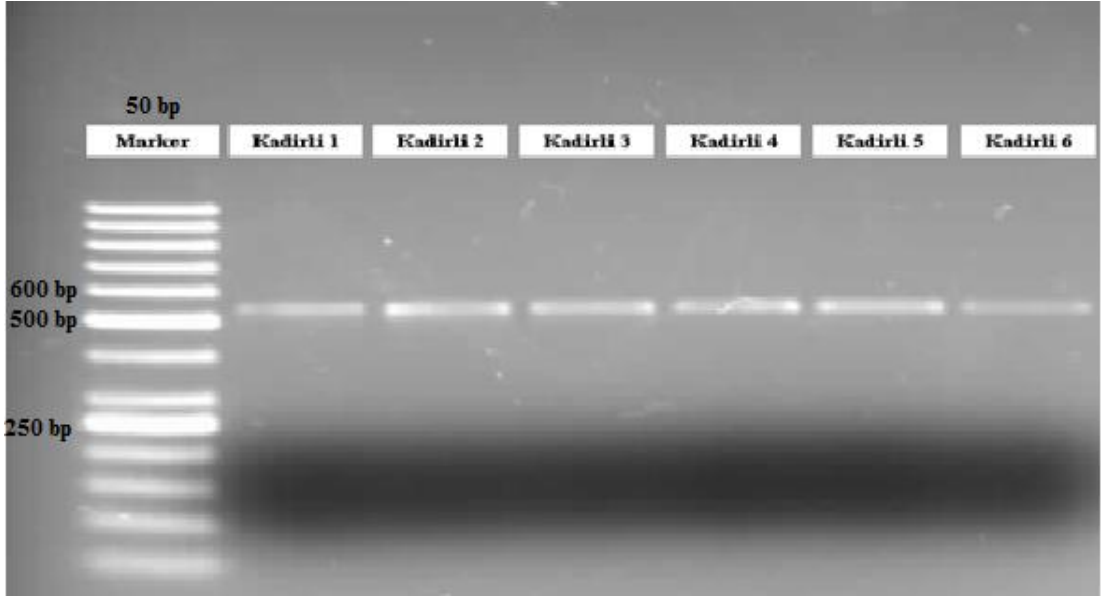
Çizelge 6.1. Ekzon 3 bölgesinin çoğaltılması sırasında kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyon ve miktarları.

PCR Bileşenleri	
ddH ₂ O	14,3 µl
dNTP (0,2 mM)	4 µl
PCR Tamponu (10X)	2,5 µl
Taq polimeraz (1ünite) (Fermentas)	0,2 µl
DNA (10 ng/ml)	1 µl
Primer ₁ ve primer ₂ (3 pmol)	1 µl
MgCl ₂ (2 mM)	2 µl
Toplam reaksiyon hacmi	25 µl

PCR reaksiyonlarımız Eppendorf Mastercycler Gradient Thermalcycler'da gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.6.). Reaksiyon döngü koşulları;

İlk Denatürasyon	94 °C' de 5 dk	} 35 döngü
Denatürasyon	94 °C' de 1 dk	
Bağlanma	54 °C' de 40 sn.	
Uzama	72 °C' de 1 dk 30 sn.	
Son Uzama	72 °C' de 10 dk	
+4 °C		

olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri yaklaşık miktar ve kalite açısından kontrol edilmek amacıyla % 1.5' luk agaroz jelde 1 µl ürün, 1µl boya karıştırılarak 80 Volt sabit akımda yürütülmüş ve görüntüleme cihazında görüntülenmiştir (Şekil 6.1.).



Şekil 6.1. BoAce_518F ve BoAce_1040R primerleri kullanılarak Kadirli örneklerinden elde edilen ekzon 3 bölgesi PCR ürünlerine ait yaklaşık 570bp'lik DNA bant görünümüleri

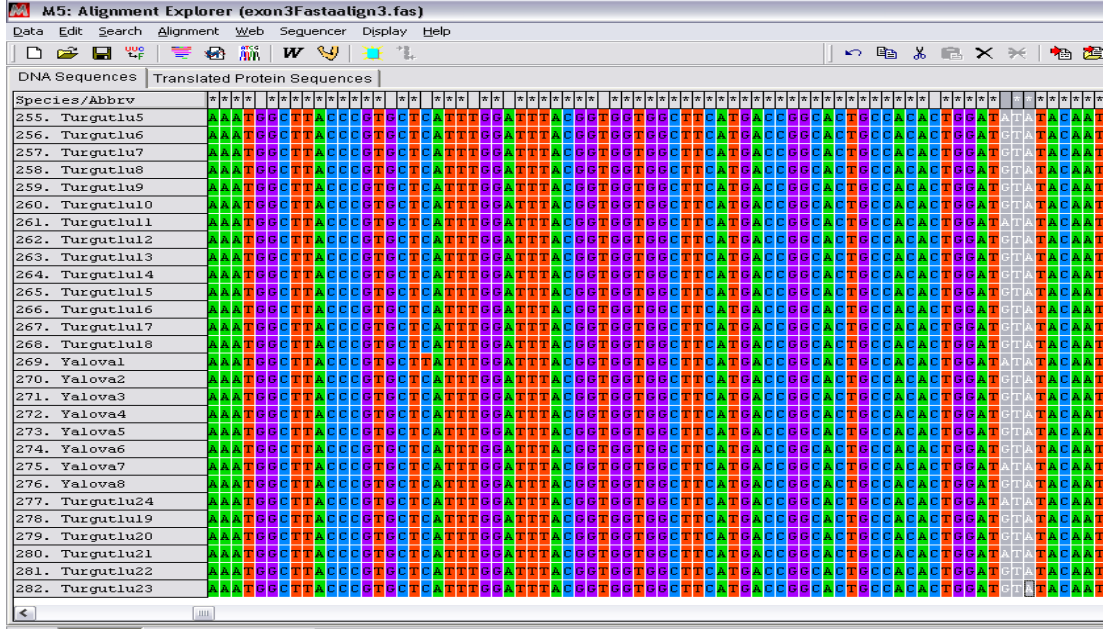
Daha sonra istenilen uzunluğa sahip örnekler tekrar % 1.5' luk agaroz jelde yürütülerek jelden dikkatlice kesilmiş ve jelden DNA izolasyon kiti vasıtası ile (üretici firmanın önerdiği basamaklar takip edilerek) izole edilmiştir. Elde edilen ürünün miktar tayini spektrofotometrede yapılmış ve baz dizi analizi yaptırılmak ilgili firmaya gönderilmiştir. Her bir örnekte baz dizi analizi için BoAce_518F ve

BoAce_1040R primerleri kullanılmış ve ilgili bölgenin büyüklüğünden dolayı iki yönlü okumalar yaptırılmıştır. Ekzon3 bölgesinin baz dizi analizi sonucu elde edilen dizilere ait örnek Şekil 6.2.'de sunulmuştur.

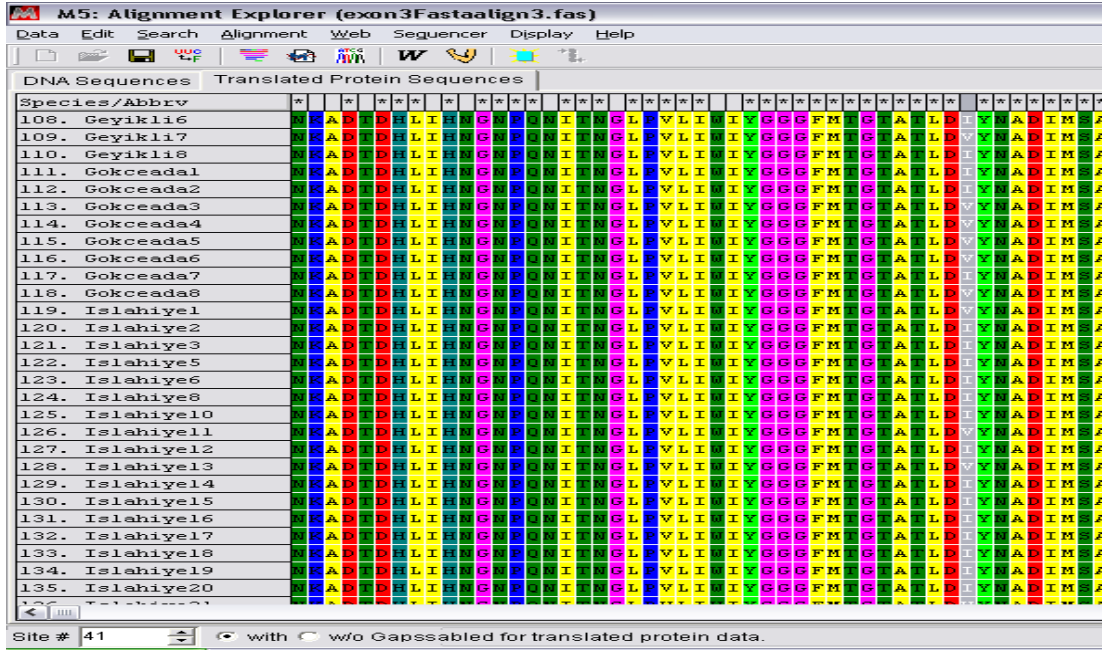


Şekil 6.2. Ekzon3 bölgesine ait baz dizisi FinchTV programında açılarak görsel olarak kontrol edilmiştir.

Bunun yanı sıra organofosfat ve karbamat grubu insektisitlere dirençte önemli rol oynayan asetilkolin esteraz enzimini kodlayan genin ekzon 3 bölgesinde gözlenen İle-Val (ATA-GTA) mutasyonu MEGA programında dizilerin açılması ve MEGA içerisinde bulunan ClustalW analizi ile hizalanmasının ardından manuel olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.3. ve Şekil 6.4.).



Şekil 6.3. Exon 3 bölgesine ait dizilerin MEGA programında hizalanması ve mutasyon bölgesinin incelenmesi.



Şekil 6.4. Exon 3 bölgesine ait dizilerin MEGA programı kullanılarak aminoasit dizine çevrilmesi ve mutasyon bölgesinin incelenmesi.

6.1.2. Ace geni ekzon 6 bölgesinin çoğaltılması

Ekzon 6 bölgesine ait 94 bp'lik bölgenin çoğaltılması için BoAce_1424F:5'-CAGCTGGGTTGGTAATCC-3' ve BoAce_1519R: 5'-TAGTGCACGGAAGCTCC-3' primer çifti kullanılmıştır. Çoğaltma işlemi ekzon3 bölgesinde olduğu gibi, Nardi vd. (2006) tarafından uygulanan yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon döngü koşulları;

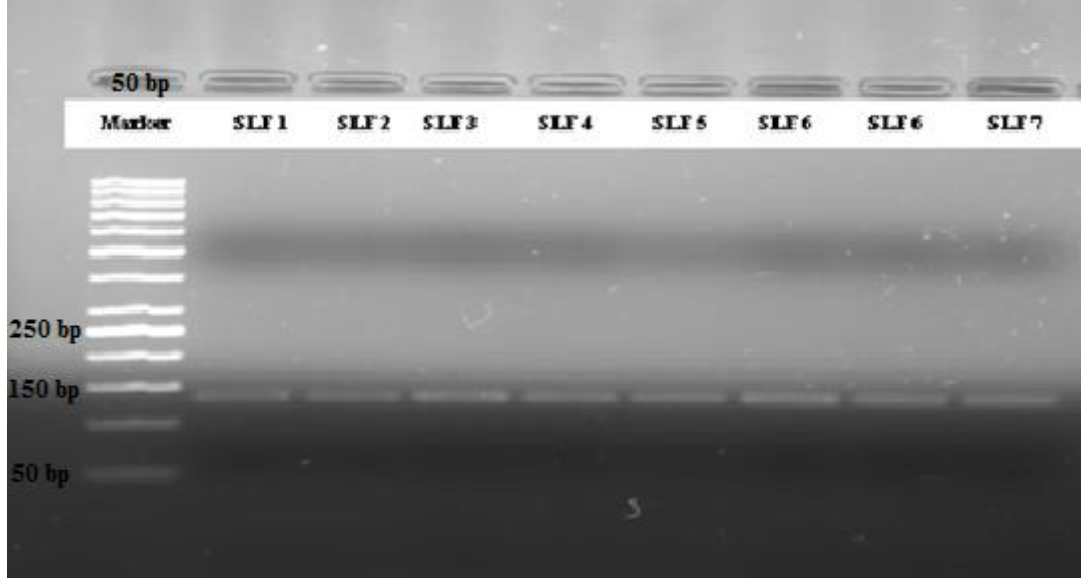
İlk Denatürasyon	94 °C' de 5 dk	} 35 döngü
Denatürasyon	95 °C' de 15 sn	
Bağlanma	60 °C' de 30 sn.	
Uzama	72 °C' de 45 sn.	
Son Uzama	72 °C' de 10 dk	
+4 °C		

olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR bileşenlerinin konsantrasyon ve miktarları Çizelge 6.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 6.2. Ekzon 6 bölgesinin çoğaltılması sırasında kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyon ve miktarları.

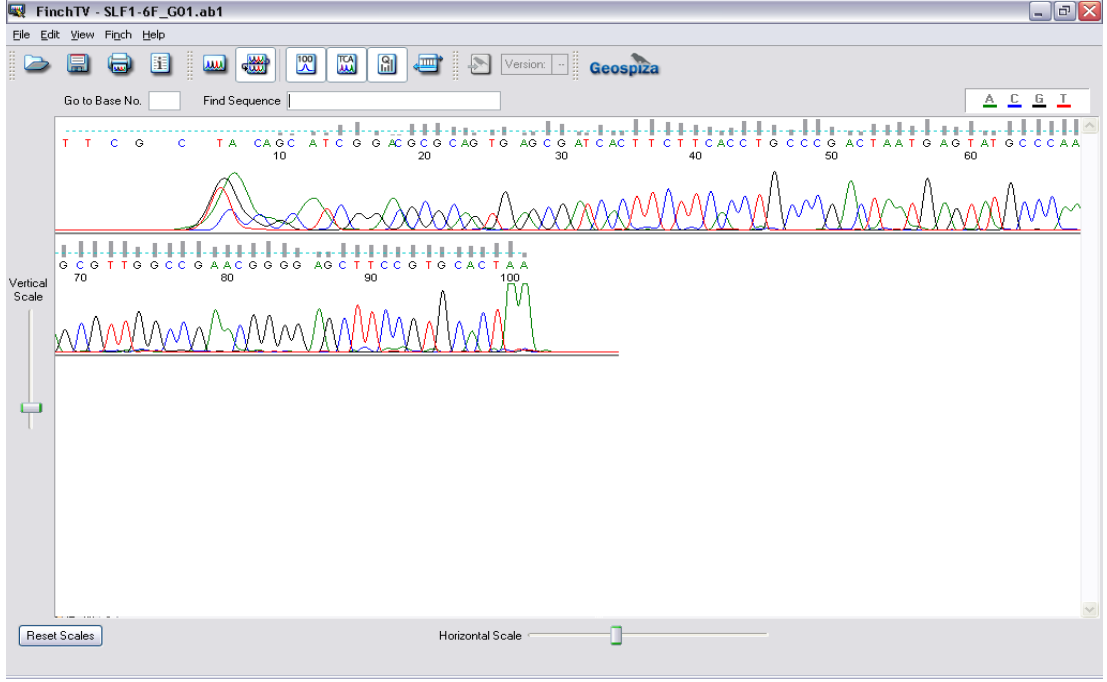
PCR Bileşenleri	
ddH ₂ O	14,3 µl
dNTP (0,2 mM)	4 µl
PCR Tamponu (10X)	2,5 µl
Taq polimeraz (1ünite) (Fermentas)	0,2 µl
DNA (10 ng/ml)	1 µl
Primer ₁ ve primer ₂ (3 pmol)	1 µl
MgCl ₂ (2 mM)	2 µl
Toplam reaksiyon hacmi	25 µl

Elde edilen PCR ürünleri yaklaşık miktar ve kalite açısından kontrol edilmek amacıyla % 2.5' luk agaroz jelde 1 µl ürün, 1µl boya karıştırılarak 80 Volt sabit akımda yürütülmüş ve görüntüleme cihazında görüntülenmiştir (Şekil 6.5.).



Şekil 6.5. BoAce_1424F ve BoAce_1519R primerleri kullanılarak Silifke örneklerinden elde edilen ekzon 6 bölgesi PCR ürünlerine ait yaklaşık 130bç'lik DNA bant görünümüleri

Daha sonra istenilen uzunluğa sahip örnekler tekrar % 2.5' luk agaroz jelde yürütülerek jelden dikkatlice kesilmiş ve jelden DNA izolasyon kiti vasıtası ile izole edilmiştir. Elde edilen ürünün miktar tayini spektrofotometrede yapılmış ve baz dizi analizi yaptırılmak ilgili firmaya gönderilmiştir. Her bir örnekte baz dizi analizi için BoAce_1424F ve BoAce_1519R primerleri kullanılmış ve okumalar sırasında meydana gelen dizi kayıplarını önlemek amacıyla iki yönlü okumalar yaptırılmıştır. Ekzon 6 bölgesinin baz dizi analizi sonucu elde edilen dizilere ait örnek Şekil 6.6.'da sunulmuştur.



Şekil 6.6. Ekzon 6 bölgesine ait baz dizisi FinchTV programında açılarak incelenmesi.

Bunun yanı sıra organofosfat ve karbamat grubu insektisitlere dirençte önemli rol oynayan asetilkolin esteraz enzimini kodlayan genin exon 6 bölgesinde gözlenen Gly-Ser (GGC-AGC) mutasyonu MEGA programında dizilerin açılması ve MEGA içerisinde bulunan ClustalW analizi ile hizalanmasının ardından manuel olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.7. ve Şekil 6.8.).

6.1.3. Ace geni ekzon 10 bölgesindeki delesyonun belirlenmesi

96bç'lik ekzon 10 bölgesi içerisinde bulunan 9 bç (3amino asit) uzunluğundaki delesyonun belirlenmesi sırasında ise Kakani vd. (2008b)'nın uygulamış olduğu yöntem izlenmiştir. Bu yöntemle göre ilgili bölgenin çoğaltılması sırasında Boace10F: 5'-TGAAGTCAAACCATCATCCG-3' ve Boace10R: 5'-GACAGCGCCAACATGAACG-3' primer çiftleri kullanılmıştır.

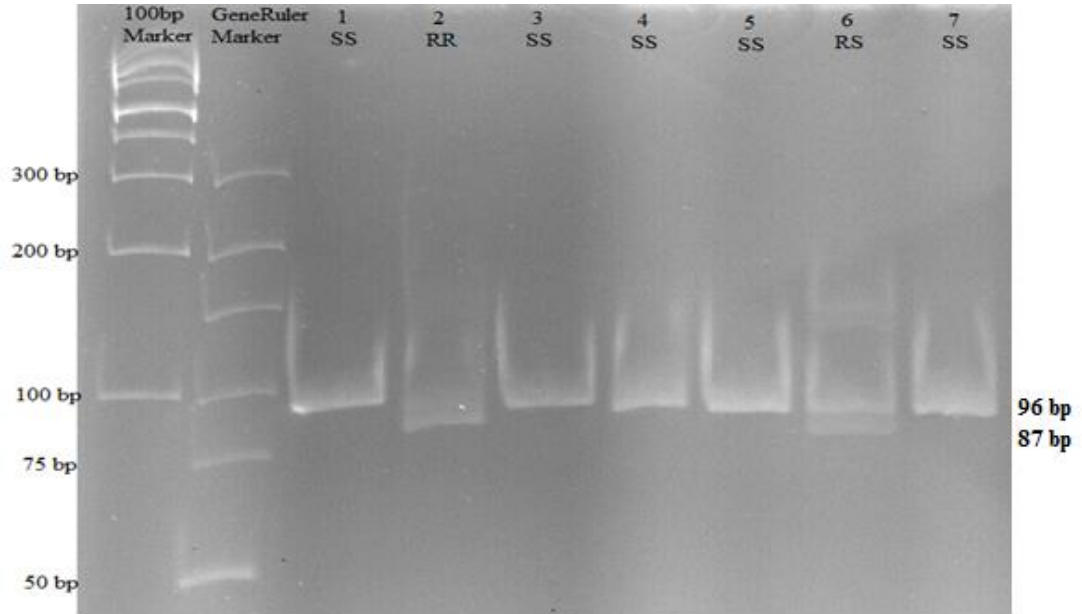
Reaksiyon döngü koşulları;

İlk Denatürasyon	94 °C' de 5 dk	} 30 döngü
Denatürasyon	94 °C' de 1 dk	
Bağlanma	51 °C' de 30 sn.	
Uzama	72 °C' de 30 sn.	
Son Uzama	72 °C' de 7 dk	
+4 °C		

olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sırasında kullanılacak bileşenlerin konsantrasyon ve miktarları Çizelge 6.2.'de sunulan ekzon 6 için kullanılan konsantrasyon ve miktarlarla aynıdır. Elde edilen ürünler %10'luk doğal-poliakrilamid jelde yürütülmüş ve ethidium bromid ile boyanmak sureti ile delesyon bölgesinin var olup olmadığı belirlenmiştir (Şekil 6.9. ve Şekil 6.10.). %10'luk doğal-poliakrilamid jelin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları Çizelge 6.3.'de verilmiştir.



Şekil 6.9. Ekzon 10 bölgesinin yürütülmesi sırasında kullanılan dikey elektroforez sistemi.



Şekil 6.10. Exon 10 bölgesine ait PCR ürünleri. Duyarlı (SS, kuyu 1, 3, 4, 5 ve 7), dirençli (RR, kuyu 2) ve heterozigot (RS, kuyu 6) bireylerin jel görüntüsü.

Çizelge 6.3. %10' luk doğal-poliakrilamid jel bileşenlerinin konsantrasyon ve miktarları.

%10' luk doğal-poliakrilamid jel bileşenleri	
dH ₂ O	18,3 ml
TBE Buffer (1X)	11.25 ml
Akrilamid-Bisakrilamid (29:1)	15 ml
Amonyum persülfat (APS) (%10)	225 µl
Gazdan arındırma (15 dk)	
TEMED	15 µl

6.2. Verilerin Analizi

Ekzon 3 ve 6 bölgelerinin baz dizilerinin elde edilmesi sonucunda ABI formatlı kromatogram dosyası halinde tarafımıza gönderilen diziler ilk olarak FinchTV programında açılarak görsel olarak incelenmiştir. Elde edilen DNA baz dizilerinden öncelikle baz dizi analizi için kullandığımız primer dizileri ve heterozigot bireyler çıkarılarak istenilen bölge MEGA5 paket programı (Tamura vd. 2011) içerisinde bulunan CLUSTALW kullanılarak sıraya (alignment) dizilmiştir. Popülasyonlardaki haplotip sayısı, çeşitliliği, dağılımı, haplotiplerdeki nükleotid çeşitliliği DNAsp (ver. 5.0) (Librado ve Rozas 2009) programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen alleller arasındaki evrimsel ilişkileri görsel hale getirip irdelemek amacıyla Nardi vd. (2006) yılında, Pakistan, Afrika, Avrupa (Akdeniz havzası) ve Amerika'dan olmak üzere toplam 17 değişik bölgeden toplamış oldukları zeytin sineği örneklerinden elde ettikleri direnç allelleri (Genbankası erişim numaraları: DQ499479-DQ499510) çalışmadan elde edilen allellerle birleştirilerek median-joining NETWORK analizi yapılmıştır (ver. 4.6, Bandelt vd. 1999; Polzin ve Daneschmand 2003).

7. BULGULAR VE İRDELEME

Bu bölümde, zeytin sineğinin asetilkolinesteraz enzimine dayalı organofosfat direncinin genetik temeli hakkında yapılan çalışmaların ışığında, *Ace* çeşitliliği ile ilişkili DNA baz dizisi verilerinin analizi ve tanımlanması yapılmıştır.

B. oleae, asetilkolinesteraz geninin 3 ve 6 ekzonları, her bir lokasyon için 8 birey olacak şekilde her bir ekzon için toplam 304 bireyin baz dizileri elde edilmek suretiyle, ekzon 10 bölgesindeki 9 bç'lik delesyon ise yine 304 bireyde doğrudan PCR yöntemi ile çalışılmıştır. Baz dizileri daha önceden tanımlanan ekzon 3'deki Ile214Val ve ekzon 6'daki Gly488Ser gibi organofosfat direncinden sorumlu olan nokta mutasyonlarını kapsamaktadır.

Bu iki mutasyon sonucu çalışılan 304 bireyde bulunan aminoasit kombinasyonları Çizelge 7.1.'de özetlenmiştir. Çalışılan örneklerin % 28.62'si 214Ile/488Gly (duyarlı tip), % 7.24'ü 214Ile/488Ser (tekli direnç mutasyonu, Gly488Ser), % 49.34'ü 214Val/488Ser (çiftli direnç mutasyonu, Ile214Val ve Gly488ser), ve % 14.80' ü ise 214Val/488Gly (tekli direnç mutasyonu, Ile214Val) direnç mutasyonunu taşımaktadır. Bu sonuçlar Nardi vd. (2006)'nın yaptıkları çalışmada % 61'i 214Ile/488Gly, % 1.4'ü 214Ile/488Ser, % 34'ü 214Val/488Ser (Ile214Val ve Gly488ser), ve % 3.4' ü ise 214Val/488Gly (Ile214Val) şeklindedir.

Direnç mutasyonu taşımayan duyarlı örneklerin % 74.72'si Akdeniz, % 25.28'i Ege örneklerinde gözlenmiştir. Yalnızca Ile214Val mutasyonu taşıyan bireylerin % 40'ı Akdeniz, % 60'ı Ege örneklerinde gözlenmiştir. Yalnızca Gly488Ser mutasyonu taşıyan bireylerin % 54.55'i Akdeniz, % 45.45'i Ege örneklerinde gözlenmiştir. Her iki Gly488Ser ve Ile214Val mutasyonunu taşıyan bireylerin % 16.66'sı Akdeniz, % 83.35'ü Ege örneklerinde gözlenmiştir. Ege örneklerinin büyük bir kısmında Türkiye'deki insektisit kullanıma paralel olarak iki mutasyon yüksek oranda gözlenmiştir. Duyarlı bireylerin büyük bir kısmı ise Akdeniz örneklerinde yer almaktadır. Hatay popülasyonunda hiçbir bireyde iki direnç mutasyonu ve yalnızca

valin değişikliği gözlenmezken, İzmir popülasyonunda tüm bireyler, en az bir mutasyonu taşımaktadırlar.

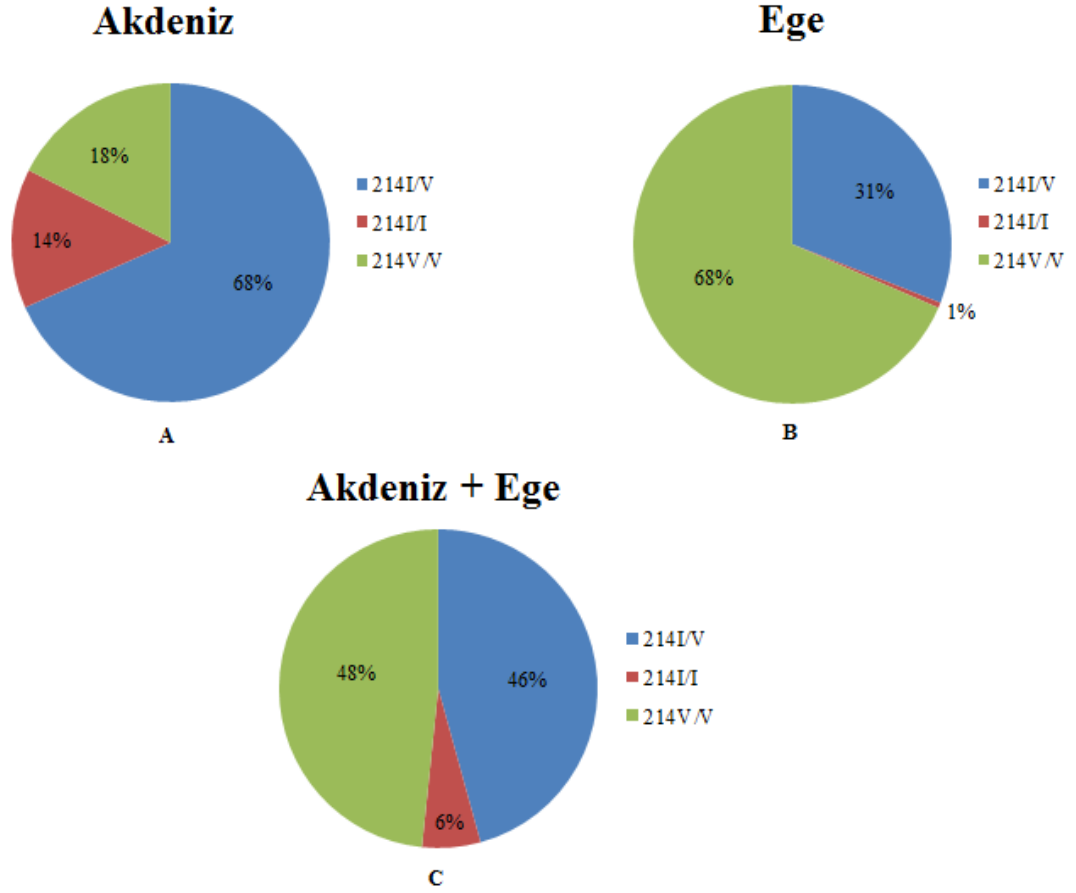
Çizelge 7.1. Ekzon 3 ve 6 için 12 popülasyonda gözlenen aminoasit kombinasyonları ve sayıları.

İller	Ile-Gly	Ile-Ser	Val-Gly	Val-Ser
Mersin	4	2	5	13
Adana	13	3	3	5
Osmaniye	12	2	6	4
Hatay	21	3	0	0
Gaziantep	15	2	4	3
Akdeniz Toplam	65	12	18	25
Çanakkale	5	3	2	22
Bursa	7	0	2	23
İzmir	0	1	6	17
Manisa	3	3	3	15
Balıkesir	3	0	3	18
Aydın	2	3	9	10
Muğla	2	0	2	20
Ege Toplam	22	10	27	125
Genel Toplam	87	22	45	150

7.1. Ekzon 3 Bölgesinin Baz Dizi Analizi Sonucu Elde Edilen Bulgular

Çalışılan 304 bireyden elde edilen baz dizileri FinchTV programında açılarak görsel olarak incelenmiş, homozigot ve heterozigot bireyler belirlenmiştir. Buna göre çalışılan 304 bireyden 139 tanesi (% 45.72) heterozigot (214Ile/Val), 165 tanesi de (% 54.28) homozigot (214Ile/Ile veya 214Val/Val) birey olarak belirlenmiştir. Heterozigot bireylerin 82 tanesi (% 58.99) Akdeniz örneklerinde, 57 tanesi (% 41.01) Ege örneklerinde gözlenmiştir (Şekil 7.1.). Heterozigotluk en fazla 18 bireyde (% 75) Gaziantep ve Hatay popülasyonlarında en düşükte 6 bireyde olmak üzere (% 25) İzmir ve Balıkesir popülasyonlarında gözlenmiştir. Homozigot bireylerin 38 tanesi (% 23.03) Akdeniz örneklerinde (17 tanesi 214Ile/Ile-21 tanesi 214Val/Val), 127 tanesi de (% 76.97) (1 tanesi 214Ile/Ile-126 tanesi 214Val/Val) Ege popülasyonlarında gözlenmiştir. Homozigot bireylerden 18 tanesi izolösün (214Ile/Ile), 147 tanesi de valin (214Val/Val) homozigot bireyler olarak

belirlenmiştir (Şekil 7.1.). Ege örneklerinde Aydın popülasyonunda 1 birey hariç izolösin homozigot birey gözlenmemiştir. Hatay popülasyonunda ise valin homozigot bireye rastlanmamıştır. Direnç allel frekansları bakımından incelendiğinde direç gelişiminde rol oynayan izolösin-valin mutasyonu açısından direnç allel frekansı (R) 433 (% 71.21), duyarlı birey alleli (r) 175 (% 28.79)'dur (Çizelge 7.2.).



Şekil 7.1. Ekzon 3 bölgesi için Akdeniz (A), Ege (B) ve Akdeniz+Ege (C) popülasyonlarına ilişkin heterozigot (214Ile/Val) ve homozigot (214Ile/Ile ve 214Val/Val) bireylerin dağılımı.

Çizelge 7.2. Ekzon 3'e ilişkin 12 popülasyonda gözlenen homozigot ve heterozigot birey sayıları.

214 İzolösün-Valin				
İller	Birey Sayısı	I/V	I/I	V/V
Mersin	24	12	1	11
Adana	24	17	3	4
Osmaniye	24	17	3	4
Hatay	24	18	6	0
Gaziantep	24	18	4	2
Akdeniz Toplam	120	82	17	21
Çanakkale	32	12	0	20
Bursa	32	9	0	23
İzmir	24	6	0	18
Manisa	24	12	0	12
Balıkesir	24	6	0	18
Aydın	24	8	1	15
Muğla	24	4	0	20
Ege Toplam	184	57	1	126
Genel Toplam	304	139	18	147

Ekzon 3 bölgesinin baz dizi analizi sonucunda elde edilen homozigot 165 bireyde 5 haplotip gözlenmiştir. Bu haplotiplerden 1 tanesinin (Hatay) ülkemize özgü olduğu, 4 tanesinde (Haplotip A-C-F-G) Nardi vd. (2006) tarafından daha önce yapılan çalışmadaki haplotiplerle ortak olduğu belirlenmiştir.

Haplotipler birbirlerine benzer olup, aralarındaki baz değişiklikleri 1 ila 5 nükleotid arasında değişmektedir. Tüm popülasyonlar için genetik çeşitliliğin temel tanımlayıcı içerikleri Çizelge 7.3.'de sunulmuştur. Haplotip çeşitliliği (h) 0.0000 (Aydın hariç Ege popülasyonlarının tamamı) ile 0.7142 (Gaziantep) arasında değişmektedir. Tüm popülasyonlar için haplotip çeşitliliği (h) değeri 0.304 ± 0.016 'dır. Bu değer daha önceden Akdeniz havzasındaki (0.49 ± 0.05) ve Orta Doğu'daki (0.91 ± 0.03) örneklerden elde edilen haplotip çeşitliliği (h) değerlerinden daha düşüktür (Nardi vd. 2006). Haplotipler arasındaki nükleotid çeşitliliği (π) 0.0000 (Aydın hariç Ege popülasyonlarının tamamı) ile 0.0054 (Gaziantep) arasında değişmektedir ve tüm popülasyonlar için nükleotid çeşitliliği (π) 0.002 ± 0.0001 'dir. Bursa ve Çanakkale popülasyonlarından farklı sayıda örneklem yapılmasına karşın popülasyonlardaki haplotip sayıları 1 (Aydın hariç Ege popülasyonlarının tamamı) ile 3 (Akdeniz örneklerinin tamamı) arasındadır. Ege ve Akdeniz bölgeleri için ortalama haplotip

sayısı (Hp), haplotip çeşitliliği (h) ve nükleotid çeşitliliği (π) değerleri sırasıyla Ege popülasyonlarında $H_p = 1.14$, $h = 0.015$ ve $\pi = 0.0002$; Akdeniz popülasyonlarında $H_p = 3$, $h = 0.60$ ve $\pi = 0.004$ 'dür. En yüksek seviyede gen içi çeşitlilik Gaziantep popülasyonunda gözlenmiştir. 521 baz çiftinde (bç) 6 tane polimorfik bölge bulunmaktadır (toplam uzunluğun % 1.15'i), bu 6 bölgenin 1 tanesi tek singleton yani mutasyon tek bir haplotip baz dizisinde gerçekleşmektedir (484. pozisyon) ve 5 tanesi de parsimony informatif bölgeler (73, 122, 259, 412, 415. pozisyon) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 7.3. Ekzon 3 bölgesine ilişkin zeytin sineği popülasyonlarındaki haplotip çeşitliliği. N: Örnek sayısı, Hp: Haplotip sayısı, h: Haplotip çeşitliliği, π : nükleotid çeşitliliği.

Bölgeler	Popülasyonlar	N	Hp	h	π
Ege	Çanakkale	19	1	0,0000	0,0000
	Bursa	23	1	0,0000	0,0000
	Balıkesir	18	1	0,0000	0,0000
	Manisa	14	1	0,0000	0,0000
	İzmir	18	1	0,0000	0,0000
	Aydın	18	2	0,1111	0,0011
	Muğla	17	1	0,0000	0,0000
	Ortalama	18.14	1.14	0.015	0.0002
Akdeniz	Mersin	12	3	0,3181	0,0027
	Adana	7	3	0,6667	0,0047
	Osmaniye	7	3	0,6667	0,0053
	Hatay	6	3	0,6	0,0023
	Gaziantep	7	3	0,7142	0,0054
		Ortalama	7.8	3	0.60

Ekzon 3 için tez çalışmasından elde edilen ve daha önceki çalışmalarla aynı olan haplotipler Çizelge 7.4.'te sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar göstermiştir ki Portekiz, Pakistan ve Afrika örneklerinde gözlenmeyen bunun dışında dünyanın birçok yerinde yaygın şekilde gözlenen Haplotip A (bizim çalışmamızda H3) ülkemiz için dominanttır ve 165 bireyin 147 (%88.55)'sinde gözlenmiştir ve Ege popülasyonlarının büyük bir bölümü (% 85.71) Haplotip A baz dizisini taşımaktadırlar. Amerika'da daha önceden tanımlanan 5 farklı haplotip bulunmaktadır (Nardi vd. 2006) ve bu 5 haplotipin 3 tanesi (H2, H3 ve H4) çalışmamızda gözlenmiştir (Çizelge 7.4.). Daha önceden rapor edilen Afrika

örneklerinden (Nardi vd. 2006) Haplotip C (H2), Haplotip F (H4) ve Haplotip G (H5) ortak haplotipler olarak bulunmuştur (Çizelge 7.4.) ve bu haplotiplerin bulunduğu iller Çizelge 7.5.'de sunulmuştur.

Çizelge 7.4. Ekzon 3 için daha önceki çalışmalarla ortak bulunan haplotiplerin listesi.

Haplotip Adı	Tanımlanan Lokasyon	GenBankası Erişim Numarası	Kaynak	Çalışmamızdaki Ortak Haplotip
Haplotip A	Türkiye-Osmaniye	DQ499479	(Nardi vd. 2006)	H3
	Türkiye-Adana			
	Yunanistan-Athens			
	İtalya-Bari			
	İtalya-Catania			
	İtalya-Montecuccio			
	İtalya-Portoferraio			
	İtalya-Malcesine			
	Fransa-Les Matelles			
	Meksika-Ensenada			
Kaliforniya-Santa Barbara				
Haplotip C	Güney Afrika-Paarl mountain	DQ499481	(Nardi vd. 2006)	H2
	İsrail-Haifa			
	Türkiye-Osmaniye			
	İtalya-Portoferraio			
	İtalya-Malcesine			
	Fransa-Les Matelles			
	Portekiz-Paradela			
	Meksika-Ensenada			
	Kaliforniya-Santa Barbara			

Çizelge 7.4. (devam)

Haplotip Adı	Tanımlanan Lokasyon	GenBankası Erişim Numarası	Kaynak	Çalışmamızdaki Ortak Haplotip
Haplotip F	Güney Afrika- Paarl mountain	DQ499484	(Nardi vd. 2006)	H4
	Kenya-Burguret Forest			
	İsrail-Haifa			
	Türkiye-Adana			
	Meksika- Ensenada			
Kaliforniya - Santa Barbara				
Haplotip G	Güney Afrika- Paarl mountain	DQ499485	(Nardi vd. 2006)	H5
	Türkiye- Osmaniye			
	Türkiye-Adana			
	Fransa-Les Matelles			

Çizelge 7.5.'te haplotipler, Türkiye'deki frekansları ve *B. oleae* popülasyonları arasındaki dağılımları listelenmiştir. Haplotip 1 çalışmamızda yalnızca Hatay popülasyonunda gözlenmiştir. Çalışılan 166 baz dizisinin % 7.8'ini içeren haplotip 2 Akdeniz popülasyonlarında yaygındır ve Akdeniz örneklerinin % 92.30'u ve Ege örneklerinin % 7.7'si H2 içerisinde yer almaktadır. Haplotip 3 yüksek frekansta, yaygın ve geniş yayılış gösteren haplotipler olarak bulunmuştur ve çalışmamızdan elde edilen 165 baz dizisinin % 88.55'ini içermektedir. H3 çalışılan tüm popülasyonlarda paylaşılan haplotiplerdir ve Türkiye'de yaygın şekilde görünmektedirler. Haplotip 3' de bulunan 147 bireyin 126 (% 85.71) tanesi Ege, 21 (% 14.29) tanesi Akdeniz örneklerinden oluşmaktadır. Haplotip 4 çalışmamızdan elde edilen 165 baz dizisinin % 2.41'ini içermektedir ve H4'te bulunan bireylerin tamamı (4 birey) Akdeniz popülasyonlarına aittir. Haplotip 5 ise yalnızca Adana popülasyonunda gözlenmiştir.

Çizelge 7.5. Türkiye’deki zeytin sineği popülasyonlarındaki ekzon 3 haplotiplerinin illere göre dağılımı. Haplotip A, C, F ve G çizelge 7.4.’de verilmiştir. Mer: Mersin; Ada: Adana; Osm: Osmaniye; Hat: Hatay; Gantp: Gaziantep; Man: Manisa; İzm: İzmir; Muğ: Muğla; Ayd: Aydın; Çnkl: Çanakkale; Besr: Balıkesir; Bur: Bursa

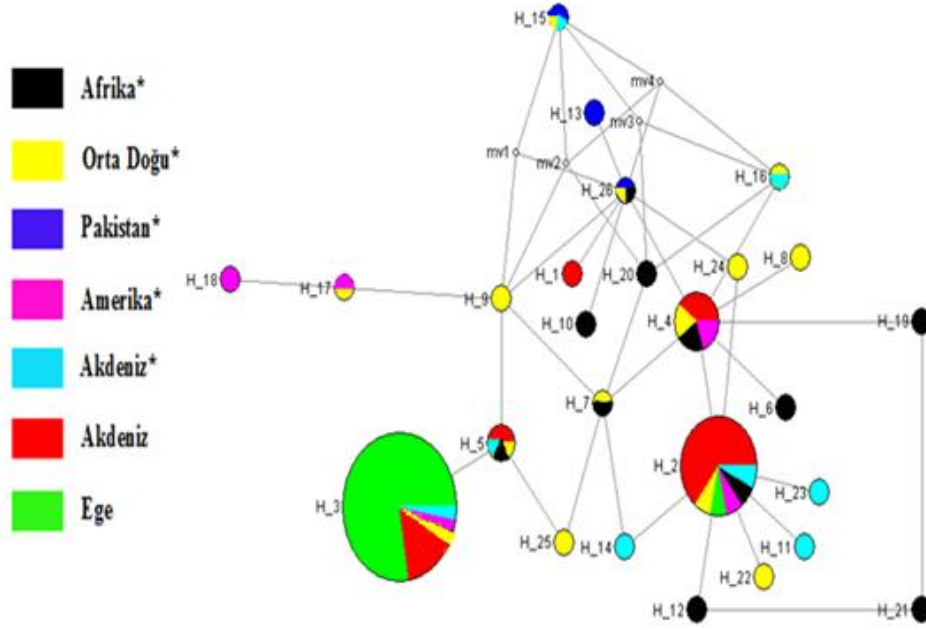
Ege								Akdeniz				
Haplotip/ Lokasyon	Çnkl	Bur	Besr	Man	İzm	Ayd	Muğ	Mer	Ada	Osm	Hat	Gantp
H1											1	
H2 (Haplotip C)						1		1	2	2	4	3
H3 (Haplotip A)	19	23	18	14	18	17	17	10	4	4		3
H4 (Haplotip F)								1		1	1	1
H5 (Haplotip G)									1			

Ekzon 3 için daha önceden gen bankasına kayıt edilmiş baz dizileri ile birlikte (erişim numaraları DQ499479-DQ499503) bu çalışmadan elde edilen haplotipler arasındaki ilişkiler network programı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 7.2.). Haplotipe dayalı network analizi, Türkiye’deki ve Dünya’daki zeytin sineği popülasyonları arasındaki filogenetik ilişkilerin ve genetik yapının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır.

Ekzon 3 açısından, en yüksek frekansı gösteren Haplotip 26, Nardi vd. (2006) tarafından Pakistan grubunun atası olarak değerlendirilmiştir. Hatay örneğinde gözlenen Haplotip 1, Orta Doğu, Afrika ve Pakistan örneklerinin bulunduğu Haplotip 26’ya bağlıdır. Amerika kıtasından incelenen örneklerde gözlenen alleller genellikle Akdeniz ya da Orta Doğu kökenli gibi görünmektedir ve çalışmamızda H2, H3 ve H4’de gözlenen haplotipler Amerika’ya ait haplotipler ile birlikte yer almaktadır (Şekil 7.2.).

Exon 3’teki 2 dirençli allel (H3 ve H23) bulunmaktadır (Nardi vd. 2006). H23 çalışmadan elde ettiğimiz Akdeniz popülasyonlarında yaygın (% 92.30) olarak bulunan H2’den köken almıştır. Yunanistan ve güney/merkez İtalya’da ve ülkemizde Ege popülasyonlarında yüksek frekanslarda (% 85.71) bulunan Haplotip 3 Adana popülasyonunda bir bireyin yer aldığı Haplotip 5’den köken almıştır ve H5 Orta

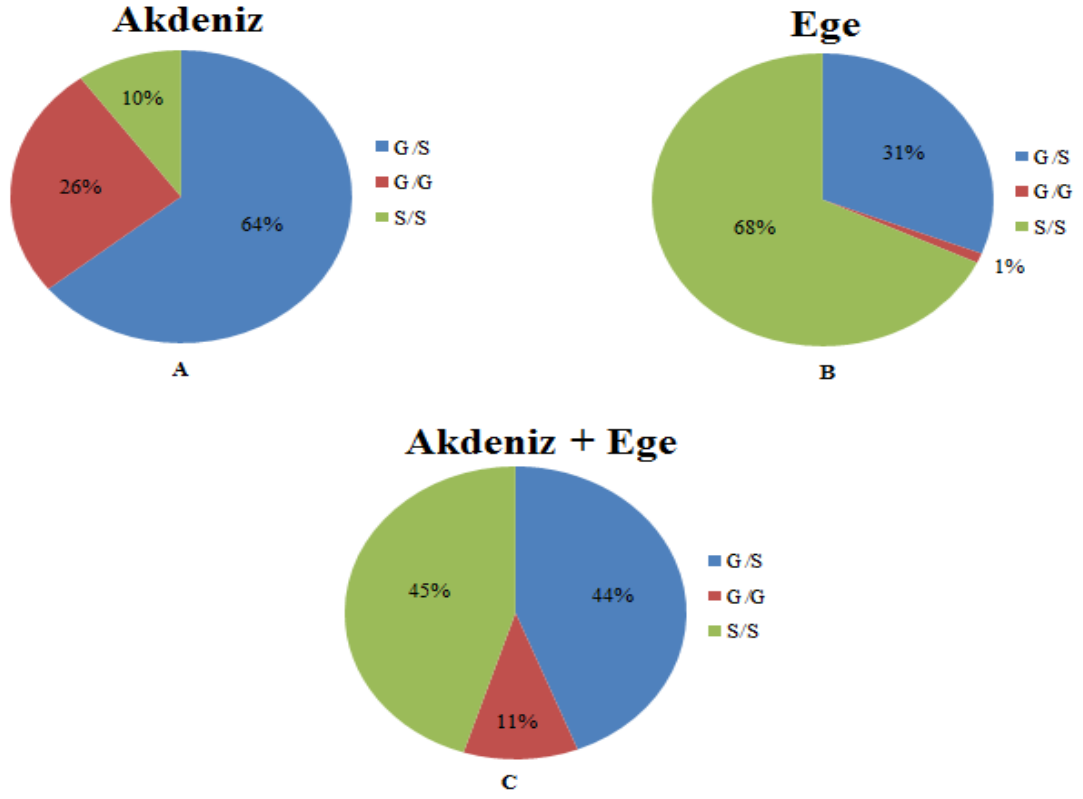
Doğu ile sınırlı olan Haplotip 9 ve Haplotip 25 ile ilişkilidir. Çalışmadan elde edilen baz dizilerinin büyük bir kısmı özellikle Ege popülasyonlarına ait baz dizileri (126 baz dizisi) Haplotip 5'den köken alan Haplotip 3 içerisinde yer almaktadır. Akdeniz popülasyonlarında dört bireyde gözlenen haplotip 4, Orta Doğu, Afrika ve Amerika haplotipleri ile birlikte yer almaktadır ve haplotip 26, haplotip 7, haplotip 16 ve haplotip 2 ile ilişki içerisindedir (Şekil 7.2.).



Şekil 7.2. AKE enzimi ekzon 3 baz dizi analizi sonucu elde edilen network grafiği. Nardi vd. (2006)' elde edilen haplotipler * ile gösterilmiştir.

7.2. Ekzon 6 Bölgesinin Baz Dizi Analizi Sonucu Elde Edilen Bulgular

Çalışılan 304 bireyden elde edilen baz dizileri FinchTV programında açılarak görsel olarak incelenmiş, homozigot ve heterozigot bireyler belirlenmiştir. Buna göre çalışılan 304 bireyden 134 tanesi (% 44.07) heterozigot (488Gly/Ser), 170 tanesi de (% 55.93) homozigot birey (488Gly/Gly ya da 488Ser/Ser) olarak belirlenmiştir. Heterozigot bireylerin 77 tanesi (% 57.46) Akdeniz popülasyonlarında, 57 tanesi (% 42.54) Ege popülasyonlarında gözlenmiştir. Homozigot bireylerin 43 tanesi (% 25.29) Akdeniz popülasyonlarında, 127 tanesi de (% 76.97) Ege popülasyonlarında gözlenmiştir. Homozigot bireylerden 33 tanesi glisin (488Gly/Gly), 137 tanesi de serin (488Ser/Ser) homozigot bireyler olarak belirlenmiştir (Şekil 7.3.). Heterozigotluk en fazla 23 bireyde (% 95.83) Osmaniye popülasyonunda, en düşükte 5 bireyde olmak üzere (% 20.83) Muğla popülasyonunda gözlenmiştir. Ege popülasyonlarında Aydın ve Muğla popülasyonlarında 1'er birey hariç glisin homozigot (488Gly/Gly) birey gözlenmemiştir. Hatay popülasyonunda ise serin homozigot (488Ser/Ser) bireye rastlanmamıştır. Direnç allel frekansları bakımından incelendiğinde direnç gelişiminde rol oynayan glisin-serin mutasyonu açısından direnç allel frekansı (R) 408 (% 67.10), duyarlı birey alleli (r) 200 (% 32.80)'dir (Çizelge 7.6.).



Şekil 7.3. Ekzon 6 bölgesi için Akdeniz (A), Ege (B) ve Akdeniz+Ege (C) popülasyonlarına ilişkin heterozigot (488Gly/Ser) ve homozigot (488Gly/Gly ve 488Ser/Ser) bireylerin dağılımı.

Çizelge 7.6. Ekzon 6'ya ilişkin 12 popülasyonda gözlenen homozigot ve heterozigot birey sayıları.

488 Glisin-Serin				
İller	Birey Sayısı	G/S	G/G	S/S
Mersin	24	17	1	6
Adana	24	13	8	3
Osmaniye	24	23	0	1
Hatay	24	11	13	0
Gaziantep	24	13	9	2
Akdeniz Toplam	120	77	31	12
Çanakkale	32	8	0	24
Bursa	32	10	0	22
İzmir	24	8	0	16
Manisa	24	11	0	13
Balıkesir	24	7	0	17
Aydın	24	8	1	15
Muğla	24	5	1	18
Ege Toplam	184	57	2	125
Genel Toplam	304	134	33	137

Ekzon 6 bölgesinin baz dizi analizi sonucunda elde edilen homozigot 172 bireyde 3 haplotip gözlenmiştir. Bu haplotiplerden 3 tanesinde (Haplotip A-B-E-F) daha önceki yapılan çalışmalardaki haplotiplerle ortak olduğu belirlenmiştir (Nardi vd. 2006). Bunun yanı sıra ülkemize özgü herhangi yeni bir haplotip bulunamamıştır.

Haplotipler birbirlerine benzer olup, aralarındaki baz değişiklikleri 1 ila 4 nükleotid arasında değişmektedir. Tüm popülasyonlar için genetik çeşitliliğin temel parametreleri Çizelge 7.7.'de sunulmuştur. Osmaniye popülasyonunda homozigot yalnızca bir birey kalmasından dolayı bu birey en yakın popülasyon olan Adana popülasyonuna dahil edilmiştir. Haplotip çeşitliliği (h) 0.0000 (Aydın ve Muğla hariç Batı popülasyonlarının tamamı) ile 0.4849 (Adana) arasında değişmektedir. Tüm popülasyonlar için h değeri 0.2020 ± 0.009 'dir. Bu değer daha önceden Akdeniz havzasındaki (0.49 ± 0.04) ve Orta Doğu'daki (0.57 ± 0.09) örneklerden elde edilen haplotip çeşitliliği (h) değerlerine oranla daha düşüktür (Nardi vd. 2006). Haplotipler arasındaki nükleotid çeşitliliği (π) 0.0000 (Aydın ve Muğla hariç Batı popülasyonlarının tamamı) ile 0.0108 (Gaziantep) arasında değişmektedir ve tüm popülasyonlar için ortalama nükleotid çeşitliliği (π) 0.004 ± 0.0001 'dir. Bursa ve Çanakkale popülasyonlarından farklı sayıda örneklem yapılmasına karşın popülasyonlardaki haplotip sayıları 1 (Aydın ve Muğla hariç Batı popülasyonlarının tamamı) ile 3 (Gaziantep ve Muğla) arasındadır. Ege ve Akdeniz bölgeleri için ortalama haplotip sayısı (H_p), haplotip çeşitliliği (h) ve nükleotid çeşitliliği (π) değerleri sırasıyla Ege popülasyonlarında $H_p = 1.42$, $h = 0.0549$ ve $\pi = 0.001$; Akdeniz popülasyonlarında $H_p = 2.25$, $h = 0.3492$ ve $\pi = 0.0076$ 'dır. En yüksek seviyede genetik çeşitlilik Gaziantep popülasyonunda gözlenmiştir. 94 baz çiftinde (bp) 4 tane polimorfik bölge bulunmaktadır (toplam uzunluğun % 4.25'i), bu 4 bölgenin tamamı parsimony informatif bölgeler (28, 29, 31, 38. pozisyon) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 7.7. Ekzon 6 bölgesine ilişkin zeytin sineği popülasyonlarındaki haplotip çeşitliliği. N: Örnek sayısı, Hp: Haplotip sayısı, h: Haplotip çeşitliliği, π : nükleotid çeşitliliği.

Bölgeler	Popülasyonlar	N	Hp	h	π
Ege	Çanakkale	23	1	0,0000	0,0000
	Bursa	22	1	0,0000	0,0000
	Balıkesir	17	1	0,0000	0,0000
	Manisa	14	1	0,0000	0,0000
	İzmir	16	1	0,0000	0,0000
	Aydın	17	2	0,1176	0,0025
	Muğla	21	3	0,2667	0,0047
	Ortalama	18.57	1.42	0.0549	0.001
Akdeniz	Mersin	7	2	0,2857	0,0060
	Adana	12	2	0,4849	0,0103
	Hatay	13	2	0,1538	0,0033
	Gaziantep	11	3	0,4727	0,0108
	Ortalama	10.75	2.25	0.3492	0.0076

Ekzon 6 için tez çalışmasından elde edilen ve daha önceki çalışmalarla aynı olan haplotipler Çizelge 7.8.'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar göstermiştir ki sadece Haplotip A ve B ülkemiz için dominanttır ve çalışmamızda sırasıyla; homozigot 172 bireyin 32 (% 18.60) ve 138 (% 80.23)'inde gözlenmiştir. Ege popülasyonlarının büyük bir bölümü (% 73.25) Haplotip B (H2) baz dizilerini taşımaktadırlar. Daha önceden rapor edilen haplotiplerden (Nardi vd. 2006) Haplotip A, Haplotip B, Haplotip E ve Haplotip F ortak haplotipler olarak bulunmuştur (Çizelge 7.8.).

Çizelge 7.8. Ekzon 6 için daha önceki çalışmalarla ortak bulunan haplotiplerin listesi.

Haplotip Adı	Tanımlanan Lokasyon	GenBankası Erişim Numarası	Kaynak	Çalışmamızdaki Ortak Haplotip
Haplotip A	Pakistan-Cherat	DQ499504	(Nardi vd. 2006)	H1
	Pakistan-Malakand			
	Kenya-Burguret Forest			
	Güney Afrika-Paarl mountain			
	Portekiz-Paradela			
	Fransa-Les Matelles			
	İtalya-Catania			
	İtalya-Montecucco			
	İtalya-Portoferraio			
	İtalya-Malcesine			
	Yunanistan-Athens			
	Türkiye-Osmaniye			
	Türkiye-Adana			
	Meksika-Ensenada			
Kaliforniya-Santa Barbara				
Haplotip E	Kenya-Burguret Forest	DQ499508	(Nardi vd. 2006)	H3
	Türkiye-Osmaniye			
	Fransa-Les Matelles			
	Kaliforniya - Santa Barbara			
Haplotip F	İtalya-Portoferraio	DQ499509	(Nardi vd. 2006)	H6
	Türkiye-Osmaniye			

Çizelge 7.8. (devam)

Haplotip Adı	Tanımlanan Lokasyon	GenBankası Erişim Numarası	Kaynak	Çalışmamızdaki Ortak Haplotip
Haplotip B	İtalya-Catania	DQ499505	(Nardi vd. 2006)	H2
	İtalya-Bari			
	İtalya-Montecucco			
	İtalya-Portoferraio			
	İtalya-Malcesine			
	Yunanistan-Athens			
	Türkiye-Osmaniye			
	Türkiye-Adana			
	Fransa-Les Matelles			
	Meksika-Ensenada			
Kaliforniya-Santa Barbara				

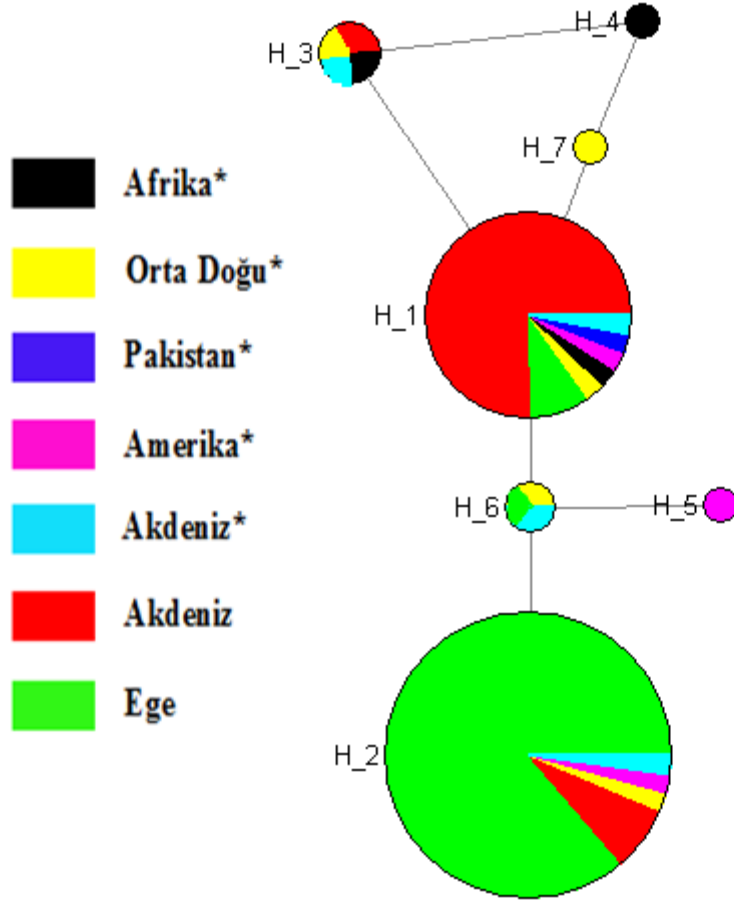
Çizelge 7.9.'da haplotipler, Türkiye'deki frekansları ve *B. oleae* popülasyonları arasındaki dağılımları listelenmiştir. Haplotip 2 yüksek frekansta, yaygın ve geniş yayılış gösteren haplotip olarak bulunmuştur ve çalışmamızdan elde edilen 172 baz dizisinin % 80.70'ini içermektedir. Haplotip 2 çalışılan tüm popülasyonlarda paylaşılan haplotiplerdir ve Türkiye'de yaygın şekilde görünmektedirler. Haplotip 2'de yer alan 138 bireyin 126 (% 91.30) tanesi Ege, 12 (% 8.70) tanesi Akdeniz örneklerinden oluşmaktadır. Çalışılan 172 baz dizisinin 32 (% 18.71)'sini içeren haplotip Haplotip 1 Akdeniz örneklerinde yaygındır ve Akdeniz örneklerinin 29 (% 90.62)'u ve Ege örneklerinin 3 (% 9.38)'ü Haplotip 1 içerisinde yer almaktadır. Haplotip 3 yalnızca Hatay ve Gaziantep popülasyonlarda birer adet gözlenmiştir. Haplotip 6 ise sadece Muğla popülasyonunda bir bireyde gözlenmiştir.

Çizelge 7.9. Türkiye’deki zeytin sineği popülasyonlarındaki ekzon 6 haplotiplerinin illere göre dağılımı. Haplotip A, B ve E çizelge 7.8.’de verilmiştir. Mer: Mersin; Ada: Adana; Osm: Osmaniye; Hat: Hatay; Gantp: Gaziantep; Man: Manisa; İzm: İzmir; Muğ: Muğla; Ayd: Aydın; Çnkl: Çanakkale; Besr: Balıkesir; Bur: Bursa

Ege								Akdeniz			
Haplotip/ Lokasyon	Çnkl	Bur	Besr	Man	İzm	Ayd	Muğ	Mer	Ada	Hat	Gantp
H1 (Haplotip A)						1	2	1	8	12	8
H2 (Haplotip B)	23	22	17	14	16	16	18	6	4		2
H3 (Haplotip E)										1	1
H6 (Haplotip F)							1				

Ekzon 6 için daha önceden gen bankasına kayıt edilmiş baz dizileri ile birlikte (erişim numaraları DQ499504- DQ499510) bu çalışmadan elde edilen haplotipler arasındaki ilişkiler Network programı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 7.4.).

Çalışmada elde ettiğimiz baz dizilerine göre Akdeniz örneklerinin büyük bir bölümü (% 90.62) haplotip 1’de yer almaktadır. Nardi vd. (2006) yaptıkları çalışmada Haplotip 1’in ekzon 6 networkünde muhtemelen en yaşlı allel olduğunu belirtmişlerdir (Nardi vd. 2006). Çalışmamızda Akdeniz popülasyonlarında iki bireyde gözlenen haplotip 3, haplotip 1’den köken almıştır ve Nardi vd. (2006)’nın çalışmalarında Akdeniz, Afrika ve Orta Doğu örneklerinde gözlenmiştir. Çalıştığımız tüm lokasyonlardan bireyler Hatay popülasyonu hariç haplotip 2’de yer almaktadır ve özellikle Ege örnekleri yüksek frekansta (% 91.30) görülmüştür. Haplotip 2 Nardi vd. (2006)’nın çalışmalarında Akdeniz ve Orta Doğu örneklerinde gözlemlendiği ve bizim çalışmamızda da Muğla popülasyonuna ait bir bireyin yer aldığı haplotip 6’dan köken alıyor gibi görünmektedir.

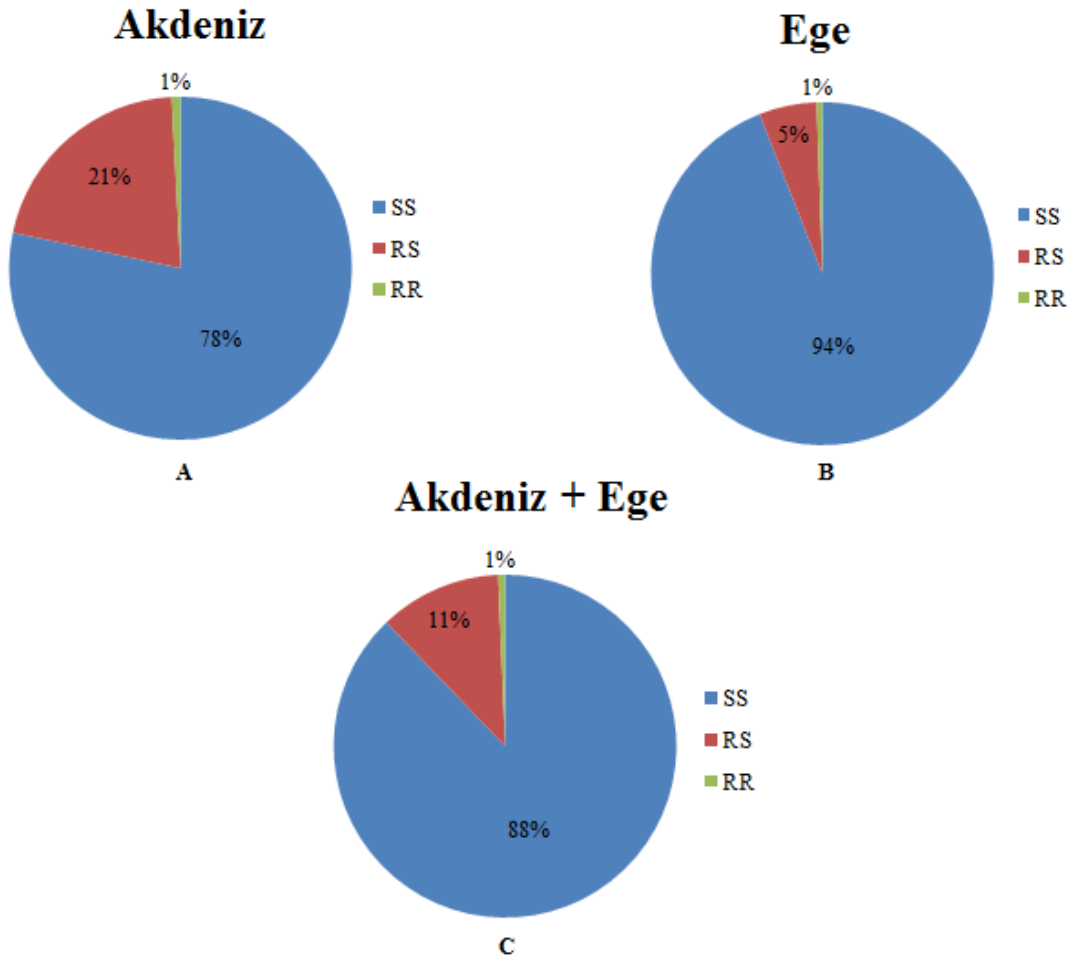


Şekil 7.4. AKE enzimi ekzon 6 baz dizi analizi sonucu elde edilen network grafiği. Nardi vd. (2006)' elde edilen haplotipler * ile gösterilmiştir.

7.3. Exon 10 Bölgesinin PCR'ı Sonucu Elde Edilen Bulgular

AKE enzimini kodlayan, nükleer bir gen olan, *Ace* geninde ekzon10 içerisinde bulunan 9 bç'lik delesyon bölgesi PCR'da çoğaltıldıktan sonra poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemi ile test edilerek çalışılan bireylerdeki organofosfat direnç mutasyonlarının sıklığı belirlenmiştir. Çalışılan 304 bireyden elde edilen sonuçlar Çizelge 7.10.'da özetlenmiştir. Buna göre çalışılan 304 bireyden 35 tanesi (% 11) heterozigot (RS), 267 tanesi (% 88) homozigot duyarlı (SS) ve 2 bireyde (% 1) homozigot dirençli (RR) olarak belirlenmiştir. Heterozigot bireylerin 25 tanesi (% 71.43) Akdeniz örneklerinde, 10 tanesi (% 28.57) Ege örneklerinde gözlenmiştir. Homozigot duyarlı (SS) birey sayısı toplam 267'dir ve bunların 94 (% 35.20) tanesi

Akdeniz örneklerinde, 173 tanesi de (% 64.80) Ege örneklerinde görülmüştür (Şekil 7.5.). Heterozigotluk en fazla 8 bireyde Hatay popülasyonunda gözlenmiştir. Bursa, İzmir ve Muğla popülasyonlarında ise heterozigot birey gözlenmemiştir. Homozigot dirençli (RR) bireyler birer bireyde olmak üzere yalnızca Hatay ve Aydın popülasyonlarında görülmüştür. Bursa örneklerinin tamamı homozigot duyarlı olarak bulunmuştur. Direnç allel frekansları bakımından incelendiğinde direnç allel frekansı (R) 39 (% 6.41), duyarlı birey alleli (r) 569 (% 93.59)'dir (Çizelge 7.10.).



Şekil 7.5. Ekzon 10 bölgesi için Akdeniz (A), Ege (B) ve Akdeniz+Ege (C) popülasyonlarına ilişkin heterozigot (RS) ve homozigot (RR ve SS) bireylerin dağılımı.

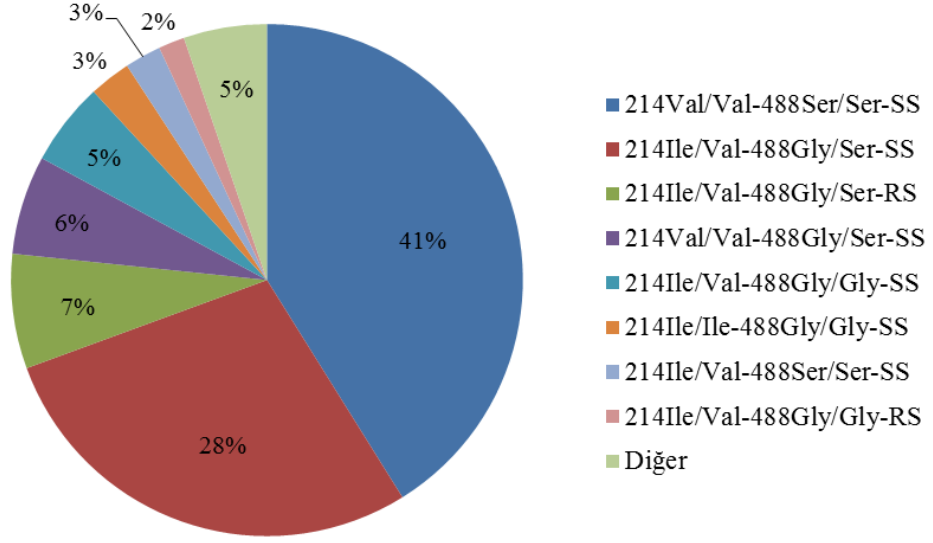
Çizelge 7.10. 12 popülasyona ilişkin duyarlı (SS), heterozigot dirençli (RS) ve homozigot dirençli (RR) bireyler.

Exon 10			
İller	SS	RS	RR
Mersin	19	5	0
Adana	20	4	0
Osmaniye	19	5	0
Hatay	15	8	1
Gaziantep	21	3	0
Akdeniz	94	25	1
Çanakkale	28	4	0
Bursa	32	0	0
İzmir	24	0	0
Manisa	23	1	0
Balıkesir	20	4	0
Aydın	22	1	1
Muğla	24	0	0
Ege	173	10	1
Toplam	267	35	2

7.4. Ekzon 3-6 ve 10'a İlişkin Allel Kombinasyonları ve Frekansları

Çalışılan 304 bireyde ekzon 3 - 6 ve 10 bölgelerinde gözlenen allel kombinasyonları ve frekansları Şekil 7.6.'da sunulmuştur. Buna göre çalışılan 304 bireyin 125 tanesinde (% 41) 214Val/Val-488Ser/Ser-SS allel kombinasyonu gözlenmiştir. İkinci yaygın allel kombinasyonu 214Ile/Val-488Gly/Ser-SS'dir ve 86 bireyde (% 28) gözlenmiştir. Diğer yaygın allel kombinasyonları da sırasıyla 22 bireyde (% 7) 214Ile/Val-488Gly/Ser-RS, 19 bireyde (% 6) 214Val/Val -488Gly/Ser-SS ve 16 bireyde (% 5) 214Ile/Val-488Gly/Gly-SS kombinasyonlarıdır.

Ekzon 3 - 6 ve 10 Allel Kombinasyonları



Şekil 7.6. Ekzon 3-6 ve 10 bölgesi için gözlenen allel kombinasyonları ve frekansları.

8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İnsektisitler, tarım ve kamu sağlığı için önemli olan böcek zararlılarının kontrolü için II. Dünya Savaşı'ndan beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu dönemde, böcekler için direnç, birçok türde, bir dizi mekanizma aracılığıyla ortaya çıkmıştır ve son on yıl içinde, bu mekanizmaların bir kısmının moleküler temeli aydınlatılmıştır (Hemingway vd. 2004).

Zeytin sineği, zeytin bahçelerindeki en önemli zararlı konumundadır ve bunlarla mücadelede yapışkan tuzaklar, feromonlar, renkler ve insektisitler yaygın şekilde kullanılmaktadır. Daha yakın zamana kadar, özellikle Batı Avrupa ülkelerinde, piretroitler ve makrosiklik lakton spinosad üzerine kontroller olmasına rağmen (Haniotakis, 2003), 40 yılı aşkın süredir, Akdeniz havzasında, zeytinyağında düşük miktarda kalıntı bırakması nedeniyle organofosforlu insektisitlerin yoğun kullanımına dayalı kontroller olmuştur (Cabras vd. 1997). Son yıllarda kontrol için, piretroidlerin kullanımında bir artış olmuştur ve son zamanlarda daha az içerikle daha fazla etkinlik elde etmek amacıyla spinosad tuzak spreyle (GF-120) birleştirilmiştir (Daane ve Johnson, 2010).

Organofosfat grubu insektisitlerin yoğun bir şekilde kullanımı zeytin sineğinin bulunduğu bütün alanlarda bu insektisitlere karşı direnç gelişimi ile sonuçlanmıştır. Bu zararlının çevresel streslere nasıl adapte olduğunun daha iyi anlaşılması, direnç evrimi ve yayılışının önlenmesi ya da minimize edilmesine yönelik alışılmışın dışında stratejiler geliştirilmesi için bu böcekteki direncin moleküler mekanizmalarının araştırılması oldukça önem kazanmıştır. Bu bölümde elde edilen sonuçlar ışığında ülkemizdeki zeytin sineği popülasyonlarının genetik çeşitliliği, direnç seviyeleri ve oluşan bu dirence yönelik uygulanabilecek alternatif yöntemler tartışılacaktır.

8.1. Genetik Varyasyon

Nardi vd. (2006) *Ace* geninin baz dizi analizi sonucunda nükleotid seviyesinde, aminoasit dizisine göre daha zengin bir genetik varyasyon olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar *Ace* genindeki gözledikleri nükleotid varyasyonun büyük bir bölümünü Afrika (0.94) ve Orta Doğu (0.91) örneklerinde gözlemlemiştir. Çalışmamızda exon 3 ve 6 için ayrı ayrı haplotip sayısı, haplotip çeşitliliği ve nükleotid çeşitliliği değerleri sırasıyla, 2.07, 0.31 ve 0.002 ve 1.83, 0.2 ve 0.0045 olarak bulunmuştur (Çizelge 7.3. ve Çizelge 7.7.). Ancak burada varyasyonun büyük bir bölümü Akdeniz'den toplanan örneklerde gözlenmiştir (exon 3 için $H=3$, $h=0.60$ ve $\pi=0.004$, exon 6 için $H=2.25$, $h=0.35$ ve $\pi=0.007$). Çalışmamızda ekzon 3 için en yüksek varyasyon Gaziantep (0.71), Adana (0.66) ve Osmaniye'de (0.66) gözlenmiştir (Çizelge 7.3.). Nardi vd. (2006) Adana ve Osmaniye örneklerinde gen çeşitliliği değerlerini 0.73 ve 0.93 olarak bildirmişlerdir. Ekzon 6 için gen çeşitliliği değerleri yine en yüksek Gaziantep (0.47) ve Adana'da (0.48) gözlenmiştir (Çizelge 7.7.). Bu değerler Nardi vd. (2006)'nın çalışmasında Adana ve Osmaniye için 0.56 ve 0.71'dir. Nardi vd. (2006) Orta Doğu bölgesinin bu türlerin bulunduğu bütün temel alanlar arasında kavşak noktası konumunda olduğunu ve zeytin sineklerinin çeşitlenmesinde önemli bir rol oynadığını belirtmiştir. Çalışmamızda da Akdeniz popülasyonlarında gözlediğimiz daha yüksek gen çeşitliliği bu durumla paralellik göstermektedir. Çalışmamızda Akdeniz ve Ege popülasyonları arasında farklı seviyelerde gen içi çeşitlilik gözlenmiştir. Birçok Ege popülasyonunda, hem ekzon 3 için (Aydın hariç tüm popülasyonlar), hem de ekzon 6 (Aydın ve Muğla hariç tüm popülasyonlar) için gen içi çeşitliliği değerleri 0.000 olarak bulunmuştur. Bu durumun nedeni yoğun insektisit kullanımına bağlı olarak birçok farklı dirençli olmayan varyantın değişmesine neden olan kapsamlı seçici süpürme olabilir. Seçici süpürme, yakın bir geçmişte, güçlü bir doğal seçilim sonucu oluşmuş bir DNA mutasyonun yakınlarında yer alan nükleotitler içindeki varyasyonların azaltılması veya ortadan kaldırılmasıdır. Seçici bir süpürme, popülasyonun diğer üyelerine nazaran taşıyıcılarının seçilim değerini ve uyum başarısını artıran yeni bir mutasyon oluştuğunda ortaya çıkabilir. Burada, doğal seçilim, daha yüksek uyum başarısı gösteren bireyler lehine olacaktır ve zamanla yeni mutasyona uğramış varyantların (aleller) frekans ve görülme sıklıkları diğer alellere göre artacaktır (Palaisa vd. 2004).

8.2. Ace Direnç Dağılımı

Hawkes vd. (2005) Avrupa'nın pek çok bölgesinden ve Güney Afrika'dan topladıkları örneklerde bu iki nokta mutasyonunun sıklığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar sonuçlarında yoğun organofosfat insektisit kullanımına bağlı olarak güçlü bir seçim baskısına maruz kalan Yunanistan, Arnavutluk ve İtalya örneklerinde direnç allelini yüksek bir oranda (sırasıyla; 0.93, 0.91 ve 0.78) olduğunu gözlemlemişlerdir bu gözlemler seleksiyonun direnç allellerinin yayılmasında esas rol oynadığı senaryosunu desteklemektedir. Araştırmacılar, Fransa ve İspanya örneklerinde azalan insektisit seçim baskısına paralel olarak bu allelleri düşük oranda (sırasıyla; 0.33 ve 0.28) görmüşlerdir. Araştırmacılar Gly488Ser mutasyonunun ilk önce gerçekleştiğini ve bunu takiben asetilkolin katalizi üzerine zararlı etkileri bir ölçüde hafifletilebilen Ile214Val mutasyonunun geliştiğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar Gly488Ser bireylerinin çoğunluğunun ayrıca Ile214Val'da taşıdığını ve bu çift mutasyon haplotipi, organofosfat kullanımının yoğun olduğu, Yunanistan gibi Doğu ve Batı Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak bulunduğunu bildirmişlerdir. Nardi vd. (2006) yaptıkları çalışmada ise Pakistan, Afrika, Avrupa (Akdeniz havzası) ve Amerika'dan 17 farklı lokasyondan toplamış oldukları örneklerde bu iki mutasyonun populasyonlardaki görülme sıklığını 0.39 olarak bildirmişlerdir. Başkurt vd. (2011) Türkiye'nin Batısından topladıkları örneklerde ise bu mutasyon frekanslarını ekzon 3 ve ekzon 6 için sırasıyla; 0.45, 0.53 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda bu iki mutasyonun populasyonlardaki görülme sıklığı 0.49 olarak elde edilmiştir. Bunun yanı sıra çalışmamızda her iki ekzon 3 ve ekzon 6 bölgesinin baz dizi analizi sonucunda elde edilen aminoasit değişikliklerine bakıldığında hem serin hem de valin mutasyonlarının Ege örneklerinde Akdeniz örneklerine oranla oldukça yüksek frekansta oldukları gözlenmiştir. Ekzon 3 için Ile214Val değişikliği Ege'de 0.68, Akdeniz'de 0.18 ve Ekzon 6 için Gly488Ser mutasyonu Ege'de 0.68, Akdeniz'de 0.10 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu değer Hawkes vd. (2005)'nin Yunanistan, Arnavutluk ve İtalya için bildirdiği değerlerden daha düşük, Fransa ve İspanya'daki mutasyon oranlarından daha yüksektir. Ancak Türkiye'nin Batısındaki örnekler bakıldığında elde edilen mutasyon seviyeleri Yunanistan, Arnavutluk ve İtalya'ya yakındır. Bu durumun temel sebebinin, entansif

tarımın yapıldığı ülkemizin Batı bölgelerinde Doğu'ya oranla çok yoğun insektisit kullanımını olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca, *Ace* geni exon 10 bölgesinde yer alan $\Delta 3Q$ adındaki 9 bç (3 aminoasit)'lik mutasyon Kakani vd. (2008b) tarafından tanımlanmıştır. Bu mutasyon karboksil uçta yer almaktadır ve insektisit direncinde rol oynadığı belirtilmiştir. Araştırmacılar $\Delta 3Q$ allel frekansının organofosfat direnç seviyeleri ile oldukça yakından ilişkili olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda Yunanistan ve Kıbrıs popülasyonları için $\Delta 3Q$ mutasyon frekansını 0.035 olarak bulmuşlardır. Başkurt vd. (2011) Türkiye'nin Batı'sından topladıkları örneklerde ise bu mutasyon frekansını 0.037 olarak bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada ise $\Delta 3Q$ mutasyon frekansını 0.064 olarak bulunmuştur.

Bunun yanısıra ekzon 3-6 ve 10 da gözlenen allel kombinasyonlarına bakıldığında çalışmamızdaki popülasyonlarda gözlenen en yüksek allel kombinasyonu 214Val/Val-488Ser/Ser-SS kombinasyonudur (% 41). İkinci en fazla görülen kombinasyon ise %28 ile 214Ile/Val-488Gly/Ser-SS kombinasyonudur. Başkurt vd. (2011)'nin çalışmasında ise gözlenen en yüksek allel kombinasyonu % 72 ile 214Ile/Val-488Gly/Ser-SS kombinasyonudur.

Zeytin sineği Akdeniz'de sürekli devam eden bir dağılım ve yüksek seviyede gen akışı gösterdiğinden dolayı bölgede yüksek frekansta bulunan bir allelin özellikle negatif seleksiyonun olmaması durumunda yayılması beklenir. Ancak bu her zaman böyle olmamaktadır. Örnek olarak; Exon 3'te, çalışmamızdan elde ettiğimiz baz dizilerinin büyük bir bölümünün de yer aldığı (özellikle Ege örnekleri) ve Haplotip 5'den köken alan, Haplotip 3 birçok merkez/güney İtalya ve Balkan ve ülkemiz Ege popülasyonlarında baskın durumdadır. Ege popülasyonlarına ait baz dizilerinin büyük bir kısmı Haplotip 3 (126 baz dizisi) içerisinde yer almaktadır. Benzer durum exon 6 network'ünde Batı örneklerimizin büyük bir bölümünün yer aldığı Haplotip 2 içinde geçerlidir. Bu gözlem yüksek gen akışı ile uyumlu bir durum değildir ve farklı evrimsel süreçlerin etkili olduğuna işaret etmektedir. Fitness cost (uyum bedeli) direnç mutasyonları ile ilişkili olabilir ve böyle bir durum zeytin sineğinin orta dereceden yüksek seviyeye kadar gen akışının olduğu durumlarda dahi, doğrudan organofosfat selektif baskısına maruz kaldığı bölgelerde direnç mutasyonlarının yayılımının sınırlandırılmasından sorumlu olabilir.

8.3. Organofosfat Direncinden Sorumlu Mutasyonların Orijini ve Dağılımı

Nardi vd. (2006) direnç allellerin Akdeniz'e doğru yayılımı için iki olasılık önermişlerdir. Bunlardan ilki, Orta Doğu'da dirençli mutasyonların organofosfat insektisitlerinin kullanımının yaygınlaşmaya başlamasıyla oluştuğu yönündedir. İkincisi ise, direnç mutasyonlarının başlangıç fazının pasif olduğu ve Akdeniz'de zeytin sineğinin yayılımının ardından, çok yakın bir zamanda bu yayılmanın ardından tetiklenmiş olduğu yönündedir. Exon 3 açısından en yaygın direnç varyantı Haplotip 3 (çalışmamızda Ege örneklerinin büyük oranda bulunduğu), muhtemelen Orta Doğu bölgesine ve Adana ile Osmaniye popülasyonlarının lokalize olduğu ülkemize özgü allel gruplarından (Haplotip 5) köken almıştır. Bu allelin daha sonra Akdeniz havzasına yayılışı Orta Doğu'da organofosfat insektisitlerin oluşturduğu seleksiyon ile tetiklenmiş olabilir. Exon 3'teki diğer direnç alleli Haplotip 23'dür ve muhtemelen Akdeniz'de yaygın olan Haplotip 2'den (çalışmamızda Akdeniz örneklerinin büyük oranda bulunduğu) köken almıştır. Haplotip 2 haplotip 5 ile ilişkili değildir. Bu durum bu allellerin orjinlerinin bağımsız olduğuna işaret etmektedir.

Exon 6'daki Haplotip 2'nin (çalışmamızda Batı örneklerinin büyük oranda bulunduğu) büyük ihtimalle Akdeniz ya da Orta Doğu bölgelerinden köken aldığını göstermektedir. Direnç allelleri *B. oleae*'nin muhtemel atasal popülasyonları oldukları düşünülen Afrika ve Pakistan'da bulunmamaktadır. Direnç mutasyonları muhtemelen Orta Doğu'da ya da Akdeniz'de kökenlenmiştir. Türün yayılımı Afrika'dan Akdeniz'e doğru olmaktadır ve bu doğrultuda, direnç mutasyonlarının ortaya çıkışının zeytin sineğinin Akdeniz'de yayılışından sonra olduğu düşünülmektedir (Nardi vd. 2006). Yaptığımız çalışmada hem exon 3 hem de exon 6'da direnç allellerinin Avrupa kıtasında bulunduğu en uzak noktanın Gaziantep-Hatay hattı olduğu görülmüştür.

Dünya genelinde *B. oleae* popülasyonlarında süregelen durumları daha iyi anlayabilmek ve zeytin tarımında insektisitlerin zararlı etkilerini azaltmak için, moleküler ve biyokimyasal modellerin rehberliğiyle toplanan popülasyonların direnç durumlarıyla ilgili araştırmaların artmasıyla detaylandırılabilir. Bununla birlikte, zeytin sineği popülasyonları için direnç yönetim programlarının tespiti, karmaşıktır. Böyle bir program, efektif olan eski bileşenleri ve kontrol için umut vaat eden yeni bileşenleri içerebilir.

Doğal tip proteine göre mutasyona uğramış proteine karşı daha aktif olan bir insektisit kullanımı, bir popülasyonun direncini azaltmak için uygulanabilir. Bu strateji, popülasyonda sadece bir mutasyon olduğunda uygulanabilecektir. Fakat çoklu mutasyonların kombinasyonu, bu strateji çok kullanılabilir değildir. Çünkü tüm insektisitlere karşı protein direnç göstermeye başlar. Eğer bir alandaki popülasyon, farklı duyarlılıklara sahip farklı allellerin bir karışımı (bir allel çorbası gibi) ise ve bir pestisit birini seçerken diğerini eliyorsa, bu direnç stratejisi, popülasyonlara uygulamak için uygun görünmemektedir (Menozzi vd. 2004).

Bu nedenle, insektisit direnç yönetimi programının temel bileşeni, dirençli popülasyonda seçimli baskıyı azaltan insektisit olmayan kontrol metotlarının gelişimidir. Bu metotlar, ayrıca çevre kirliliğini, zeytin meyvesinin ve yağının kontaminasyonunu ve yararlı böceklerinin yıkımını da azaltmayı beraberinde getirecektir. Kitle yakalama programları (mass-trapping), steril böcek teknikleri, partikül film ve doğal düşmanlar kullanılarak biyolojik kontrol, daha önce bazı durumlarda çalışılan veya potansiyel görülen insektisit içermeyen alternatiflerdir. Bunlar arasında küçük insan girdileriyle daha etkili olan ve yüksek seviyede kontrol potansiyeli olan klasik biyolojik kontrol yöntemi, daha dikkate değer gibi görünmektedir (Daane ve Johnson, 2010).

Tüm sonuçlarımızı maddeler halinde özetleyecek olursak;

- Ülkemizde on iki popülasyonda *Ace* geni ekzon 3 ve 6 bölgelerinin baz dizi analizi sonucu elde edilen gen çeşitliliği değerleri karşılaştırıldığında Akdeniz popülasyonları Ege popülasyonlarına oranla daha yüksek gen çeşitliliği değerlerine sahiptir.
- Bunun yanı sıra *Ace* direnç seviyelerine bakıldığında ülkemizde direnç mutasyonları oranı yüksek bulunmuştur (0.49) ve bu direnç mutasyonlarını

bölgeler bazında kıyasladığımızda Ege popülasyonlarında (ekzon 3 ve 6 için sırasıyla; 0.68, 0.68) Akdeniz'e oranla (ekzon 3 ve 6 için sırasıyla; 0.18, 0.10) çok daha yüksek direnç mutasyon frekansları gözlenmiştir. Bu nedenle özellikle Ege bölgesinde oluşan bu direnç seviyelerine bağlı olarak alternatif mücadele yöntemleri uygulanması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

- Ekzon 3 ve 6 bölgelerinin baz dizi analizi sonucu elde edilen haplotipler incelendiğinde yalnızca ekzon 3'te ülkemize özgü bir yeni haplotip gözlenmiştir. Bunun dışında elde edilen baz dizilerinin büyük bir bölümü aynı haplotip gruplarında (ekzon 3'te haplotip 3, ekzon 6'da haplotip 2) yer almıştır. Bunun yanı sıra ada popülasyonunu temsil eden Gökçeada'ya özgü bir haplotip elde edilememiştir.
- Ile214Val ve Gly488Ser mutasyonu dışında farklı bir aminoasit mutasyonu gözlenmemiştir.
- Çalışmamız sonucunda direnç mutasyonlarının (özellikle ekzon 10'daki 9 baz çiftlik mutasyonun) gözlendiği en uzak noktanın Gaziantep-Hatay hattı olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, farklı lokasyonlardan toplanan zeytin sineği örneklerinde organofosfat direnci ile ilişkili mutasyonların tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Eğer popülasyonlar direnç geliştirmeye devam ederlerse, kullanılan insektisitler, efektif olmayan bir hale gelecektir. Bu nedenle, yukarıda bahsedilen tamamen test edilmemiş, insektisit olmayan alternatifler, özellikle de biyolojik kontrol için çok yoğun çalışmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abrahamson, W.G. ve Weis, A.E. (1997) *Evolutionary ecology across three trophic levels: goldenrods, gallmakers, and natural enemies*, *Monographs in Population Biology* 29. Baskı, Princeton University Press, Princeton, NJ, 456s.
- Ağar, S., Aydınoglu, H., Temel, O., İkizunal, K. ve Ece, H. (1991) Pestisit kullanımının tarihi, bugünü ve geleceği, *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 15 (4): 247-256.
- Aksu, S. (2000) Türkiye’de Zeytinyağı Üretimi, Tüketimi ve Dışsatımı, *Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi* 17-21 Ocak 2000, Ankara, Cilt I, 505-524.
- Allendorf, F.W. ve Luikart, G. (2007) *Conservation and the Genetics of Populations*. First Edition, Wiley- Blackwell, MA, USA.
- Anazawa, Y., Tomita, T., Aiki, T., Kozaki, T. ve Kono, Y. (2003) Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, *Insect Biochem Molec*, 33: 509-514.
- Angiolillo A., Mencuccini M. ve Baldoni L. (1999) Olive Genetic Diversity Assessed Using Amplified Fragment Length Polymorphisms, *Theor Appl*, 98: 411- 422.
- Anonim, 2013a, *Annual Data*. International Olive Oil Council, Madrid, Erişim Tarihi: Ocak 2013, <http://www.international-oliveoil.org>.
- Anonim, 2013b, *2010 yılı verileri*. Türkiye İstatistik Kurumu, Türkiye, Erişim Tarihi: Ocak 2013, <http://www.tuik.gov.tr>.
- Anonim, 2013c, <http://civr.ucr.edu>, Zeytin sineği ile ilgili resimler kullanıldı.
- Anonim, 2013d, www.agraria.org, Zeytin sineği ile ilgili resimler kullanıldı.
- Anonim, 2013e, www.dostoc.com, Zeytin sineği tuzakları ile ilgili resimler kullanıldı.

Anonim, 2013f, T.C. Devlet Planlama Teşkilatı Tarım İlaçları Çalışma Grubu Raporu (2008) Ankara. ISBN 978-975 – 19 – 4355-2, erişim adresi: <http://ekutup.dpt.gov.tr/>.

Anonim, 2013g, , www.cnsforum.com, Asetilkolinesteraz enzim yapısı kullanıldı.

Apostolidis, A.P., Karakousis, Y. ve Triantaphylidis, C. (1996) Genetic Divergence and phylogenetic relationship among *Salmo trutta l.* (Brown trout) population from Greece and European countries, *Heredity*, 76: 551–560.

Asch, B.V., Pereira-Castro, I., Rei, F. ve Teixeira da Costa L. (2012) Mitochondrial haplotypes reveal olive fly (*Bactrocera oleae*) population substructure in the Mediterranean, *Genetica*, DOI 10.1007/s10709-012-9669-2.

Augustinos, A.A., Stratikopoulos, E.E., Zacharopoulou, A. ve Mathiopoulos, K.D. (2002) Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*, *Mol Ecol Notes*, 2: 278-280.

Augustinos, A.A., Mamuris, Z., Stratikopoulos, E.E., D'Amelio, S., Zacharopoulou A. ve Mathiopoulos, K.D. (2005) Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species, *Genetica*, 125: 231-241.

Augustinos, A.A., Stratikopoulos, E.E., Drosopoulou, E., Kakani, E.G., Mavragani-Tsipidou, P., Zacharopoulou, A. ve Mathiopoulos, K.D. (2008) Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family, *BMC Genomics* , 9: 618-624.

Avise, J.C.A. (1991) Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA, *Annual Rev. Genetic*, 25: 45-69.

Avise, J.C.A. (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 684s.

Ayala, F. J., Powell, J. R., Tracey, M. L., Mourao, C. A. ve Perez-Salas, S. (1972) Enzyme variability in the *Drosophila willis toni* group. IV. Genetic variation in natural populations of *D. willistoni*. *Genetics*, 70: 113-139.

Bandelt, H.J., Forster, P. ve Rohl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies, *Mol Biol Evol*, 16: 37–48.

- Bardakçı, F. ve Karataş, M. (2005) *Balık Biyolojisi Araştırma Yöntemleri, Moleküler Belirteçler ve Sistematikte Kullanımı*, Nobel Yayınevi, Ankara, 15: 421–457.
- Bartolucci, C., Perola, E., Cellai, L., Brufani, M. ve Lamba, D. (1999) “Back Door” opening implied by the crystal structure of a carbamoylated acetylcholinesterase, *Biochemistry-US*, 38: 5714-5719.
- Başkurt, S. (2010) *Ege ve Akdeniz Bölgelerinden Toplanan Karasinek, (Musca Domestica L.) Popülasyonlarında Ace Geninin Kısmi Baz Dizi Analizinin Yapılması ve Bu Örneklerde % Kalan Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Muğla, 46s.
- Başkurt, S., Doğaç, E., Taşkın, V. ve Taşkın, B.G. (2011) Frequencies Of Organophosphate Resistance-Associated Mutations In The Acetylcholinesterase Gene Of Field Collected Olive Fly (*Bactrocera oleae*) Populations Under Different Insecticide Regimes, *Acta Bot Hung*, 62(1): 22-33.
- Başkurt, S., Taşkın, B.G., Doğaç, E. ve Taşkın, V. (2011) Polymorphism in the acetylcholinesterase gene of *Musca domestica* L. field populations in Turkey, *Journal of Vector Ecology*, 36 (2): 248-257.
- Başoğlu, M.İ. (2009) *Antik Çağda Kilikya Bölgesinde Zeytinyağı Üretimi (Olive Oil Product of Kilikia Region With Ancient Ages)*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 117s.
- Behura, S.K. (2006) Molecular Marker Systems in Insects: Current Trends and Future Avenues, *Mol Ecol*, 15 (11): 3087-3113.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. ve Bonhomme, F. 1996-2004. GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions; CNRS UMR 5000; Université Montpellier II, Montpellier (France).
- Bender, W., Spierer, P. ve Hogness, D.S. (1983) Chromosomal Walking and Jumping to Isolate DNA from the *Ace* and *rosy* Loci and *bithorax* Complex in *Drosophila melanogaster*, *J Mol Biol*, 168: 17–33.

- Bernatchez, L., Guyomard, R. ve Bonhomme, F. (1992) DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically remote European brown trout *Salmo trutta* populations, *Mol Ecol*, 1: 161–173.
- Bogenhagen, D. F. (1999). *Repair of mtDNA in vertebrates*, *Am.J.Hum.Genet*, 64: 1276-1281.
- Bozbuğa, R. (2007) *Adana İlinde Zeytin Sineği, Bactrocera oleae Gmel. (Diptera: Tephritidae)'nın Populasyon Takibi ve Parazitlerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 60s.
- Brown, W.M. (1985) *The mitochondrial genome of animals*, *Molecular Evolutionary Genetics*, Plenum Pres, New York, 130s.
- Bush, G.L. ve Kito, G.B. (1979) Research on the genetic structure of wild and laboratory strains of the olive fly, pp. 10–20 in FAO Report. Development of Pest Management Systems for Olive Culture Program. Rome: FAO.GRE69/525.
- Bruford, M.W., Bradley, D.G. ve Luikart, G. (2003) DNA Markers Reveal The Complexity Of Livestock Domestication, *Nat Genet*, 4: 2-12.
- Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*, (2nd Edition). Elsevier Academic Press, New York.
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Melis, M., Pirisi, F.M., Karim, M. ve Minelli, E.V. (1997) Persistence of insecticide residues in olives and olive oil, *J Agric Food Chem*, 45: 2244-2247.
- Canik, F. ve Yüksel, N.Y. (2012) Gıda Güvenliği ve Pestisitler. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü. Temmuz 2012 / ISSN: 1303–8346 / Sayı:14/Nüsha: 4.
- Cann, R. L., Stoneking, M. ve Wilson, A.C. (1987) Mitochondrial DNA and human evolution, *Nature*, 325: 31-36.
- Carey, J.R. ve Liedo, P. (1999) Mortality Dynamics of Insects: General Principles Derived from Aging Research on the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae), *American Entomologist*, 45: 49-55.
- Caterino, M.S., Cho, S. ve Sperling, H. (2000) The Current State of Insect Molecular Systematics: A Thriving Tower of Babel, *Annu Rev Entomol*, 45: 1-54.

- Chaabihi, H., Fournier, D., Fedon, Y., Bossy, J.P., Ravallec, M., Devauchelle, G. ve Cerruti, M. (1994) Biochemical characterization of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase expressed by recombinant baculoviruses, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203: 734–742.
- Chen, Z., Newcomb, R., Forbes, E., McKenzie, J. ve Batterham, P. (2001) The Acetylcholinesterase Gene and Organophosphorus Resistance in the Australian Sheep Blowfly, *Lucilia cuprina*, *Insect Biochem Molec*, 31: 805-816.
- Clarke, A.R., Armstrong, K.E., Carmichael, A.E., Milne, J.R. ve Raghu, S. (2005) Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies, *Annu Rev Entomol*, 50: 293–319.
- Claudianos, C., Russell, R.J. ve Oakeshott, J.G. (1999) The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly, *Insect Biochem Molec*, 29: 675-686.
- Cornuet, J.M. ve Luikart, G. (1997) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data, *Genetics*, 144: 2001-2014.
- Crozier, Y.C., Koulianos, S. ve Crozier, R.H. (1991) An improved test for Africanized honey bee mitochondrial DNA, *Experientia*, 47: 968-969.
- Daane, K.M. ve Johnson, M.W. (2010) Olive fruit fly: Managing an ancient pest in modern times, *Annu Rev Entomol*, 55: 151-169.
- Delen, N. (2008) *Fungisitler*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. ve Burçak, A. (2005) Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları, *Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre*, Ankara, 21s.
- Denholm, I., Devine, G.J. ve Williamson, M.S. (2002) Evolutionary genetics - Insecticide resistance on the move, *Science*, 297: 2222–2223.
- Dent, D. (2000) *Insect Pest Management*, Cabi Bioscience Ascot, UK, 432 s.

- Devonshire, A.L. (1975) Studies of the Acetylcholinesterase from Houseflies (*Musca domestica* L.) Resistant and Susceptible to Organophosphorus Insecticides, *Biochem. J*, 149: 463-469.
- Doolittle, W.F. (1999) Phylogenetic Classification and the Universal Tree, *Science*, 284 (5423): 2124-2129.
- Downie, D.A., Fisher, J.R. ve Granett, J. (2001) Grapes, galls, and geography: the distribution of nuclear and mtDNA variation across host plant species and regions in a specialist herbivore, *Evolution*, 55: 1345–1362.
- Durmuşoğlu, E., Tiryaki, O. ve Canhilal, R. (2010) Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları, *VII. Türkiye ZiraatMühendisliği Teknik Kongresi*, 11-15 Ocak, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, Bildiriler Kitabı, 2:589-607.
- Eisen, J.A. (2000) *Mechanistic basis for microsatellite instability (in:Microsatellites Evolution and Applications*, Oxford University Press, Newyork, p: 34–36.
- Elliot, M., Jamees, N.F. ve Potter, C. (1978) The future of pyrethroids in insect control, *Annu Rev Entomol*, 23: 443-469.
- Enayati, A.A., Ranson, H. ve Hemingway, J. (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance, *Insect Mol Biol*, 14 (1): 3-8.
- Estrada-Mondaca, S., Lougarre, A. ve Fournier, D. (1998) Drosophila acetylcholinesterase: effect of post-translational modifications on the production in the Baculovirus system and substrate metabolism, *Arch. Insect Biochem. Physiol*, 38: 84–90.
- Excoffier, L., Laval, G. ve Schneider, S. (2005) ARLEQIN (ver. 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis, *Evol Bioinform*, 1: 47-50.
- Falush, D., Stephens, M. ve Pritchard, J.K. (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies, *Genetics*, 164: 1567–1587.
- Felsenstein, J. (1994) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the Author. Department of Genome Sciences, University of Washington: Seattle.

- Fletcher, B.S. (1987) The biology of dacine fruit flies, *Annu Rev Entomol*, 32: 115–144.
- Fletcher, B.S. (1989a) *Temperature–development rate relationships of the immature stages and adults of tephritid fruit flies*, Elsevier, Amsterdam 289s.
- Fletcher, B.S. (1989b) *Life history of Tephritid fruit flies. In: Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Elsevier Sc. Publishers, Amsterdam, 208s.
- Fletcher, BS (1989c) *Movements of Tephritid fruit flies. In: Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Elsevier Sc. Publishers, Amsterdam, 219s.
- Fidan, A. Z. (1995) *A study on the sturcture of natural trout populations in Turkey*, Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Ankara, 56s.
- Foote, R.H. (1984) *Family Tephritidae*, Budapest and Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 466s.
- Fournier, D., Karch, F., Bride, J.M., Hall, L.M.C., Berge, J.B. ve Spierer, P. (1989) *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene, structure evolution and mutations, *J Mol Evol*, 210: 15-22.
- Fournier, D., Muterio, A. ve Rungger, D. (1992) *Drosophila* acetylcholinesterase; expression of a functional precursor in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Biochem*, 203: 513–519.
- Fournier, D. (2005) Mutations of Acetylcholinesterase, Which Confer Insecticide Resistance in Insect Populations, *Chem Biol Interact*, 157: 257-261.
- Friedlander, T.P., Regier, J.C. ve Mitter, C. (1992) Nuclear Gene Sequences for Higher Level Phylogenetic Analysis: 14 Promising Candidates, *Syst Biol*, 41 (4): 483-490.
- Georghiou, G.P. (1986) *The Magnitude of Resistance Problem. Pesticide Resistance Strategies and Tactics for Management. National Reserach Council (U.S.)*, National Academy Press, Washington, 43s.
- Georghiou, G.P. ve Lagunes-Tejeda, A. (1991) *The Occurrence of Resistance to Pesticides in Arthropods*, Food and Agriculture Organization, Rome, 313s.

- Gillespie, J.H. ve Langley, C.H. (1974) A general model to account for enzyme variation in natural populations, *Genetics*, 76: 837-848.
- Gillott, C. (1995) Entomology, Second Edition, ISBN 0-306-44966-8 (Hardbound), ISBN 0 306-44-967-6 (Paperback), Plenum pres-New York and London.713-715s.
- Gómez, A. (1998) Allozyme Electrophoresis: Its Application to Rotifers, *Hydrobiologia*, 385-393.
- Goudet, J. (2002) FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Guerro, F.H. (2000) Cloning of a horn fly cDNA, *HiaE7*, encoding an esterase whose transcript concentration is elevated in diazinon-resistant flies, *Insect Bio Molec*, 30: 1107-1115.
- Gupta, R.C. (2007) *Veterinary Toxicology*, İkinci Baskı, Londra, 1437s.
- Gümüşay, B., Özilbey, U., Ertem, G. ve Otkar, A. (1990) Studies on the susceptibility of some important table and oil olive cultivars of Aegean Region to olive fly (*Dacus oleae* Gmel.) in Turkey, *Acta Horti*, 286: 359–361.
- Gümüşay, B. (1998) Bazı böceklerin zeytin ve zeytinyağının kalite ve kantitesine etkileri, *Zeytin Yetiştiriciliği Kursu*, Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Bornova-İzmir, Yayın No: 60, 221s.
- Han, Z., Graham, D. ve Moores, G.D., Denholm, I., ve Devonshire, A.L. (1998) Association between Biochemical Markers and Insecticide Resistance in the Cotton Aphid, *Aphis gossypii*, *Glo Pestic Biochem Phys*, 62: 164–171.
- Han, H.Y. ve Ro, K.E. (2009) Molecular phylogeny of the family Tephritidae (Insecta: Diptera): new insight from combined analysis of the mitochondrial 12S, 16S, and COII genes, *Mol Cells*, 27: 55–66.
- Haniotakis, G.E. (2003) Olive pest control: present status and prospects, *Integrated Protection of Olive Crops*, 29-31 Mayıs, Yunanistan, 28 (9): 1-9.

- Hannah, J.B. ve Zalom, F.G. (2008) Olive fruit fly (Diptera: Tephritidae) ovipositional preference and larval performance in several commercially important olive varieties in California, *J Econ Entomol*, 101 (3): 750–758.
- Hawkes, N.J., Janes, R.W., Hemingway, J. ve Vontas, J. (2005) Detection of Resistance Associated Point Mutations of Organophosphate Insensitive Acetylcholinesterase in the Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin), *Pestic Biochem Phys*, 81: 154-163.
- Henderson, S.T. ve Petes, T.D. (1992): Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol*, 12: 2749- 2757.
- Hemingway, J. (2000) The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance, *Insect Biochem Molec*, 30: 1009-1015.
- Hemingway, J. ve Ranson., H. (2000). Insecticide resistance in Insect Vectors of Human Disease, *Annu Rev Entomol*, 45: 371-391.
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarrol, L. ve Ranson, H. (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes, *Insect Biochem Molec*, 34: 653–665.
- Hills, D.M. ve Moritz, C. (1990) *Molecular systematics*, Sinauer associates, Sunderland Massachusetts, 250s.
- Hoelzel, A.R. (1995) *Genetic Analysis of Populations*, VCH Publishers, Inc, New York, 468s.
- Holton, T. A. (2001) *Plant Genotyping The DNA Fingerprinting of Plants*, CAB International, 333s.
- Houde, M., Tiveron, M.C. ve Brégégère, F. (1989) Divergence of the nucleotide sequences encoding xanthine dehydrogenase in *Calliphora vicina* and *Drosophila melanogaster*. *Gene* 85: 391–402.
- Hoy, M.A. (2003) *Insect Molecular Genetics*, in *Insect Molecular Genetics*, Academic Press, 399s.
- Hubby, J.L. ve Lewontin, R.C. (1966) A Molecular Approach to the Study of Genic Heterozygosity in Natural Populations I. The Number of Alleles at Different Loci in *Drosophila Pseudoobscura*, *Genetics*, 54 (2): 577-594.

- Hwang, U.W. ve Kim, W. (1999) General Properties and Phylogenetic Utilities of Nuclear Ribosomal DNA and Mitochondrial DNA Commonly Used in Molecular Systematics, *Korean J Parasitol*, 37 (4): 215-228.
- Iannotta, N., Perri, L., Tocci, C. ve Zaffina, F. (1999) The behavior of different olive cultivars following attacks by *Bactrocera oleae* (Gmel.), *Acta Hort*, 474: 545–548.
- Iannotta, N., Noce, M.E., Ripa, V., Scalercio, S. ve Vizzarri, V. (2007) Assessment of susceptibility of olive cultivars to the *Bactrocera oleae* (Gmelin, 1790) and *Camarosporium dalmaticum* (Thum.) Zachos & Tzav.-Klon. attacks in Calabria (Southern Italy)., *J Environ Sci Health, Part B* 42: 789–93.
- Jeffrey, G.S. (1999) Cytochromes P450 and insecticide resistance, *Insect Biochem Molec*, 29: 757-766.
- Kakani, E.G. ve Mathiopoulos, K.D. (2008a) Organophosphate Resistance-Related Mutations in the Acetylcholinesterase gene of Tephritidae, *J Appl Entomol*, 132: 762-771.
- Kakani, E.G., Ioannides, I.M., Margaritopoulos, J.T., Seraphides, N.A., Skouras, J.A. ve Mathiopoulos, K.D. (2008b) A Small Deletion in the Olive Fly Acetylcholinesterase gene Associated with High Levels of Organophosphate Resistance, *Insect Biochem Molec*, 38: 781-787.
- Kantarıcı, M. (2007) Global BKU pazarı ve Ar-ge, *Tarım ilaçları Kongre ve Sergisi*, 25-26 Ekim, Ankara, Bildiri Kitabı, 13-23.
- Karhu, A. (2001) *Evolution and applications of pine microsatellites*. Academic Dissertation, Faculty of Science, University of Oulu, Finland.
- Katsoyannos, B.I. ve Kouloussis, N.A. (2001) Captures of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* on spheres of different colours, *Entomol Exp Appl*, 100: 165–72.
- Koçak, Ö. (1998) Zararlı Savaşımı. Hacettepe Üniversitesi Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, İsektisid Test Üretim Birimi, Ankara.
- Korneyev, V.A. (1999) *Phylogenetic relationships among higher groups of Tephritidae*, CRC Press, Boca Raton, 944s.

- Kozaki, T., Shono, T., Tomita, T. ve Kono Y. (2001) Fenitroxon Insensitive Acetylcholinesterases of the Housefly, *Musca domestica*, Associated with Point Mutations, *Insect Biochem Molec*, 31: 991-997.
- Kristensen, M. (2005) Glutathione S-Transferase and Insecticide Resistance in Laboratory Strains and Field Populations of *Musca domestica*, *J Econ Entomol*, 98 (4): 1341-1348.
- Kuyucu, A.C. (2007) *İnsektisit Direncinin Karasinek, Musca Domestica L. (Diptera: Muscidae)'nin Uyumsal Özellikleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 108s.
- Langella, O. Populations 1.2.31: a population genetic software. 1999. CNRS UPR9034. Available at <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations> Erişim Tarihi: 5 Ağustos 2012.
- Levin, B.R. (1984) Science as a way of knowing evolutionary biology, *Annual Zoology*, 24: 467-534.
- Lewontin, R.C. (1989) *DNA Sequence Polymorphism "Evolution and Animal Breeding Reviews on Molecular and Quantitative Approaches in Honour of Alan Robertson*, CAB International, UK.
- Librado, P. ve Rozas, J. (2009) DNA SP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187.
- Litt, M. ve Luty, J.A. (1989) A Hypervariable Microsatellite Revealed by in Vitro Amplification of a Dinucleotide and Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene, *Am J Hum Genet*, 44: 397-401.
- Liu, B.H.(1998) *Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis*. CRC Press LLC, Boca Raton New York.
- Lockridge, O., Blong, R.M., Masson, P., Froment, M.T., Millard, C.B. ve Broomfield, C.A. (1997) A single amino acid substitution, Gly-»His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase, *Biochemistry-US*, 36: 786-795.
- Lorbeer, J.W., Delen, N., Tosun, N., Maloy, O.C. ve Murray, T.D. (2001) Chemical control, *Enc Plant Pathology*, 2 :199-203.

- Loukas, M. (1989) *Population genetic studies of fruit flies of economic importance, especially medfly and olive fruit fly, using electrophoretic methods*, Clarendon Press, Oxford, 102s.
- Loukas, M., Economopoulos, A.P., Zouros, E. ve Vergini, Y. (1985) Genetic changes in artificially reared colonies of the olive fruit fly (Diptera: Tephritidae), *Ann Entomol Soc Am*, 78: 159–165.
- Loxdale, H.D. ve Lushai, G. (1998) Molecular Markers in Entomology, *B Entomol Res*, 88 (6): 577-600.
- Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M.F ve Di Giusto, F. (2004) Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europea* L.) in the Mediterranean Basin, *Heredity*, 92: 343–351.
- Maczkowiak, F. ve Da Lage, J.L. (2006) Origin and evolution of the *Amyrel* gene in the α -amylase family of Diptera. *Genetica* 128: 145–158.
- Malcolm, C.A., Bourguet, D., Ascolillo, A., Rooker, S.J., Garvey, G.F., Hall, L.M., Pasteur, N. ve 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.
- Margaritopoulos, J.T., Skavdis, G., Kalogiannis, N., Nikou, D., Morou, E., Skouras, P.J., Tsitsipis, J.A. ve Vontas, J. (2008) Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera oleae* populations from Greece, and improved diagnostic for an AChE mutation, *Pest Manage Sci*, 64: 900–908.
- Matsumura, F., 1985. Toxicology of Insecticides. Plenum Press 598s.
- Menzio, P., Shi, M.A., Lougarre, A., Tang, Z.H. ve Fournier, D. (2004) Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations, *BMC Evol Biol*, 4: 4-11.
- Montiel Bueno A. ve Jones O. (2002) Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants West Palaearctic Regional Section (IOBC/WPRS) Bulletin*, 25: 1–11.
- Moore, J.A. (1984) Science as a way of knowing evolutionary biology, *Annual Zoology*, 24: 467-471.

- Morton, R. A. ve Singh, R. S. (1982) The association between malathion resistance and acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*, *Biochem. Genet*, 20: 179-197.
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. ve Vallette, F.M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases, *Prog. Neurosci*, 41: 31–91.
- Mourikis, P.A. ve Fytizas, E. (1970) Review of olive-fly ecology in relation to the sterile-male technique, *Energy Agency Symp*, Vienna, 131–139.
- Mutero, A. ve Fournier, D. (1992) Post-translational modifications of *Drosophila* acetylcholinesterase. *J Biol Chem*, 267: 1695–1700.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M. ve Fournier, D. (1994) Resistance associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase, *Proc Natl Acad Sci*, 91: 5922-5926.
- Nabeshima, T., Mori, A., Kozaki, T., Iwata, Y., Hidoh, O., Harada, S., Kasai, S., Severson, D.W., Kono, Y. ve Tomita, T. (2004) An amino acid substitution attributable to insecticideinsensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*, *Biochem Biophys Res Commun*, 313: 794-801.
- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R. ve Frati, F. (2003) The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations, *Insect Mol Biol*, 12: 605-611.
- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G.K. ve Frati, F. (2005) Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae), *Mol Ecol*, 14: 2729-2738.
- Nardi, F., Carapelli, A., Vontas, J.G., Dallaia, R., Roderick, G.K. ve Fratia, F. (2006) Geographical distribution and evolutionary history of organophosphate-resistant Ace alleles in the olive fly (*Bactrocera oleae*), *Insect Biochem Molec*, 36: 593–602.
- Nardi, F., Carapelli, A., Boore, J.L., Roderick, G.K., Dallai, R. ve Frati, F. (2010) Domestication of olive fly through a multi-regional host shift to cultivated olives: Comparative dating using complete mitochondrial genomes, *Mol Phylogenet Evol*, 52 (2): 678-686.
- Nardi, F. ve Frati, F. (2011) The Olive Fly *Bactrocera oleae* Keeping Up In An Ever Changing Environment, *Team News Letter*, 10: 3-8.

- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York, 512s.
- Nei, M. ve Kumar, S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, London, 333s.
- Nelson, D.L. ve Cox, M.M. (2005) *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Palme Yayıncılık, Türkiye, 632s.
- Neuenschwander, P. ve Michelakis, S. (1978) The infestation of *Dacus oleae* Gmel. (Dip.: Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete, *Z Angew Entomol*, 86: 420-433.
- Neuenschwander, P. ve Michelakis, S. (1979) Determination of the lower thermal thresholds and day-degree requirements for eggs and larvae of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera: Tephritidae) under field conditions in Crete, Greece. *Bull Soc Entomol Suisse*, 52: 57-74.
- Neuenschwander, P. (1982) Beneficial insects caught by yellow traps used in mass-trapping of the olive fruit fly *Dacus oleae*, *Entomol Exp Appl*, 32: 286-96.
- Neuenschwander, P., Michelakis, S., Holloway, P. ve Berchtol, W. (1985) Factors affecting the susceptibility of fruits of different olive varieties to attack by *Dacus oleae* (Gmel.) (Dipt., Tephritidae), *J Appl Entomol*, 100: 174-188.
- Newcomb, R.D., Gleeson, D.M., Yong, C.G., Russell, R.J. ve Oakeshott, J.G. (2005) Multiple mutations and gene duplications conferring organophosphorous insecticide resistance have been selected at the Rop-1 locus of the sheep bowfly, *Lucilia cuprina*, *J Mol Evol*, 60: 207-220.
- Norrbom, A.L. (1999) *A Generic reclassification an pylogeny of the tribe Myopitini (Tephritinae)*, CRC Press, Boca Raton. 944s.
- Oakeshott, J.G., Claudianas, C., Russell, R.J. ve Robin, G.C. (1999) Carboxyl/cholinesterase: A case study of the evolution of a successful multigene family, *Bio Essays*, 21: 1031-1042.
- Oakeshott, J.G., Van Papenrecht, E.A., Boyce, T.M, Healy, M.J. ve Russell, R.J. (1993) Evolutionary genetics of *Drosophila esterases*, *Genetica*, 90: 239-268.

- Ochando, M.D. ve Reyes, A. (2000) Genetic population structure in olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin): gene flow and patterns of geographic differentiation, *J Appl Entomol*, 124: 177-183.
- Oybak, G. (2005) *Muğla'nın Karya Bölgesi Sınırları İçindeki Yörelerde Eski Çağlarda ve Günümüzde Zeytinyağı Üretiminin Ekonomik ve Sosyo-Kültürel Boyutu ile İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 92s.
- Öncüer, C. (2004) *Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları*, Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, Aydın, 424s.
- Özdoğan, M. ve Başgelen, N. (2007) *Türkiye'de Neolitik Dönem*, Arkeoloji ve Sanat Yayınları, İstanbul, 440s.
- Öztürk, S. (1997) *Tarım ilaçları*, Geliştirilmiş 2. Baskı, AK basımevi, İstanbul, 551s.
- Öztürk, F. (2006) *Türkiye zeytincilik sektörünün genel durumu, Zeytin Yetiştiriciliği*, Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, Bornova-İzmir Yayın No: 61, 137s.
- Paigen, K. (1979) Acid hydrolases as models of genetic control, *Annual Genetics*, 13: 417-466.
- Pala, Y., Nogay, A., Damgacı, E. ve Altın, M. (2001) *Zeytin Bahçelerinde Entegre Mücadele Teknik Talimatı*, Tarım ve Köy işleri Bakanlığı, TAGEM, Ankara.
- Palaisa, K., Morgante, M., Tingey, S. ve Rafalski, A. (2004) Long-range patterns of diversity and linkage disequilibrium surrounding the maize Y1 gene are indicative of an asymmetric selective sweep, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (26): 9885–9890.
- Passarge, E. (1995): *Color Atlas of Genetics*. (Second Edition). Thieme Press, New York.
- Pedigo, L.P. (1996) *Entomology and Pest Management*. Prentice Hall Inc, 679s.
- 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, *Pestic Biochem Phys*, 22: 194-201.

- Pritchard, J.K., Stephens, M. ve Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*, 155: 945–959.
- Polzin, T. ve Daneschmand, S.V. (2003) On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs, *Oper Res Lett*, 31: 12–20.
- Powell, W., Macharay, G.C. ve Provan, J. (1996) Polymorphism Revealed by Simple Sequence Repeats, *Trends Plant Genetics*, 1: 215–222.
- Rice, W.R. (1989) Analysis tables of statistical tests, *Evolution*, 43: 223–225.
- Rice, R.E. (2000) Bionomics of Olive Fruit Fly *Bactrocera (Dacus) oleae*, *US Plant Protection Quarterly*, 10: 1-6.
- Rice, R.E., Phillips, P.A., Stewart-Leslie, J. ve Sibbett, G.S. (2003) Olive fruit fly populations measured in central and southern , *Calif Agr* , 57: 122–127.
- Richardson, B.J., Brian, P. ve Adams, M. (1986) *Allozyme Electrophoresis: A Handbook for Animal Systematics and Population Studies*, Academic Press, London, 420s.
- Richter, C. (1988) Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging?, *FEBS lett*, 241:1-5.
- Ridout, C.R. ve Donini, P. (1999) Use of AFLP in cereals research, *Trends in Plant Science*, 4:76-79.
- Rinkevich, F.D., Zhang, L., Hamm, R.L., Brady, S.G., Lazzaro, B.P., Scott, J.G. (2006) Frequencies of the pyrethroid resistance alleles of *Vssc1* and *CYP6D1* in house flies from the eastern United States, *Insect Mol Biol*, 15: 157-167.
- Ripoll, D.R., Faerman, C.H., Axelsen, P.H., Silman, I. Ve Sussman, J.L. (1993) An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase, *Proc Natl Acad Sci*, 90: 5128-5132.
- Rokas, A., Ladoukakis, E. ve Zouros, E. (2003) Animal mitochondrial recombination revisited, *Trends Ecol Evol*, 18 (8): 411-417.
- Roush, R.T. (1989) Designing Resistance Management Programs: How Can We Choose?, *Pest Sci*, 26: 423-441.

- Rowan, R.G. ve Hunt, J.A. (1991) Rates of DNA change and phylogeny from the DNA sequences of the alcohol dehydrogenase gene for five closely related species of Hawaiian *Drosophila*, *Mol Biol Evol*, 8: 49-70.
- Röder, M.S., Plaschke, P., König, S.U., Börner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D. ve Ganai, M.W. (1995) Abundance, Variability and chromosomal Location of Microsatellites in Wheat, *Molecular Gen Genet*, 246: 327–333.
- Russell, R.J., Claudianos, C., Campbell, P.M., Horne, I., Sutherland, T.D. ve Oakeshott, J.G. (2004) Two Major Classes of Target Site Insensitivity Mutations Confer Resistance to Organophosphate and Carbamate Insecticides, *Pestic Biochem Phys*, 79: 84-93.
- Saghai Maroof, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q. ve Allard, R.W. (1994) Extraordinarily Polymorphic Microsatellite DNA in Barley: Species Diversity, Chromosomal Locations and Populations Dynamics, *P Natur Ac Scien*, 91: 5466–5470.
- Scott, J. G. ve Zhang, L. (2003) The house fly aliesterase gene (M α E7) is not associated with insecticide resistance or P450 expression in three strains of house fly, *Insect Biochem Molec*, 33: 139-144.
- Segura, M.D., Callejas, C. ve Ochando, M.D. (2008) *Bactrocera oleae*: a Single Large Population in Northern Mediterranean Basin, *J Appl Entomol*, 132: 706-713.
- Selwood, T., Feaster, S.R., States, M.J., Pryor, A.N. ve Quinn, D.M. (1993) Parallel mechanisms in acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of choline esters, *J Am Chem Soc*, 115: 10477.
- Sert, S. (2005) Zeytin sineği (*Bactrocera oleae* (Gmel.)) (Diptera: Tephritidae) ' nin savaşımında alternatif mücadele yöntemlerinin kullanılması, Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 47s.
- Shi, M.A., Yuan, J.Z., Wu, J., Zhuang, P.J., Wu, X.F. ve Tang, Z.H. (2002) Kinetic analysis of acetylcholinesterase in a propoxur-resistant strain of housefly (*Musca domestica*) from Shanghai, *China Pestic Biochem Physiol* 72: 72–82.
- Shi, M.A., Lougarre, A., Alies, C., Fremaux, I., Tang, Z.H., Stojan, J. ve Fournier, D. (2004) Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance, *BMC Evol Biol*, 4: 1-5.

- Shi, W., Kerdelhue, C. ve Ye, H. (2012) Genetic Structure and Inferences on Potential Source Areas for *Bactrocera dorsalis* (Hendel) Based on Mitochondrial and Microsatellite Markers, *Plos One*, 7 (5): 37083-37089.
- Silvestri, F. (1914). Report on an expedition to Africa in search of natural enemies of fruit flies (Tropididae) with descriptions, observations and biological notes. *Hawaii Board Agric. For Div Entomol Bull*, 3: 1–146.
- Simon, S. ve Massoulie, J. (1997) Cloning and expression of acetylcholinesterase from *Electrophorus* splicing pattern of the 30 exons in vivo and in transfected mammalian cells, *J Biol Chem*, 272: 33-45.
- Skouras, P.J., Margaritopoulos, J.T., Seraphides, N.A., Ioannides, I.M., Kakani, E.G., Mathiopoulos, K.D. ve Tsitsipis, J.A. (2007) Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus, *Pest Manage Sci*, 63: 42–48.
- Slatkin, M. (1985) Rare alleles as indicators of gene flow, *Evolution*, 39: 53–65.
- Smith, D.R., Brown, W.M. ve Taylor, O.R. (1989) Neotropical Africanized bees have African mitochondrial DNA, *Nature (Lond)*, 339: 213-215.
- Smith, D.R. (1991) *Mitochondrial DNA and honey bee biogeography*, CO Westview, 176s.
- Soderlund, D.M. ve Knipple, D.C. (2003) The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides, *Insect Biochem Molec*, 33: 563–577.
- Stasinakis, P., Katsares, V. ve Mavragani-Tsipidou, P. (2001) Organophosphate resistance and allelic frequencies of esterases in the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), *J Agric Urban Entomol*, 18: 157–168.
- Staub, J.E., Serquen and, F.C. ve Gupta, M. (1996) Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding, *HortScience*, 31: 729-740.
- Susman, L., Hare, M., Frolov, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. ve Silman, I. (1991) Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a Prototypic Acetylcholine Binding Protein, *Science*, 53: 872-879.

- Şanlı Y. (1998) *Veteriner İlaçları Rehberi ve Bilinçli İlaç Kullanım El Kitabı*. ICC Yayınevi, Ankara.
- Tanksley, S.D., Ganai, M.V., Prince, J.P., Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, G.B., Roder, M.S. ve Young, N.D. (1992). High density molecular maps of the tomato and potato genomes, *Genetics*, 132: 1141-1160.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. ve Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) using maximum likelihood , evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol Biol Evol*, 28: 2731-2739.
- Taşkın, V., Başkurt, S., Doğaç, E. ve Taşkın, B.G. (2011) Frequencies of pyrethroid resistance-associated mutations of *Vssc1* and *CYP6D1* in field populations of *Musca domestica* L. in Turkey, *Journal of Vector Ecology*, 36 (2): 239-247.
- Tautz, D. (1989) Hypervariable of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers, *Nucleic Acids Res*, 17: 6463-6471.
- Tiryaki, O., Canhilal, R. ve Horuz, S. (2010) Tarım ilaçları kullanımını ve riskleri, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26 (2): 154-169.
- Tobias, J.M., Kollros, J.J. ve Savit, J. (1946) Contact Versus Internal Action of DDT, *J. Pharm. Exp. Therap*, 86: 287-294.
- Torres-Villa, L.M., Rodriguez-Molina, M.C. ve Martinez, J.A. (2003) Olive fruit fly damage and olive storage effects on paste microflora and virgin olive oil acidity, *Grasas Aceites*, 54: 285-94.
- Tsakas, S.C. ve Krimbas, C.B. (1974) How many genes are selected in populations of *Dacus oleae*, *Genetics*, 79: 675-679.
- Tsakas, S.C. ve Zouros, E. (1980) Genetic differences among natural and laboratory-reared populations of the olive fruit fly *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae), *Entomol Exp Appl*, 28: 268-276.
- Tsiropoulos, G.J. (1977) Reproduction and survival of adult *Dacus oleae* feeding on pollens and honeydews (Diptera: Tephritidae), *Environ Entomol*, 6: 390-92.

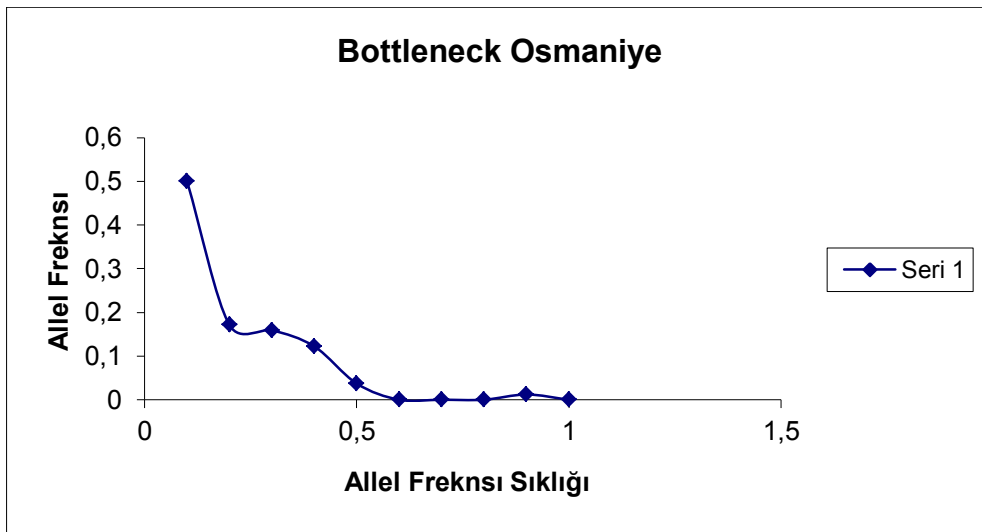
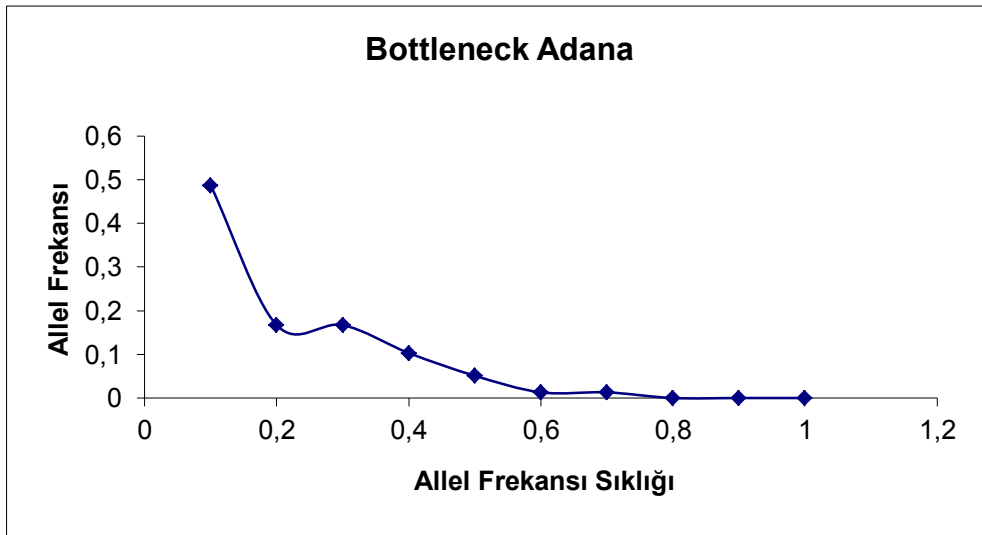
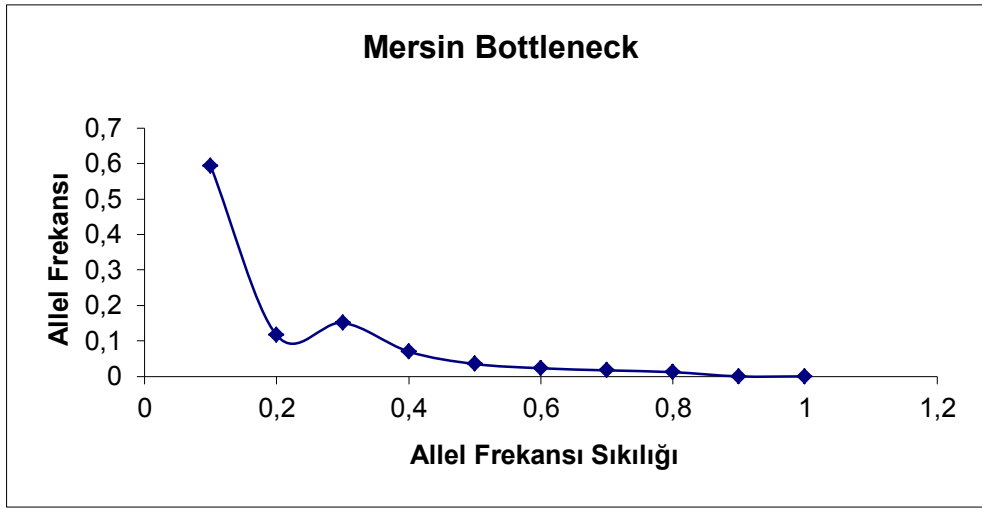
- Tsitsipis, J.A. (1980) Effect of constant temperatures on larval and pupal development of olive fruit flies reared on artificial diet, *Environ Entomol*, 9: 764–768.
- Tzanakakis, M.E. (2003) Seasonal development and dormancy of insects and mites feeding on olive: a review, *Neth J Zool*, 52: 87–224.
- Tzanakakis, M.E. (2006) *Insects and Mites Feeding on Olive: Distribution, Importance, Habits, Seasonal Development and Dormancy*, Brill Acad. Publ, Leiden, 182s.
- Ünal, G. ve Gürkan, M. O. (2001) *İnsektisitler kimyasal yapıları, toksikolojileri ve ekotoksikolojileri*, Ethemoglu Ofset Matbaacılık, Ankara, 165s.
- Walsh, S.B., Dolden, T.A., Moores, G.D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A.L. ve Williamson, M.S. (2001) Identification and characterisation of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance, *Biochem J*, 359: 175-181.
- Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Philips, A., Fort, P. ve Raymond, M. (2003) Insecticide resistance in mosquito vectors, *Nature*, 423: 137-139.
- White, I.M. ve Wang, X.J. (1992) Taxonomic notes on some Dacinae (Diptera: Tephritidae) fruit flies associated with citrus, olives and cucurbits, *Bull Entomol Res*, 82: 275 –279.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. ve Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Villatte, F., Ziliani, P., Marcel, V., Menozzi, P. ve Fournier, D. (2000) A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance, *Pestic Biochem Physiol*, 67: 95-102.
- Vontas, J., Hernandez-Crespo, P., Margaritopoulos, J.T., Ortego, F., Feng, H., Mathiopoulou, K.D. ve Hsu, J. (2011) Insecticide resistance in Tephritid flies, *Pest Biochem Physiol*, 100: 199-205.

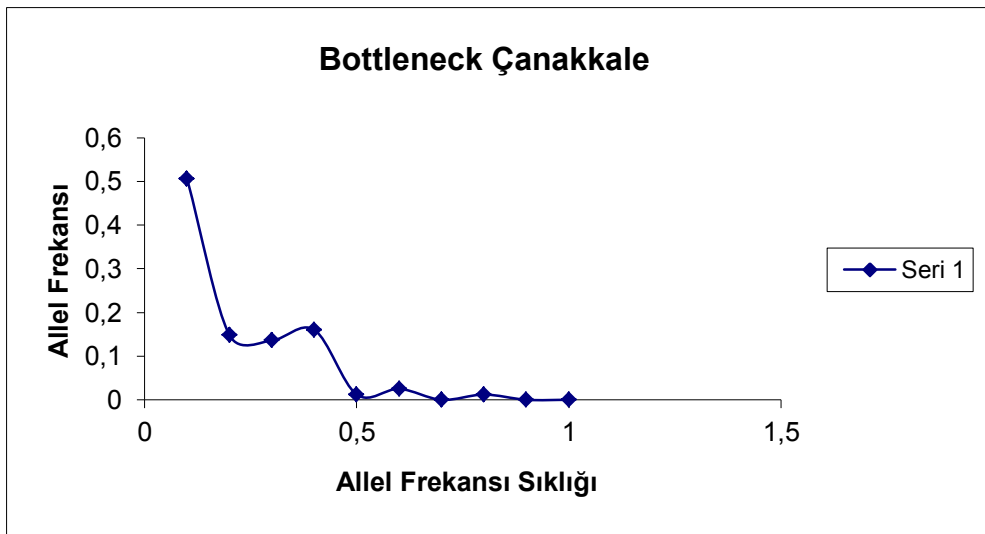
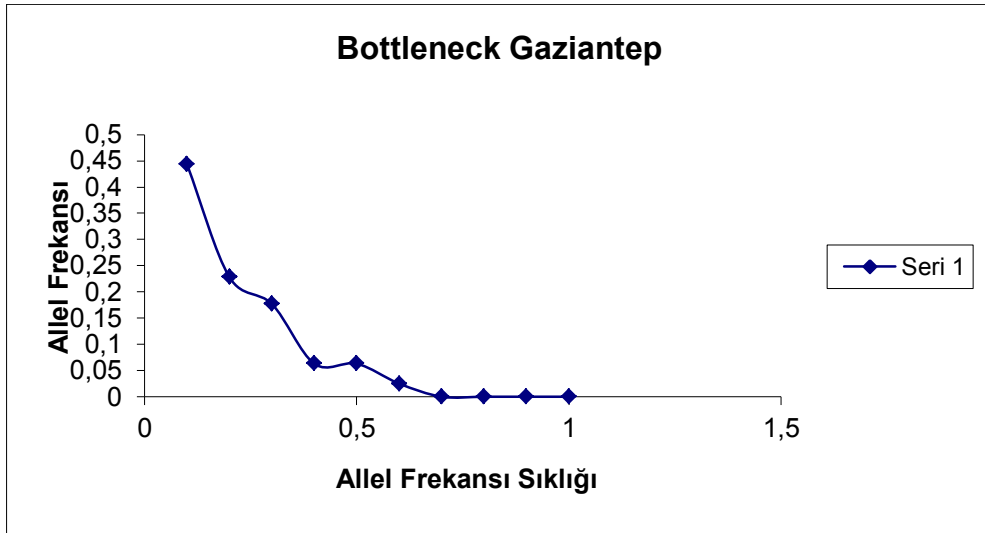
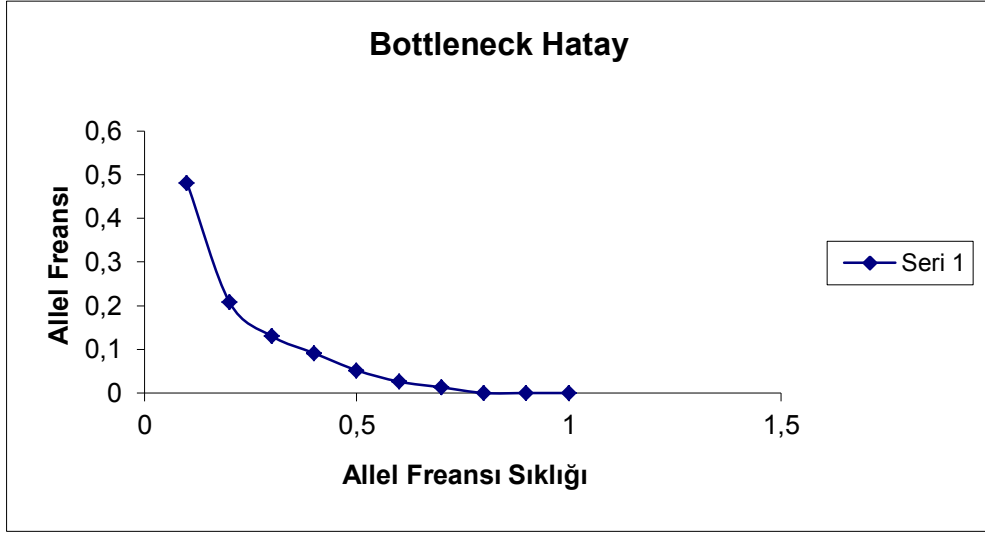
- Vontas, J.G., Cosmidis, N., Loukas, M., Tsakas, S., Hejazi, M.J., Ayoutanti, A. Ve Hemingway, J. (2001) Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, *Pestic Biochem Physiol*, 71: 124-132.
- Vontas, J.G., Hejazi, M.J., Hawkes, N.J., Cosmidis, N., Loukas, M. ve Hemingway, J. (2002) Resistance-Associated Point Mutations of Organophosphate Insensitive Acetylcholinesterase in the Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae*, *Insect Mol Biol*, 11: 329-336.
- Vontas, J.G., Hejazi, M.J., Hawkes, N.J., Cosmidis, N., Loukas, M., Janes, R.W. ve Hemingway, J. (2003) Corrigendum, *Insect Mol Biol*, 12: 413-418.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijnders, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. ve Zabeau, M. (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acid Res*, 21: 4407-4414.
- Wright, S. (1978) *Evolution and the genetics of populations*, Univ of Chicago Press, Chicago, 480s.
- Yang, L., Wiegmann, B.M., Yeates, D.K. ve Irwin, M.E. (2000) Higher-level phylogeny of the Therevidae (Diptera: Insecta) based on 28S ribosomal and elongation factor-1 α gene sequences. *Molec Phylogenet Evol*, 15: 440-451.
- Yaran, M. (2009) *Gaziantep ili Meyve Sinekleri (Diptera:Tephritidae) faunası ve sistematiği üzerine araştırmalar*, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep. 104s.
- Yaşar, B. (1996) *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ders Kitabı*, Ziraat Fakültesi Yayınları ve Basım Bürosu No: 11, 70s.
- Yeh, F.C., Boyle, T., Rongcai, Y., Ye, Z. ve Xiyan, J.M. (1999) POPGENE VERSION 1.31 Microsoft window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Available: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>, Erişim tarihi 12 Mayıs 2012.
- Yong, H.S. (1992) Allozyme variation in the melon fly *Dacus cucurbitae* (Insecta: Diptera: Tephritidae) from Peninsular Malaysia, *Comp Bioch Phys*, 102 (B): 367- 370.
- Zhang, W., Jiang, F. ve Ou, J.F. (2011) Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus, *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 1 (2):125-144.

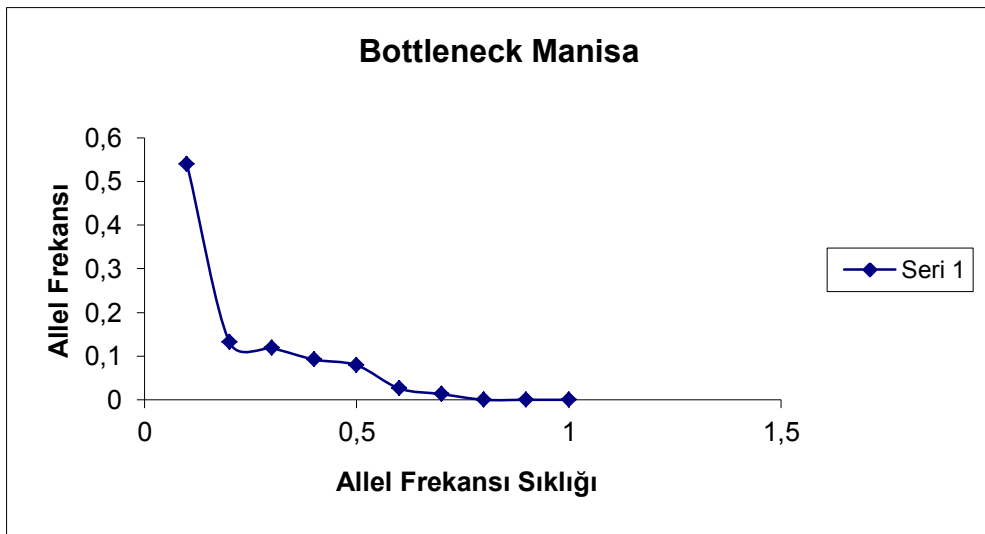
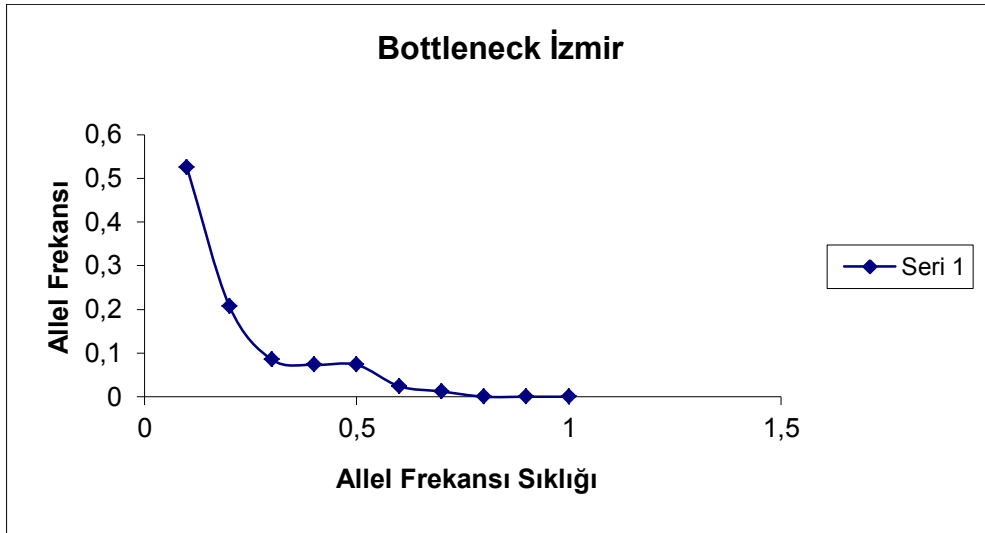
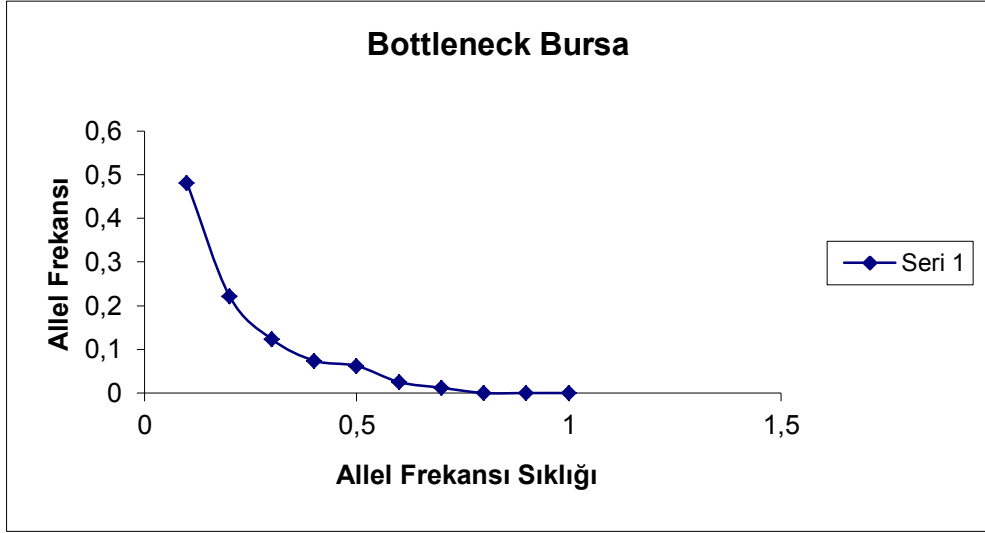
- Zhu, K.Y. ve Clark, J.M. (1995) Cloning and sequencing of a cDNA encoding acetylcholinesterase in Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), *Insect Biochem Molec*, 25: 1129-1138.
- Zobar, H. (2008) *Organik Zeytin Yetiştiriciliğinde Zeytin Sineği (Bactrocera oleae Gmel.) ile Mücadelede Tuzaklama Yöntemlerinin Karşılaştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, 69s.
- Zohary, D. ve Hopf, M. (2000) *Domestication of Plants in the Old World: the Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe and the Nile Valley*, Oxford University Press, New York, 316s.
- Zouros, E., Tsakas, S. ve Krimbas, C.B. (1968) The genetics of *Dacus oleae*. II. The genetics of two adult esterases. *Genet Res* 12: 249–258.
- Zouros, E. ve Krimbas, C.B. (1969) The genetics of *Dacus oleae*. III. Amount of variation at two esterase loci in a Greek population, *Genet Res*, 14: 249–258.
- Zygouridis, N.E., Augustinos, A.A., Zalom, F.G. ve Mathiopoulos, K.D. (2009) Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers, *Heredity*, 102: 402-412.

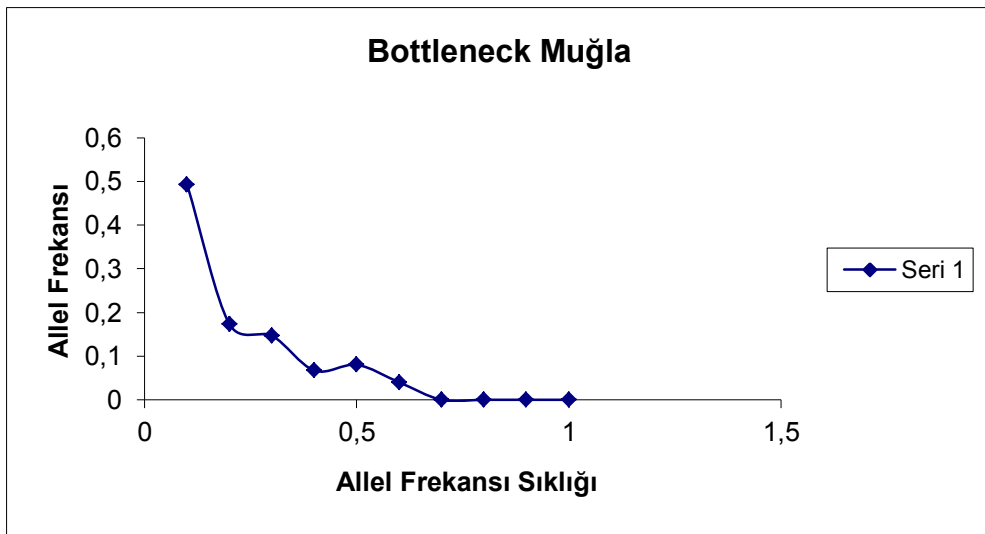
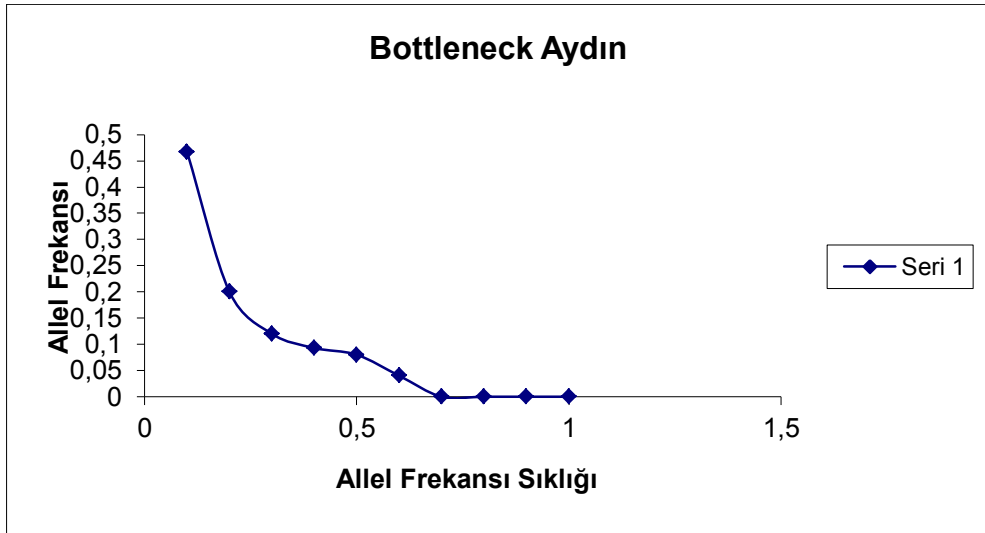
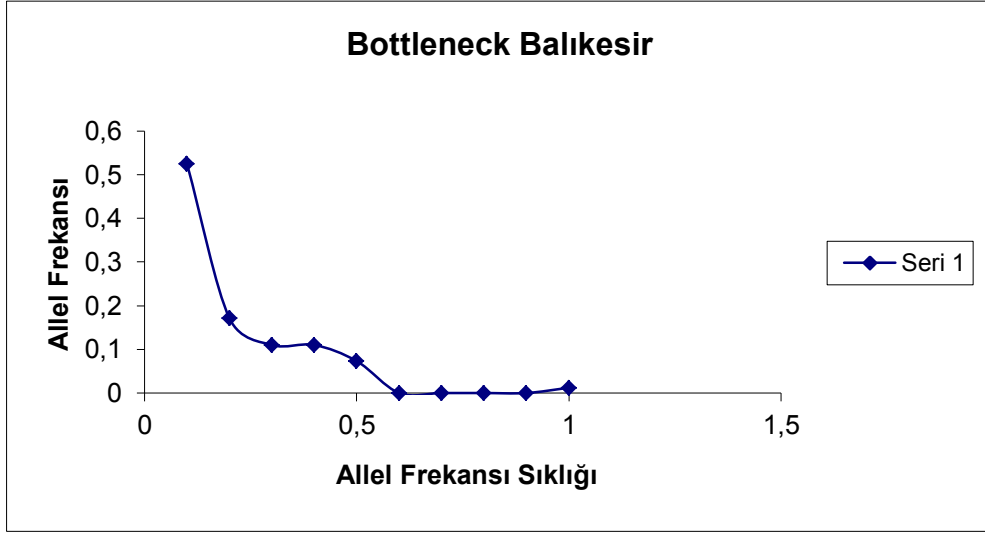
EKLER

Ek A. On iki popülasyona ilişkin bottleneck grafikleri









ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Ersin DOĞAÇ
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: Köyceğiz 13/04/1981
Medeni Hali : Evli
Telefon : 0 505 295 2370
E-posta : ersindogac@hotmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Muğla Turgut Reis Lisesi	1995-1999
Lisans	Ege Ünivesitesi	2000-2005
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2005-2008
Doktora	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2008-2013

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2006-	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil(ler)

İngilizce (ÜDS puanı 67.25)

Bilimsel Faaliyetler

1. Yayınlar (Sci Kapsamında Taranan Dergilerde)

DOGAC E, **KANDEMİR İ**, **TASKİN V** (2013) The Genetic Polymorphisms and Colonization Process of Olive Fly Populations in Turkey, PLoS ONE, 8(2): e56067. doi:10.1371/journal.pone.0056067.

BELGİN GOCMEN TAŞKIN, **NİLDEN VARDARELİ**, **ERSİN DOĞAÇ**, **RAMAZAN MAMMADOV**, **VATAN TAŞKIN** (2012) Genetic diversity of natural *Cyclamen alpinum* populations, Turk J Biol, 36: 413-422.

BAŞKURT, S., **DOĞAÇ, E.**, TAŞKIN, V. VE TAŞKIN, B.G. (2011) Frequencies Of Organophosphate Resistance-Associated Mutations In The Acetylcholinesterase Gene Of Field Collected Olive Fly (*Bactrocera oleae*) Populations Under Different Insecticide Regimes, *Acta Bot Hung*, 62(1): 22-33.

BAŞKURT, S., TAŞKIN, B.G., **DOĞAÇ, E.** VE TAŞKIN, V. (2011) Polymorphism in the acetylcholinesterase gene of *Musca domestica* L. field populations in Turkey, *Journal of Vector Ecology*, 36 (2): 248-257.

TAŞKIN, V., BAŞKURT, S., **DOĞAÇ, E.** VE TAŞKIN, B.G. (2011) Frequencies of pyrethroid resistance-associated mutations of *Vssc1* and *CYP6D1* in field populations of *Musca domestica* L. in Turkey, *Journal of Vector Ecology*, 36 (2): 239-247.

2. Bilimsel Toplantılar (Konferans, Panel, Sempozyum, Kongre, Seminer)

B. GÖÇMEN, **E. DOĞAÇ**, V. TAŞKIN, K. KÜÇÜKAKYÜZ. Kunduru-1149 X Cham-1 Melezi makarnalık Buğday (*Triticum durum*) Hatlarının Bor Toksisitesine Toleransları Bakımından Taranmalarında Bazı Kalitatif ve Kantitatif Yöntemlerin Karşılaştırılması. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Aydın, 26-30 Haziran 2006. (Sözlü Sunum). (C9) 2006.

E. ÖZTÜRK, K. KÜÇÜKAKYÜZ, **E. DOĞAÇ**, V. TAŞKIN, B. ÇÖL, B. GÖÇMEN. Bor ve Alüminyum Stresi Altındaki Buğdaylarda (*Triticum aestivum* L) Esteraz Enzim Aktivitesi ve Bant Desenlerindeki Değişimler. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi 23 / 27 Haziran 2008 Karadeniz Teknik Üniversitesi. (C13) (Sözlü Sunum) 2008.

E. DOĞAÇ, V. TASKIN, E. OZTURK, K. KUCUKAKYUZ, O. VAROL, T. ARSLAN, B. GOCMEN. RAPD Polymorphism in Relict Endemic *Liquidambar orientalis* Mill. Var. *orientalis* and *L. orientalis* Mill. Var. *Integriloba fiori* Populations in Turkey. XX. Dünya Genetik Kongresi, Berlin, Almanya, 12-17 Temmuz 2008. (Poster Sunum). (C14) 2008.

E. OZTURK, V. TASKIN, **E. DOĞAÇ**, K. KUCUKAKYUZ, O. VAROL, T. ARSLAN B. GOCMEN. Isozyme Polymorphism In Relict Endemic *Liquidambar orientalis* Mill. Var. *orientalis* and *L. orientalis* Mill. Var. *Integriloba fiori* Populations in Turkey. XX. Dünya Genetik Kongresi, Berlin, Almanya, 12-17 Temmuz 2008. (Poster Sunum). (C15) 2008.

V. TAŞKIN, E. ÖZTÜRK, **E. DOĞAÇ**, B. GÖÇMEN. Isozyme Polymorphism in House Fly (*Musca domestica* L.) Populations Collected From Aegean and Mediterranean Coasts of Turkey. XX. Dünya Genetik Kongresi, Berlin, Almanya, 12-17 Temmuz 2008. (Poster Sunum). (C18) 2008.

E. DOĞAÇ, V. TASKIN, E. OZTURK, K. KUCUKAKYUZ, O. VAROL, T.ARSLAN, B. GOCMEN. Population Genetic Diversity of Relict Endemic *Liquidambar orientalis* Based on RAPD Analysis. II. Avrupa Bitki Koruma Kongresi, Prag, Çek Cumhuriyeti, 1-5 Eylül 2009. (Poster Sunum). 2009.

Belgin Göçmen TAŞKIN, Eaylettin ÖZTÜRK, **Ersin DOĞAÇ**, Ömer VAROL, Köksal KÜÇÜKAKYÜZ, Tulin ARSLAN and Vatan TAŞKIN. Esterase And Acid Phosphatase Polymorphisms In Relict Endemic *Liquidambar Orientalis* Mill. Var. *Orientalis* And *L. Orientalis* Mill. Var. *Integriloba* Fiori Populations In Turkey International Symposium On Biology Of Rare And Endemic Plant Species 26-29 Mayıs Fethiye, Turkey. (Sözlü Sunum) 2010.

Belgin GÖÇMEN TAŞKIN, Nilden VARDARELI, **Ersin DOĞAÇ**, Ramazan MAMMADOV, Vatan TAŞKIN. Genetic Diversity of Natural *Cyclamen alpinum* Populations From Different Altitudes Based on RAPD Analysis, International Symposium on Biology of Rare and Endemic Plant Species. 26-29 Mayıs Fethiye, Turkey. (Poster Sunum) 2010.

Sevan AGDAMAR, Ali Serhan TARKAN, Nildeniz TOP, Emre KESKİN, **Ersin DOĞAÇ**. The role of environmental factors and genetic differentiation on colonization success of a non-native fish, *Lepomis gibbosus* in Turkey. The First International Fisheries Symposium in Cyprus (Poster Sunumu) 2012.

3. Araştırma Projeleri

Türkiye'deki relict endemik sığla ağacı (*Liquidambar orientalis* mill. var. *orientalis* ve *L. orientalis* mill. var. *integriloba* fiori) populasyonlarında genetik çeşitliliğin İzoenzimler ve RAPD (rastgele üretilen polimorfik DNA) belirteçleri yardımıyla Saptanması. (Bursiyer) **Destekleyen Kuruluş: TÜBİTAK-Kariyer Projesi-Sonuç Raporu Kabul Edildi.**

Marmara, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nden Örneklenen Zeytin sineği (*Bactrocera oleae*) Populasyonlarının Mikrosatellit ve Mitokondriyal DNA Belirteçleri Yardımı ile Genetik Karakterizasyonu ve Bu Populasyonlarda *Ace* Genindeki Organofosfat İnsektisit Direnç Mutasyon Frekanslarının Belirlenmesi (Yardımcı Araştırmacı-Bursiyer) **Destekleyen Kuruluş: TÜBİTAK-TBAG-110T190-Sonuç Raporu Yazıldı.**

Ege ve Marmara Bölgelerinin Bazı Lokasyonlarından Örneklenen Zeytin sineği (*Bactrocera oleae*) Populasyonlarındaki Genetik Çeşitliliğin Mikrosatellit Belirteçleri Yardımı ile Saptanması (Yardımcı Araştırmacı) **Destekleyen Kuruluş: Muğla Üniversitesi BAP No: 10/026- Sonuç Raporu Yazıldı.**

Ege Bölgesi'nde Örneklenen Culex Pipiens Kompleksi Sivrisinek Populasyonlarının Değişik Grup İsektisitlere Karşı Direnç Seviyelerinin ve Bu Populasyonlardaki Ace-1 Phe290Val Mutasyonunun Saptanması (Yardımcı Araştırmacı) **Destekleyen Kuruluş: Muğla Üniversitesi BAP No: 11/32 - Devam Ediyor.**

Ege ve Marmara Bölgelerinin Bazı Lokasyonlarından Örneklenen Zeytin Sineği (Bactrocera oleae) Populasyonlarındaki Genetik Çeşitliliğin Mitokondriyal DNA (mtDNA) Belirteçleri Yardımı İle Saptanması ve Bu Populasyonlarda Ace Genindeki Organofosfat İsektisit Direnç Mutasyon Frekanslarının Belirlenmesi (Yardımcı Araştırmacı) **Destekleyen Kuruluş: Muğla Üniversitesi BAP No: 12/046- Devam Ediyor.**