

**TÜRKİYE'DEKİ BAZI *DROSOPHILA MELANOGASTER*  
DOĞAL POPULASYONLARININ MALATHIONA KARŞI  
DİRENÇ DÜZEYLERİNİN, ESTERAZ ENZİM  
AKTİVİTELERİNİN VE ALLOZİMLERİNİN BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF THE LEVELS OF RESISTANCE  
AGAINST MALATHION, ESTERASE ACTIVITIES AND  
ALLOZYMES IN SOME WILD TYPE *DROSOPHILA*  
*MELANOGASTER* STRAINS OF TURKEY**

**BURCU KOÇAK MEMMİ**  
A0146384

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
BİYOLOJİ Anabilim Dalı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak hazırlanmıştır.

2009

# TÜRKİYE'DEKİ BAZI *Drosophila melanogaster* DOĞAL POPULASYONLARININ MALATHIONA KARŞI DİRENÇ DÜZEYLERİNİN, ESTERAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN VE ALLOZİMLERİNİN BELİRLENMESİ

**Burcu Koçak Memmi**

## ÖZ

Bu çalışmada, ülkemizin çeşitli yörelerinden elde edilen *Drosophila melanogaster* doğal populasyonlarında (toplumlarında), organofosfatlı bir insektisit olan Malathion'a karşı direnç düzeyleri, asetilkolinesteraz ve genel esteraz (non-spesifik) enzim aktiviteleri ile esteraz polimorfizmi araştırılmıştır.

Antalya-Merkez, Antakya-Merkez, İzmir-Merkez, İzmir-Çandarlı, Hatay-Dörtyol, Hatay-Erzin, Eskişehir-Merkez, Kocaeli-Kerpe, Antalya-Serik ve Balıkesir-Ayvalık bölgelerinden elde edilen *D.melanogaster* populasyonlarında Malathion'un direnç düzeyleri (LC<sub>50</sub>) belirlenmiştir. Malathion'a en dirençli populasyon Antakya-Merkez, en duyarlı populasyon Antalya-Serik olarak belirlenmiş, diğer populasyonlar en dirençliden en duyarlıya doğru "Hatay -Dörtyol, İzmir-Çandarlı, Hatay-Erzin, Kocaeli-Kerpe, Balıkesir-Ayvalık, İzmir-Merkez, Eskişehir-Merkez, Antalya-Merkez" olarak saptanmıştır.

Doğal populasyonlarda esteraz allozimleri nişasta jel elektroforezi kullanılarak araştırılmış ve esteraz (Est 6) polimorfizmine rastlanmıştır. Esteraz enziminin *hızlı* (*fast*) ve *yavaş* (*slow*) alellerinin frekansları belirlenmiştir. *Hızlı* aleli en sık Antalya-Merkez, Balıkesir-Ayvalık, İzmir-Çandarlı, Hatay-Erzin, Eskişehir-Merkez, Kocaeli-Kerpe, Antalya-Serik ve Antakya-Merkez populasyonlarında, *yavaş* aleli ise en sık İzmir-Merkez populasyonunda görülmektedir. Hatay-Dörtyol populasyonunda *hızlı* ve *yavaş* alellerinin frekansı birbirine eşit olarak bulunmuştur.

*D.melanogaster* populasyonlarının genel esteraz ve asetilkolinesteraz enzimlerinin aktiviteleri ölçülmüştür. Populasyonlarda genel esteraz aktivitesi ile organofosfat direnci arasında pozitif bağlantı belirlenememiştir. Antakya-Merkez, Kocaeli-Kerpe ve İzmir-Merkez populasyonlarında asetilkolinesteraza bağlı insektisit direnci olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, *D.melanogaster* doğal populasyonlarında, Malathion direncinin, genel esteraz enzimleri ile değil, asetilkolinesteraz enzimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** *Drosophila*, Malathion, insektisit, direnç, esteraz, asetilkolinesteraz, aktivite, elektroforez, polimorfizm.

**Danışman:** Prof.Dr. Hacer ÜNLÜ, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı

**Eş Danışman:** Doç.Dr. Meral KENCE, ODTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

# DETERMINATION OF THE LEVELS OF RESISTANCE AGAINST MALATHION, ESTERASE ACTIVITIES AND ALLOZYMES IN SOME WILD TYPE *Drosophila melanogaster* STRAINS OF TURKEY

Burcu Koçak Memmi

## ABSTRACT

In this thesis, acetylcholinesterase and general esterases (non-specific) enzyme activities, polymorphism and resistance levels against Malathion were investigated in some *Drosophila melanogaster* natural populations obtained from various locations.

Resistance levels to Malathion were determined in *D.melanogaster* populations sampled from Antalya-Centre, Antakya-Centre, İzmir-Centre, İzmir-Çandarlı, Hatay-Dörtyol, Hatay-Erzin, Eskişehir-Centre, Kocaeli-Kerpe, Antalya-Serik and Balıkesir-Ayvalık locations. The most resistant population to Malathion was determined as that of Antakya-Centre and the most sensitive population was determined as Antalya-Serik. Other populations were determined from most resistant to most sensitive as: Hatay-Dörtyol, İzmir-Candarlı, Hatay-Erzin, Kocaeli-Kerpe, Balıkesir-Ayvalık, İzmir-Centre, Eskişehir-Centre and Antalya-Centre.

In natural populations, esterase (Est 6) allozymes were investigated using starch gel electrophoresis and esterase polymorphisms were observed in all natural populations. *Fast* and *slow* allele frequencies of esterase enzyme were determined. *Fast* allele was mostly seen in Antalya-Centre, Balıkesir-Ayvalık, İzmir-Çandarlı, Hatay-Erzin, Eskişehir-Centre, Kocaeli-Kerpe, Antalya-Serik and Antakya-Centre populations. *Slow* allele was mostly seen in İzmir-Centre population. In Hatay-Dörtyol population, *fast* and *slow* allele frequencies were equal.

General esterase and acetylcholinesterase activities were measured in *D.melanogaster* populations. Positive correlation was not seen between organophosphate resistance and general esterase activity but resistance was determined in Antakya-Centre, Kocaeli-Kerpe and İzmir-Centre populations related to acetylcholinesterase.

As a conclusion, it was determined that Malathion resistance was related with acetylcholinesterase enzyme but not with general esterase enzymes in *D.melanogaster* natural populations.

**Keywords:** *Drosophila*, Malathion, insecticide, resistance, esterase, acetylcholinesterase, activity, electrophoresis, polymorphism.

**Advisor:** Prof.Dr. Hacer ÜNLÜ, Hacettepe University, Department of Biology, General Biology Section

**Co-advisor:** Doç.Dr.Meral KENCE, METU, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biological Sciences

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasında, yürütülmesinde ve hazırlanmasında değerli katkılarından dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Hacer ÜNLÜ'ye ve eş-danışmanım Doç. Dr. Meral KENCE'ye teşekkür ederim. Bu çalışmayı kapsayan deneylerin bir bölümü Avrupa Birliği Programlarından biri olan Sokrates-Erasmus programı çerçevesinde Hollanda'da Groningen Üniversitesi, Evrimsel Genetik Bölümü, Populasyon Genetiği Birimi'nde gerçekleştirilmiştir. Birimin grup lideri olan hocam Prof.Dr. Kuke Bijlsma'ya çok teşekkür ederim. Kendisi, paylaştığı pek çok fikir ve sağladığı değerli fırsatlarla teze pek çok katkı sağlamıştır. Aynı birimde çalışmakta olan ve moleküler biyoloji konusunda tanıdığı olanaklar sayesinde, tez dışındaki çalışmalarına da katkıda bulunan Dr.Louis van de ZANDE'ye, elektroforez laboratuvarında laboratuvar hazırlıklarında yol gösterici yardımlarını gördüğüm Andie RUMAHLOINE'e, ayrıca laboratuvar teknisyenleri Laurence HOEKZEMA ve Anneke BOEREMA'ya katkıları dolayısıyla teşekkür ediyorum.

Bu tezin deney ve yazım aşamalarında, önerileriyle desteğini esirgemeyen Prof.Dr. A. Nihat BOZCUK ve Prof.Dr. Aykut KENCE'ye, istatistiksel değerlendirmelere yardımcı olan Doç.Dr. Ergi Deniz ÖZSOY'a, direnç testlerinin hazırlanmasında ve yapılmasında yardımcı olan sevgili babam Dr. Oner KOÇAK'a, enzim aktivitelerinin yapılması için ekoloji laboratuvarında çalışmama olanak veren Doç.Dr. Selim Süalp ÇAĞLAR'a ve bu laboratuvarda yardımlarını gördüğüm Arş.Gör.M. Mustafa AKINER'e, istatistik programlarının kullanımında yardımcı olan Dr. Hakan GÜR'e ve Dr. Mutlu Kart GÜR'e, Arş.Gör.Banu Şebnem ÖNDER'e, Arş.Gör.Emel ATLI'ya ve tez yazımı sırasında hoşgörülü yaklaşımlarından dolayı eşim Koray MEMMİ'ye çok teşekkür ediyorum.

Doktora öğrenciliğim süresince beni Yurt İçi Doktora Bursu ile desteklemiş olan TÜBİTAK'a ve ayrıca T104396 no'lu proje kapsamında tezimi desteklemelerinden dolayı çok teşekkür ediyorum. Bunun yanında, bu tezin Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi kapsamında desteklenmiş olduğunu burada anmak ve teşekkür etmek isterim.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	vi
SİMGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İnsektisit Direnci.....	4
2.2. İnsektisit Tipleri.....	5
2.3. Direnç Tipleri.....	6
2.3.1. Vigor Tolerans.....	6
2.3.2. Davranışsal Direnç.....	6
2.3.3. Fizyolojik (Metabolik) Direnç .....	6
2.4. Organofosfatlar.....	9
2.4.1. Malathion .....	10
2.5. Genel Esteraz ve Asetilkolinesteraz Enzimlerine Bağlı İnsektisit Direnci .....	11
2.5.1. Esterazların Sınıflandırılması.....	13
2.5.1.1. Asetil esterazlar.....	13
2.5.1.2. Aril esterazlar.....	13
2.5.1.3. Karboksil esterazlar.....	13
2.5.1.4. Kolinesterazlar.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. <i>Drosophila</i> Besiyerinin Hazırlanması.....	16
3.2. Bayıltma Yöntemi.....	17
3.3. <i>Drosophila</i> Doğal Populasyonlarının Elde Edilmesi.....	17
3.4. <i>D.melanogaster</i> Populasyonlarında Malathion'a Karşı Direncin Ölçülmesi.....	19

3.4.1. <i>D.melanogaster</i> 'de Direnç Ölçme Yönteminin Belirlenmesi.....	19
3.4.2. <i>D.melanogaster</i> Populasyonlarında Malathion Direnç Testleri.....	21
3.4.2.1. Çevre Koşulları.....	21
3.4.2.2. Malathion'un LC <sub>50</sub> Düzeylerinin Saptanması.....	22
3.4.3. <i>D.melanogaster</i> Populasyonlarında Esteraz Allozimlerinin Araştırılması .....	23
3.4.3.1. Top Agar Nişasta Jelinin Hazırlanması.....	23
3.4.3.2. Esteraz Lokusunun Değerlendirilmesi.....	25
3.4.3.3. Seçilim Deneyleri.....	26
3.4.4. Doğal Populasyonlarda Direncin Biyokimyasal Olarak Ölçülmesi.....	26
3.4.4.1. Genel Esteraz (non-spesifik) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	27
3.4.4.2. Bireysel Protein Miktarının Belirlenmesi.....	28
3.4.4.3. Asetilkolinesteraz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	28
3.5. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	29
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>30</b>
4.1. <i>D.melanogaster</i> 'in Malathion Direnç Testleri (LC <sub>50</sub> ) Bulguları.....	30
4.2. Esteraz Populasyon Genetiği Bulguları.....	33
4.2.1. Populasyonların Genotipleme Sonuçları.....	33
4.2.2. Doğal Populasyonlarda Esteraz Lokusunun Alel Sıklıkları.....	34
4.2.3. Populasyon Çiftleri Arasındaki Genetik Uzaklıklar (F <sub>ST</sub> Değerleri) .....	37
4.2.4. Doğal Populasyonlarda Hardy-Weinberg Dengesinin Belirlenmesi .....	38
4.3. Seçilim Deneylerinin Bulguları.....	39
4.3.1. Seçilimi Yapılmış Populasyonlarda Direnç Düzeyleri.....	40
4.3.2. Seçilimi Yapılmış Populasyonlarda Genotipleme Sonuçları.....	41



4.3.3. Seçilimi Yapılmış Populasyonlarda Esteraz Lokusu Alel Sıklıkları.....	43
4.3.4. Seçilimi Yapılmış Populasyon Çiftleri Arasında Genetik Uzaklıklar ( $F_{ST}$ Değerleri).....	45
4.3.5. Seçilimi Yapılmış Populasyonlarda Hardy Weinberg Dengesi.....	47
4.4. Biyokimyasal Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular.....	47
4.4.1. Genel Esteraz Enzim Aktivitesinin (Non-spesifik) Sonuçları.....	48
4.4.2. Asetilkolinesteraz Aktivitesi Sonuçları.....	52
4.5. Mantel Testi Değerlendirme Sonuçları.....	54
4.5.1. Populasyonlar Arası Genetik Uzaklıklar ile Coğrafi Konumlarının Korelasyonu.....	54
4.5.2. Populasyonların Direnç Düzeyleri ( $LC_{50}$ ) ile Coğrafi Konumlarının Korelasyonu.....	57
4.5.3. Seçilimi Yapılmış ve Seçilimi Yapılmamış Populasyonların Direnç Düzeylerinin Korelasyonu.....	60
4.5.4. Genel Esteraz Enzim Aktivitesi Sonuçları ile Direnç Düzeylerinin Korelasyonu.....	63
4.5.5. Seçilimi Yapılmış ve Yapılmamış Populasyonların Genetik Uzaklık ( $F_{ST}$ ) Değerlerinin Korelasyonu.....	67
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>69</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>82</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>97</b>

## SİMGELER DİZİNİ

AChE	Asetilkolinesteraz
Est	Esteraz
F <sub>ST</sub>	Standardize gen frekansı varyasyonu
<i>kdr</i>	Knock-down direnci
LC <sub>50</sub>	Populasyonun %50'sini öldüren konsantrasyon
µg	Mikrogram
RH	Bağıl Nem
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Şekil 2.1.</b> Malathion'un açık formülü.....	11
<b>Şekil 3.1.</b> Türkiye haritasında <i>D.melanogaster</i> 'in elde edildiği bölgeler.....	18
<b>Şekil 3.2.</b> Elektroforez sonucunda Hatay-Dört Yol populasyonunda izlenen bantlar..	24
<b>Şekil 3.3.</b> Enzim aktivitesinin belirlenmesi çalışmaları.....	27
<b>Şekil 4.1.</b> <i>D.melanogaster</i> populasyonlarının dişi bireylerinin Malathion direnç düzeyleri (LC <sub>50</sub> ).....	32
<b>Şekil 4.2.</b> Populasyonların erkek bireylerinin Malathion direnç düzeyleri (LC <sub>50</sub> ) .....	32
<b>Şekil 4.3.</b> <i>D.melanogaster</i> doğal populasyonların dişi ve erkek bireylerinin Malathion direnç düzeyleri (LC <sub>50</sub> ).....	33
<b>Şekil 4.4.</b> Populasyonların alfa naftil asetat substratına göre enzim aktivitesi (nmol alfa naphthol/min/mg).....	49
<b>Şekil 4.5.</b> Populasyonların beta naftil asetat substratına göre enzim aktivitesi (nmol beta naphthol/min/mg).....	51
<b>Şekil 4.6.</b> F <sub>ST</sub> ve coğrafi uzaklık matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafik...56	56
<b>Şekil 4.7.</b> F <sub>ST</sub> ve coğrafi uzaklık arasında yapılan Mantel Testinin temel alınan korelasyon katsayıları.....	56
<b>Şekil 4.8.</b> Dişi bireylerin Malathion direnç düzeyleri ve coğrafi uzaklık matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafik.....	58
<b>Şekil 4.9.</b> Dişi bireylerin Malathion direnç düzeyleri ve coğrafi uzaklık matrisleri arasında yapılan Mantel testinin temel alınan korelasyon katsayıları .....	58
<b>Şekil 4.10.</b> Erkek bireylerin Malathion direnç düzeyleri ve coğrafi uzaklık matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafik.....	59
<b>Şekil 4.11.</b> Erkek bireylerin Malathion direnç düzeyleri ve coğrafi uzaklık matrisleri arasında yapılan Mantel testinin temel alınan korelasyon katsayıları.....	59
<b>Şekil 4.12.</b> Seçilimi yapılmış ve seçilimi yapılmamış <i>Drosophila melanogaster</i> populasyonlarının dişi bireylerinin LC <sub>50</sub> direnç düzeylerinin matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafik. ....	61

<b>Şekil 4.13.</b> Seçilimi yapılmış ve seçilimi yapılmamış <i>Drosophila melanogaster</i> popülasyonlarının dişi bireylerinin LC <sub>50</sub> direnç düzeylerinin Mantel testine temel alınan korelasyon katsayıları.....	61
<b>Şekil 4.14.</b> Seçilimi yapılmış ve yapılmamış <i>Drosophila melanogaster</i> popülasyonlarının erkek bireylerinin LC <sub>50</sub> direnç düzeyleri matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafik.....	62
<b>Şekil 4.15.</b> Seçilimi yapılmış ve seçilimi yapılmamış <i>Drosophila melanogaster</i> popülasyonlarının erkek bireylerinin LC <sub>50</sub> direnç düzeylerinin Mantel testine temel alınan korelasyon katsayıları.....	63
<b>Şekil 4.16.</b> Erkek bireylerde Malathion direnç düzeyleri ile genel esteraz (alfa naftol) enzim aktivitesi matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafik.....	64
<b>Şekil 4.17.</b> Erkek bireylerde Malathion direnç düzeyleri ile genel esteraz (alfa naftol) enzim aktivitesi matrislerinin Mantel testine temel alınan korelasyon katsayıları.....	65
<b>Şekil 4.18.</b> Erkek bireylerde Malathion direnç düzeyleri ile genel esteraz (beta naftol) enzim aktivitesi matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafik.....	66
<b>Şekil 4.19.</b> Erkek bireylerde Malathion direnç düzeyleri ile genel esteraz (beta naftol) enzim aktivitesi matrislerinin Mantel testine temel alınan korelasyon katsayıları.....	66
<b>Şekil 4.20.</b> Seçilimi yapılmış ve seçilimi yapılmamış olan popülasyonların genetik uzaklık ( $F_{ST}$ ) değerleri matrislerinin Mantel testi sonuçları.....	68
<b>Şekil 4.21.</b> Seçilimi yapılmış ve seçilimi yapılmamış olan popülasyonların genetik uzaklık ( $F_{ST}$ ) değerleri matrislerinin Mantel testi grafiği.....	68

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Çizelge 2.1.</b> <i>Drosophila</i> 'da belirlenen esterazlar ve allozimleri.....	14
<b>Çizelge 3.1.</b> <i>Drosophila melanogaster</i> doğal populasyonlarının toplandığı bölgelerin enlem ve boylam değerleri .....	18
<b>Çizelge 3.2.</b> <i>Drosophila melanogaster</i> populasyonlarının toplandığı bölgelerde ergin ve larvada kullanılan insektisitler.....	19
<b>Çizelge 4.1.</b> Populasyonların dişi ve erkek bireylerinin LC <sub>50</sub> direnç düzeyleri.....	31
<b>Çizelge 4.2.</b> <i>Drosophila melanogaster</i> doğal populasyonlarının elektroforez ile belirlenen genotipleme sonuçları ve incelenen toplam birey sayıları .....	34
<b>Çizelge 4.3.</b> Doğal populasyonlarda Est 6 enziminin alel sıklıkları ve eşeyler arası karşılaştırma.....	36
<b>Çizelge 4.4.</b> Populasyonların sıklıklarının çiftler halinde karşılaştırılması ve populasyonlar arası uzaklıklar (F <sub>ST</sub> Değerleri).....	37
<b>Çizelge 4.5.</b> Populasyonların F <sub>ST</sub> değerlerinin ikili karşılaştırıldığında elde edilen P değerleri.....	38
<b>Çizelge 4.6.</b> Populasyonlar için belirlenen genotipleme sonuçları, alel sıklıkları ve Hardy-Weinberg testi sonuçları.....	39
<b>Çizelge 4.7.</b> Seçilim süresince uygulanan Malathion dozları .....	40
<b>Çizelge 4.8.</b> Seçilim sonucunda populasyonlarda ölçülen LC <sub>50</sub> direnç düzeyleri.....	41
<b>Çizelge 4.9.</b> Seçilimi yapılmış <i>Drosophila melanogaster</i> doğal populasyonların genotipleme sonuçları.....	42
<b>Çizelge 4.10.</b> Seçilimi yapılmış <i>Drosophila melanogaster</i> doğal populasyonların alel sıklıkları.....	44
<b>Çizelge 4.11.</b> Dirençli olarak seçilmiş populasyonların sıklıklarının çiftler halinde karşılaştırılması ve populasyonlar arası genetik uzaklıklar (F <sub>ST</sub> Değerleri).....	45
<b>Çizelge 4.12.</b> Seçilimi yapılan populasyonların F <sub>ST</sub> değerlerinin ikili olarak karşılaştırıldığında elde edilen P değerleri.....	46
<b>Çizelge 4.13.</b> Seçilimi yapılmış olan populasyonların genotipleme sonuçları, alel sıklıkları ve Hardy-Weinberg testi sonuçları.....	47
<b>Çizelge 4.14.</b> Populasyonların ortalama alfa naftol miktarları ve duyarlı stok ile karşılaştırılmasının istatistiksel anlam kontrolü.....	48

<b>Çizelge 4.15.</b> Populasyonların alfa naftol ürün miktarlarına (nmol alfa naphthol/min/mg) göre birbirleriyle ikili olarak karşılaştırılması .....	50
<b>Çizelge 4.16.</b> Populasyonların ortalama beta naftol miktarları ve duyarlı stok ile karşılaştırılmaları.....	50
<b>Çizelge 4.17.</b> Populasyonların beta naftol ürün miktarlarına (nmol beta naphthol/min/mg) göre birbirleriyle ikili olarak karşılaştırılması .....	52
<b>Çizelge 4.18.</b> Populasyonların ortalama inhibisyon kinetiği değerleri ve duyarlı stok ile karşılaştırılmaları.....	53
<b>Çizelge 4.19.</b> Populasyonların inhibisyon kinetiği düzeyleri yönünden birbirleriyle ikili olarak karşılaştırılması.....	54
<b>Çizelge 4.20.</b> Populasyonların coğrafi uzaklıklarının (enlem ve boylam) matrisi.....	55
<b>Çizelge 4.21.</b> <i>Drosophila melanogaster</i> populasyonlarının erkek bireylerinin LC <sub>50</sub> direnç düzeylerinin matrisi.....	57
<b>Çizelge 4.22.</b> <i>Drosophila melanogaster</i> populasyonlarının dişi bireylerinin LC <sub>50</sub> direnç düzeylerinin matrisi.....	57
<b>Çizelge 4.23.</b> Seçilimi yapılmış <i>Drosophila melanogaster</i> populasyonlarının dişi bireylerinin LC <sub>50</sub> direnç düzeylerinin matrisi.....	60
<b>Çizelge 4.24.</b> Seçilmiş populasyonların erkek bireylerinde LC <sub>50</sub> direnç düzeylerinin matrisi.....	62
<b>Çizelge 4.25.</b> Genel esteraz enzim aktivitesi değerlerinin matrisi (alfa naftol).....	64
<b>Çizelge 4.26.</b> Genel esteraz enzim Aktivitesi değerlerinin matrisi (beta naftol).....	65
<b>Çizelge 4.27.</b> Seçilimi yapılmamış populasyonlarda Arlequin 3.1 ile bulunan F <sub>ST</sub> değerleri.....	67
<b>Çizelge 4.28.</b> Dirençli olarak seçilmiş populasyonların frekanslarının çiftler halinde karşılaştırılması ve populasyonlar arası genetik uzaklıklar.....	67

## 1. GİRİŞ

Sürekli ve yoğun insektisit kullanımı çevre kirlenmesi, doğal dengenin bozulması ve canlılarda direnç oluşumu gibi pek çok sorunu da beraberinde getirmektedir.

Zararlı organizmalara karşı kimyasal madde kullanımı milattan öncesine dayanmaktadır. Örneğin, Çin'de 900'lü yıllarda bağ ve bahçelerde arsenik, Yunanistan'da 3000 yıl önce sülfür kullanıldığı bilinmektedir. Önemli bir dönüm noktası olan DDT'nin pestisit etkisinin keşfedilmesinden sonra sentetik pestisitler üreilmeye başlanmış ve günümüze kadar organoklorlu, organofosforlu, karbamatlı ve piretroid grubu insektisitler kullanılmıştır (Casida and Quistad, 1998).

Insektisitlerin yaygın olarak kullanılması hedef canlıların bu insektisitlere direnç kazanmalarına neden olmuştur. Bu nedenle, zararlılarla mücadelede kimyasal maddelerin kullanımının yanı sıra, fiziksel, biyolojik ve kültürel gibi entegre mücadele yöntemleri de kullanılmaktadır (Koçak, 2000). Zararlılarda insektisitlere karşı direncin ekolojik genetiğinin çalışılabilmesi için, dirence neden olan genlerin belirlenmesi ve direncin metabolizmasının araştırılması gerekmektedir (Çakır ve Yamanel, 2005).

Eklembacaklıların insektisitlere karşı direnci ile ilgili ilk bilimsel sonuç 1914 yılında Melander tarafından kabuklu bit *Quadraspidiotus perniciosus*'da kükürt uygulaması ile elde edilmiştir (Forgash, 1984). Bundan sonraki yıllarda çok sayıda artropod türü insektisitlere karşı dirençli hale gelmiştir. 1946'da DDT kullanımının başlamasından sonra her yıl çeşitli eklembacaklı türleri insektisitlere direnç kazanmıştır. Örneğin, 1947 yılında, İtalya'da *Musca domestica* ve *Culex molestus*'da, Yunanistan'da *Anopheles sacharovi*'de DDT direnci belirlenmiştir (Brown and Pal, 1971).

Organoklorlu hidrokarbonluların çevreye karşı olumsuz etkileri nedeniyle yasaklanmasının ardından organofosforlu, karbamatlı ve sentetik piretroidli

insektisitler kullanılmaya başlanmıştır. Buna paralel olarak canlılarda insektisitlere karşı direnç oluşmaya devam etmiştir (Forgash, 1984). Günümüzde 500'den fazla tür en az bir insektisite karşı dirençli hale gelmiş durumdadır (Plapp, 1984; www.pesticideresistance.org).

İnsektisit uygulamaları sonucunda hedef canlılar arasında olmayan birçok organizmada da direnç geliştiği bilinmektedir. *Drosophila melanogaster* de bu uygulamalardan dolayı yollardan etkilenen ve direnç gösteren canlılar arasındadır (Parsons, 1973; Willoughby et al., 2006).

Canlılarda direnç kazanma ile ilgili olarak gösterilen enzimler genel esteraz, glutasyon S-transferaz, sitokrom P450 ve asetilkolinesteraz enzimleridir. Genel esteraz ve asetilkolinesteraz enzimleri ile yapılan pek çok araştırmada enzim aktiviteleri belirlenerek, dirençlilik ile aktivite arasındaki ilişki araştırılmıştır (Khoo et al., 1992; Lüleyap ve Kasap, 2000; Montgana et al., 2003; He et al., 2004; Uğurlu ve Gürkan, 2007). *Drosophila* doğal populasyonlarında, asetilkolinesteraz (AChE) geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu üç amino asitin yerdeğişimi (fenilalanin'in serin'e, isolösin'in valin'e, glisin'in alanin'e) ile dirençli AChE oluşumu bildirilmiştir (Morton, 1993).

İnsektisit uygulamaları sonucunda, yapay olarak oluşan seçilim baskısından kaynaklanan esteraz alellerinin sıklık farklılıklarının araştırılması, hem hangi genlerin seçildiğini göstermesi bakımından, hem de evrimsel ekolojik ilişkiler bakımından önem taşımaktadır. Bu amaçla kullanılan elektroforetik yöntemler, populasyonların genetik modellerini test etmek için en sık kullanılan yöntemlerdir. Bu konuda *D.melanogaster* dahil pek çok canlıda yapılan çalışmalarda, esterazların farklı allozimleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Maruyama et al., 1984, Arnason and Chambers, 1987; Labate et al., 1989; Healy et al., 1991; Tavares et al., 1998; Nascimento and Bicudo, 2002; He et al., 2004).



*D.melanogaster*'in doğal populasyonlarında organofosfatlı insektisitlere karşı oluşan direncin yapısı, mutasyonlar, üremeye etki ve evrim yönünden halen tartışılmakta olan bir konudur (Bağrıaçık and Ünlü, 1991; Miyo et al., 2001; Miyo and Oguma, 2002). Literatürde birçok çalışmada, insektisit kullanımıyla yapay olarak baskılanan canlı populasyonlarında, direnci etkileyen genlerin seçilerek direncin evriminin ilerlediği söylenmektedir (Oakeshott et al., 1993; Morton, 1993; McKenzie and Batterham, 1998; Raymond et al., 1998; Weill et al., 2002; Ranson et al., 2002; Ffrench Constant et al., 2004).

Bu noktadan hareketle, araştırmamızda Türkiye'de değişik yörelerden toplanan bazı *Drosophila melanogaster* doğal populasyonlarında, organofosfatlı insektisitlerden Malathion'un yarattığı seçim baskısı sonucunda seçilmiş olabilecek esteraz allozimlerinin varlığı ve populasyondaki sıklıkları araştırılmış ve dirençli bireylerin seçilimi yapılarak allozim sıklıkları incelenmiştir. İsektisitlere direnç mekanizmalarının anlaşılması için *D.melanogaster* bireylerinin Malathion'a karşı direnç düzeyleri belirlenerek genel esteraz ve asetilkolinesteraz enzimlerinin aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle saptanmıştır. Populasyonların Hardy Weinberg dengeleri, genetik uzaklıkları ( $F_{ST}$  değerleri), coğrafi uzaklıkları belirlenmiş ve elde edilen tüm veriler istatistiksel olarak test edilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİ

Ülkemizde insektisitler yıllardan beri sürekli ve yoğun bir şekilde uygulanmaktadır. Bunun sonucunda çevre kirlenmesi, ekosistemde bozulmalar ve canlılarda direnç oluşumu gibi durumlar ortaya çıkmaktadır. Özellikle artropodların insektisitlere dayanıklı hale gelmeleri, insektisitlerin etkilerinin azalmasına neden olarak daha çok kullanımını doğurmakta ve bu kullanım da çevreyi olumsuz etkilemektedir. İsektisitlerin bilinçsiz ve yaygın olarak kullanılması böceklerin adaptasyon göstererek sonraki nesillerde daha dirençli bireylerin karşımıza çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle insektisit direncinin genetik yönünün incelenerek direncin mekanizmalarının anlaşılması oldukça önem taşımaktadır.

İsektisitler, canlı bünyesinde detoksifikasyona uğrayarak esterazlar tarafından parçalanmaya maruz kalan ester bileşikleridir. Canlılar bu insektisitlere maruz kaldıklarında direncin, Glutasyon S-Transferazlar (GSTs), karışık fonksiyonlu oksidazlar (MFO) ve esterazlar tarafından oluşturulduğu bildirilmektedir (Haupt et al., 1988; Hemingway et al., 2004; Flores et al., 2006; Wu et al., 2007).

Günümüzde kullanılan insektisitlerin başında sentetik piretroidler olduğu bilgisi belediyelerden alınmıştır. Bunun yanında, organofosfatlı bileşiklerin tarım alanlarında hububat zararlılarına karşı ve evlerde haşere mücadelesinde kullanıldığı belirtilmektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Birimi'nden elde edilen verilere göre, Malathion dahil olmak üzere organofosfatlı insektisitlerin üretimi ve kullanımını halen devam ettirmektedir.

### 2.1. İsektisit Direnci

İsektisitlere karşı direnç, bir canlı popülasyonundaki bireylerin çoğunluğu için öldürücü olan bir insektisit dozuna karşı, aynı popülasyonda bulunan bazı bireylerin dirençlilik göstermesi ve bu yeteneğin dölden dölle aktarılması olarak tanımlanabilir (Futuyma, 2008).

İnsektisit kullanımı dirençli bireylerin hayatta kalmasına sebep olarak onları seçilime uğratar ve sonuç olarak sonraki nesillerde daha dirençli bireylerin oluşturdukları popülasyonlar benzer uygulamalarda hayatta kalırlar (Miyo and Charlesworth, 2004). Hızlandırılmış evrim olarak da değerlendirilen insektisit direnci, popülasyonlardaki bireylerin, insektisit seçim baskısına karşı, sahip oldukları genler aracılığıyla verdikleri cevaplardır. Genel bir ifadeyle, evrimsel süreçler zinciri olan direnç, önceki insektisit uygulamaları sonucunda bitki ve hayvan popülasyonlarında oluşan cevap azalmasıdır. Bunun yanında direnç, bir popülasyonda oluşan rastgele mutasyonlarla az miktardaki bireyin kazandığı özellikler sonucunda normalde öldürücü dozlara karşı sağ kalmayı sağlayan öncü bir adaptasyon olarak da tanımlanabilir (Brown and Pal, 1971; McKenzie, 2000).

Direnç kazanılmasının sonuçları ile ilgili bir başka çarpıcı durum ise çapraz direnç kazanımıdır. Bu tip dirençte bir grup insektisite karşı seçilime uğramış popülasyonun dirençli bireylerinin, diğer bir gruptan bileşiklere karşı da dirençli olmasıdır (Brown and Pal, 1971). Aynı direnç mekanizmasının farklı grup insektisitlere karşı direnç oluşturmasının yanı sıra, farklı direnç mekanizmalarının aynı insektisitlere karşı direnç oluşturması da mümkün olabilir. Bu durum ise çoklu direnç oluşumu olarak tanımlanır (Mullin and Scott, 1992).

## **2.2. İnsektisit Tipleri**

Zararlı kontrolünde kullanılan kimyasal insektisitler dört ana sınıfa ayrılır. Bunlar;

a) Organoklorinler: DDT, dieldrin, aldrin ve lindan

b) Organofosfatlar: Malathion, parathion, dichlorvos ve diazinon

c) Karbamatlar: Karbaril, propoxur, sevin

d) Sentetik Pirethroidler: Permethrin, cypermethrin, deltamethrin olarak sayılabilir.

İnsektisitlerin oluşturduğu seçim baskısı altında dirençli gen veya genlere sahip bir grup birey canlılığını sürdürürken, bu gen veya genlerden yoksun diğer bireyler (duyarlı) ölmektedir. Sürekli insektisit uygulamaları sonucunda bir populasyondaki dirençli bireylerin sayısı giderek artmakta ve populasyon ilgili insektisite dirençli hale gelmektedir (Forgash, 1984). Bu nedenle canlılığın direnç kazanmasında kullanılan insektisitlerin oluşturduğu seçim baskısının önemi olduğu oldukça açıktır (Selvi et al., 2005).

### **2.3. Direnç Tipleri**

Canlılarda direnç üç tip mekanizma ile oluşabilmektedir. Bunlar sırasıyla Vigor Tolerans, Davranışsal Direnç ve Fizyolojik (Metabolik) Direnç olarak sayılabilir (Mullin and Scott, 1992).

#### **2.3.1. Vigor Tolerans**

Bu tip dirençte, kullanılan insektisit populasyon üzerindeki baskısı arttıkça canlıda direnç artışı görülür. Bu artış biçiminde direnç, canlılığın vücudunda mevsimsel olarak artan yağ oranı, vücut büyüklüğü, kütikula kalınlaşması gibi genetik varyasyonlar sonucunda oluşur.

#### **2.3.2. Davranışsal Direnç**

Çoğunlukla uyarıya bağlıdır. Canlı düşük konsantrasyondaki insektisitler de dahil olmak üzere normal konsantrasyonda insektisitle karşılaştığında temas yüzeyinden sakınma ve temas süresini azaltma ile insektisitlerle temastan kaçınır.

#### **2.3.3. Fizyolojik (Metabolik) Direnç**

Fizyolojik direnç ile insektisitlerin toksik etkileri enzimlerle azaltılır ya da yok edilir, hedef bölgede değişim oluşabilir ya da insektisit canlılığın yağ dokusunda depolanabilir. Bu direnç biçimi, artırılmış karışık fonksiyonlu oksidaz, artmış glutatyon S-transferaz ve esteraz aktiviteleri veya bu enzimlerin farklı izozim formları ile oluşmaktadır.

Böceklerin insektisitlerden etkilenmeleri üç farklı etkileşim ile olmaktadır. Bu etkileşimlerin ilki dokulardan giriş, ikincisi dağılım-depolanma-metabolizasyon, üçüncü etkileşim de hedef bölge ile moleküler etkileşimdir. Canlıda meydana gelen mutasyonlar ile enzimin aktif bölgesinde değişimler olabilir.

Dirençte rol oynayan mekanizmalar; (1) Azalmış Geri Alım, (2) Artmış Metabolik Detoksifikasyon ve (3) Hedef Bölgede Değişim olarak özetlenebilir (Mullin and Scott, 1992; Ranson et al., 2002).

Azalmış geri alımda, toksik maddelerin hücre içerisine alımı yavaşlamış veya azalmıştır. Bu durum kütikülden geçirgenliğin azaltılması ile oluşturulur. Bu mekanizma, kullanılan insektisite büyük oranda direnç gözlemlendiğinde, direnç oluşumunda en az etkili olan mekanizmadır, ancak diğer direnç mekanizmalarına eklenerek rol oynar. Bu mekanizma insektisitlere karşı knock-down zamanını arttırıcı şekilde etki ederken uygulanan insektisit toksisitesi dirençli ve duyarlı soylarda aynı kalır (Kence, 1988).

Artmış metabolik detoksifikasyonda, canlının mevcut enzimatik metabolizmasında insektisit detoksifikasyonu normale göre artmıştır. Pek çok direnç durumunda, insektisitlerin metabolizasyon hızları arttırılarak farklı enzim formları bulunur veya duyarlı bireylerde daha az oranda bulunan enzimlerin bu tip dirençte artışı görülür. Enzimler genel olarak substratları üzerinde Faz I ve Faz 2 reaksiyonları ile detoksifikasyonu sağlayan mekanizmaya sahiptirler. Hedef bölgede değişim olduğunda, enzimin aktif bölgesinde toksisiteye karşı azalmış hassasiyet sağlayacak şekilde değişimler olur (Plapp, 1984; Feyereisen, 1995; Hemingway, 2000). Metabolik direnç mekanizmalarından en sık rastlananlar esterazlar, glutation S-transferaz ve monooksijenazlardır (Hemingway, 2000).

Genelde esteraz grubu olarak bilinen hidrolazlar, ester bağlı insektisitleri kapsayan organofosfatlar, karbamatlar ve sentetik pyretroidlere karşı duyarlılık gösterirler. Bu bileşikler de ester bağlarına su katarak bileşiği asit ve alkole

ayırırlar. Parçalama işlevine sahip olan esterazlar, gen amplifikasyonu sayesinde sayılarını arttırarak direnç oluşumuna neden olabilirler. Esteraz geninin amplifikasyonu ile direnç oluşumu, afit *Myzus persicae*, sivrisinekler *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens*, *Culex tarsalis*, *Culex tritaeniorhyncus* ve *Miloparvata lugens*'te belirlenmiştir (Hemingway, 2000).

Esteraz grubu enzimlerin bir diğer direnç oluşturma şekli olan metabolizmanın arttırılması, yapısal genlerdeki nokta mutasyonları ile oluşan farklı enzim formları sayesinde yapılır. Bu mekanizma *Lucilia cuprina*'da E3 Malathion karboksilesteraz ve *Musca domestica*'da a-E7 geninde belirlenmiştir. *Culex quinquefasciatus*'ta esteraz temelli direncin, amplifiye olan est  $\alpha$  2' ve est  $\beta$  2' esterazları ile ortaya çıktığı saptanmıştır (Hemingway, 2000). *M.domestica*'da E4 geninin amplifikasyonunun *kdr* tipi direnç ile linkaj eşitsizliği yaptığı belirlenmiştir (Feyereisen, 1995). Böceklerde var olan bu tür varyasyonlar, insektisitlerin varlığında bireye seçici avantaj kazandırmaktadır.

Monooksijenazlar grubu, böceklerdeki detoksifikasyon enzim sistemleri arasında en yoğun olarak çalışılan gruptur. Evrimsel süreç içerisinde bu gen ailesi duplikasyona uğrayarak pek çok üye içeren gen ailesine dönüşmüşlerdir. Monooksijenazlar; bakteriler, böcekler, bitkiler, kuşlar ve memeliler gibi tüm aerobik organizmalarda bulunurlar. Oksijenli solunumda görevli Sitokrom P450 supergen ailesi de bunlar arasında sayılırlar. Bu grup enzimler substrat ilişkisi gösterirler ve lipofilik bileşiklere etkiye bulunurlar. Oksidatif metabolizmanın arttırılması sitokrom P450 bağımlı mikrozomal monooksijenazlarla olur. Sitokrom P450'nin bağlı olduğu monooksijenazlar ilaçlar, pestisitler ve bitki toksinleri gibi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli görevleri vardır. Monooksijenaz temelli direnç pek çok durumda en etkin mekanizma olarak bulunmuş ve *Musca domestica*, *Hyalophora cecropia* da belirlenmiştir (Mullin and Scott, 1992; Jeffrey, 1999).

Glutasyon S-transferazlar (GSTs) da insektisit direncinde etkili olduğu düşünülen bir enzim grubudur. Böceklerde bulunan bu enzimler insektisitlerin

toksik etkilerine karşı temel bir savunma gösterirler. *M.domestica*'da organofosfatlara karşı dirençli bireylerin yüksek GST seviyelerine sahip olduğu belirlenmiştir (Zhou and Syvanen, 1997).

Böceklerde direncin bu üç mekanizma sayesinde birbirine bağlantılı olarak ilerlemesine, bir mekanizma ile diğerinin indüklenebilmesine ve sonuç olarak çoklu direnç durumunun oluşarak canlıya daha fazla avantaj sağladığı görülmektedir (Gressel, 1986).

#### **2.4. Organofosfatlar**

Organofosfat esterleri zararlı kontrolünde kimyasal ajan olarak ve ayrıca tıp alanında ilaç olarak kullanımı olan maddelerdir. Organofosfatlı ve karbamatlı insektisitler asetilkolinesteraz (AChE) enzimini engelleyerek etkilerini gösterirler (Aldridge, 1982). Bu bileşikler sinir sistemindeki sinaptik geçişlerde elektriksel sinir uyarılarının iletimini bozarak canlının ölümüne sebep olur. Bir sinir uyarısı kolinerjik nörona ulaştığında, sinaptik boşluklar presinaptik membranla birleşir ve postsinaptik membran üzerindeki bir reseptöre bağlanan sinirsel uyarı taşıyıcısı olan asetilkolin (AChE) serbest kalır. Bu durumda iyonik geçirgenliğin değiştirilmesiyle uyarılar sürekli iletilir. Tekrarlanan uyarılara son verilmesi için asetilkolinesteraz enzimi devreye girer ve asetilkolini, kolin ve asetik asite ayırır. Asetilkolinesteraz (AChE; asetilkolin asetilhidrolaz, EC 3.1.1.7) böceklerin sinir sistemlerinde anahtar rolü oynar. Organofosfatlı ve karbamatlı insektisitler asetilkolinesterazın aktif bölgesine bağlanarak bir asetilkolin analogu olarak etkili olurlar. Ancak hidrolizle parçalanan asetilkolinin aksine, bu insektisitler stabil (kararlı) enzim-substrat birlikteliği oluşturabilirler. Bu insektisitler hassas canlıların paralizine veya ölümüne neden olurlar (Aldridge, 1982; Mutero et al., 1994).

Bir molekül organofosfat, bir molekül asetikolinesteraz (AChE) enzimini inhibe eder. Bu inhibisyonu AChE enziminin aktif bölgesinde bulunan serin amino asitini inhibe ederek yapar. Canlıda kas kasılması, felç ve ölümle sonuçlanabilen paraliz meydana getirdiğinden oldukça toksiktir (Lockridge et al., 1997).

Ülkemizde organofosfatlı insektisitlerin kullanımı yıllardır yoğun olarak gerek bireysel gerekse bölgesel ilaçlamalarla devam etmektedir (Akıner and Çağlar, 2006). Organofosfatlı insektisitler 1960'lı yıllardan başlayarak *Lucilia cuprina* (Koyun etsineği) ve *Musca domestica* (Ev sineği) üzerinde yoğun olarak kullanılmışlardır (Claudianos et al., 1999). Organofosfatlı insektisitler, karboksil/kolinesterazları, aktive oxon formlarında reaksiyona girerek geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler. Organofosfatlar ile karboksil/kolinesterazların reaksiyonu enzimin serin bulunduran aktif bölgesine kovalent olarak bağlanması ile sonuçlanır (fosforilasyon). İkinci adımı da serbest enzimin daha yavaş olarak yenilenmesi oluşturur (defosforilasyon). Bu nedenle organofosfatlı insektisitler esteraz inhibitörleri olarak tanımlanırlar (Oakeshott et al., 1993). Ancak bu yenilenme oranı bazı canlılarda dirençleriyle bağlantılı olarak oldukça yüksek olarak bulunmuştur (Kaloyanova, 1982; Campbell et al., 1998a, 1998b; Oakeshott et al., 2005).

#### **2.4.1. Malathion**

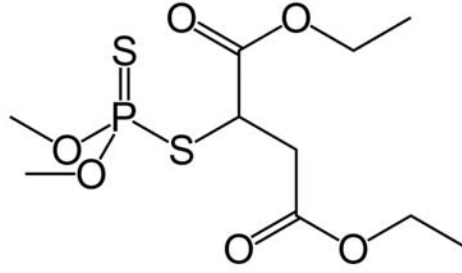
Malathion [2-(dimethoxyphosphinothioylthio) butanedioic acid diethyl ester] en sık kullanılan organofosfatlı insektisitlerden biridir. Malathion'un bilinen diğer isimleri, Carbofos, Maldison ve Mercaptotion'dur. Açık kehribar renkli bir sıvıdır. Molekül ağırlığı 330,35, kaynama noktası 0,7 mmHg basıncında 156-157 °C, erime noktası 2,85 °C'dir. Ampirik formülü  $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ 'dir.

Sistemik olmayan ve organofosfat grubunda yer alan Malathion (Cas No:121-75-5) tarım ve bahçecilikte aynı zamanda ev zararlılarına karşı kullanılmaktadır. Sık kullanılmasının sebebi diğer organofosfatlı insektisitlerle karşılaştırıldığında akut toksisitesinin az olmasıdır (Umetsu et al., 1977).

Malathion'un memelilere düşük toksik etki göstermesi, memelilerde mevcut karboksilesteraz enzim sisteminden kaynaklanmaktadır. Bu enzim sistemi memelilerde, böceklere oranla daha hızlı çalıştığı için Malathion ve metaboliti olan Malaaxon daha hızlı parçalanır ve memelilerdeki toksik etkinin şiddeti azalır. Böceklerde ise karboksilesteraz sistemi yavaş çalıştığı için Malaaxon birikimi



sonucu böcekte ortaya çıkan sinirsel kasılmalara bağlı olarak hayvan ölür (Matsumura, 1985).



**Şekil 2.1.** Malathion'un açık formülü (<http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Malathion.png>)

Organizma vücudunda bulunan Malathion, “Karışık Fonksiyonlu Oksidazlar” ile detoksifikasyona uğrayarak kendisinden 60 kez daha toksik olan Malaoxon'a çevrilir. Malaoxon memelilerde kırmızı kan hücreleri, beyin, kaslar ve diğer dokularda bulunan asetilkolinesteraz enziminin inhibitörüdür. Kolinesteraz inhibisyonu sonucunda, ortamda biriken asetilkolin kaslarda tetanik kasılmalara neden olmaktadır. Solunum kaslarında meydana gelen tetanik kasılmalar sonucu ise canlı ölmektedir (Flessel et al., 1993).

Bu çalışmada organofosfatlı bir insektisit olan Malathion'un seçilmesinin sebebi, düşük toksisitesinden dolayı Türkiye'de bu insektisit çok uzun yıllardır kullanılıyor olmasıdır. Ülkemizde Malathion, sivrisinekler ve ev sinekleri gibi hedef canlıların yanı sıra hububat zararlılarına karşı ekinlerde 1970'li yıllardan bu yana kontrol amaçlı kullanılmaktadır.

## **2.5. Genel Esteraz ve Asetilkolinesteraz Enzimlerine Bağlı İsektisit Direnci**

Direncin temelini ve genetiğini anlamak amacıyla *D.melanogaster*'in yanı sıra *Musca domestica*, *Lucilia cuprina*, *Locusta migratoria*, *Triatoma infestans*, *Culex* ve *Anopheles* gibi pek çok canlıda esteraz enzimleri araştırılmıştır. Dirençlilikte rol oynayan enzimler arasında bulunan genel esteraz ve asetilkolinesteraz enzimlerinin aktiviteleri ile direnç arasındaki ilişkiye bakılmıştır (Khoo et al., 1992; Lüleyap ve Kasap, 2000; Montgana, et al., 2003; He et al., 2004; Uğurlu ve Gürkan, 2007).

*D.melanogaster*'de çalışılan ilk enzimlerden olan esteraz enzimlerinin monomerik bir yapıda olduğu ve *D.melanogaster*'in 3. kromozomunun 35.9 numaralı bölgesinde yer aldığı belirtilmektedir (Ashburner, 1989). Esteraz enzimleri, organizmada karboksilik asitlerin esterlerini hidrolize eder. Bu enzimlerin böceklerde üreme davranışında, (Richmond et al., 1980; Karotam and Oakeshott, 1993) feromon ve hormon metabolizmasında (Shanmugavelu et al., 2000), sindirimde (Argentine and James, 1995) ve sinir iletiminde ayrıca insektisit direncinde (Mutero et al., 1994) rol oynadığı düşünülmektedir (Claudianos et al., 1999). Esterazlardan Est 6 enziminin elektroforetik varyantları, polimorfizm olarak bu organizmada ilk rapor edilen varyantlardır (Dickinson and Sullivan, 1975).

*Drosophila* türleri arasında bulunan *saltans* grubunun dört türünde yapılan bir çalışmada 34 esteraz bandı belirlenmiş, bunlardan 18'i a-esteraz, 15'i b-esteraz ve 1'i a/b-esteraz olarak sınıflandırılmıştır (Nascimento and Bicudo, 2002).

Esterazlar böceklerde hem türler arası hem de tür içi varyasyon gösteren önemli bir gruptur. Örneğin, *Drosophila pseudoobscura*'da en polimorfik lokuslardan biri olan Est-5'in elektroforetik hareketi, jeller farklı sıcaklıklarda tutularak incelenmiş, sonuçta ortaya çıkan bazı elektroforetik varyantlar dimerik enzim olarak, bazıları da monomerik olarak saptanmıştır (Arnason and Chambers, 1987).

Genetik çalışmalarda sık kullanılan bir yöntem olan allozim elektroforezi ile *D.melanogaster* dahil olmak üzere pek çok canlıda yapılan araştırmalarda, esterazların farklı allozimleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. (Maruyama et al., 1984; Arnason and Chambers, 1987; Labate et al., 1989; Healy et al., 1991; Tavares et al., 1998; Nascimento and Bicudo, 2002; He et al., 2004). Esteraz polimorfizmi çalışılan bir canlı olan *Triatoma infestans*'ta Est 1'den Est 6'ya kadar olan esterazların bantları PAGE (Poliakrilamid jel elektroforezi) kullanılarak gözlenmiş ve bunlardan dördünün a-naftil asetat substratını hidrolize ettiği belirlenmiştir (Tavares et al., 1998).

Ülkemizde yapılan bir araştırmada, *D.melanogaster*'in Muğla bölgesinden elde edilen doğal populasyonların glutatyon S-transferaz (GST), AChE ve genel esteraz aktiviteleri ölçölmüş, poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemi kullanılarak esteraz enzim örüntüleri belirlenmiştir. Yüzde kalan asetilkolinesteraz enzim aktivitesi incelenen örneklerde duyarlı Canton S soyuna göre yüksek bulunurken genel esteraz aktivitesi ile direnç arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır (Taşkın et al., 2007).

Esteraz enzimlerinin sınıflandırılması üç tip inhibitör grubun konsantrasyonlarına karşı hassasiyeti esas alınarak yapılır. Bu gruplar sülfidril reagentleri (ajanları), organofosfatlar ve eserin sülfattır. Esteraz enzimlerinin dört farklı sınıfı Oekeshott et al. (1993) tarafından gösterilmiştir.

### **2.5.1. Esterazların Sınıflandırılması**

**2.5.1.1. Asetil esterazlar:** Bu enzimler hiçbir inhibitör tarafından etkilenmezler ve genelde alifatik bileşikleri (asetik asit gibi) tercih ederler.

**2.5.1.2. Aril esterazlar:** Bu enzimler sülfidril reagentleri ile inhibe olurlar ve genelde aromatik substratları tercih ederler.

**2.5.1.3. Karboksil esterazlar:** Bu enzimler yalnızca organofosfatlarca inhibe olurlar ve alifatik esterleri tercih ederler.

**2.5.1.4. Kolinesterazlar:** Bu enzimler organofosfatlar, eserin sülfat ve kolinesterler tarafından inhibe olurlar. Diğer alifatik ve aromatik esterler yerine kolinesterleri tercih ederler.

*D.melanogaster*'de elektroforetik olarak, 22 farklı esteraz belirlenmiştir (Çizelge 2.1). Bu esterazların çoğu karboksil, kolin veya asetil esterazlardır. *D. melanogaster*'de bu esterazlara ek olarak 40'dan fazla esteraz allozimi olabileceği düşünölmektedir (Oekeshott et al., 1993).

**Çizelge 2.1.** *Drosophila*'da belirlenen esterazlar ve allozimleri

<b>Esterazlar</b>	<b>İzozim Formları</b>
<b>Karboksil Esteraz</b>	
<b>Altsınıf 1</b>	EST12, EST15, EST16, EST18, EST23
<b>Altsınıf 2</b>	EST1, EST2, EST6, EST14, EST17, EST22
<b>Kolinesterazlar</b>	
<b>Altsınıf 1*</b>	EST4, EST5, EST8, EST13
<b>Altsınıf 2</b>	EST9, EST10
<b>Asetilesterazlar</b>	EST19, EST20, EST21
<b>Diğer çeşitli esterazlar</b>	EST3, EST7, EST11

\* Kolinesterazın birinci altsınıfı aynı zamanda asetilkolinesterazların izozimleridir (Healy et al., 1991 ve Spackman et al., 1993'dan alınmıştır). EST: Esteraz

Literatürde pek çok artropod türünde, insektisit direncinin asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi ile ilişkili olduğu ve düşük AChE aktivitesine sahip populasyonlarda yüksek insektisit direnci olduğu gözlenmiştir (Brown and Pal, 1971; Morton and Singh, 1982; Walsh et al., 2001).

Araştırmalar, insektisitlere karşı oluşan direncin, *Drosophila melanogaster* ve *Musca domestica*'da tanımlanmış olan asetilkolinesteraz (*Ace*) geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda gerçekleştiğini göstermektedir. Buna bağlı olarak, *Ace* geni tarafından kodlanan AChE, organofosfatlar ve karbamat grubu insektisitlerin birincil hedefidir (Fournier et al., 1989; Fournier et al., 1992; Mutero et al., 1994; Walsh et al., 2001; Menozzi et al., 2004; Taşkın et al., 2004). Örneğin, *Drosophila*'da transgenik *ace* stokları ile yapılan bir çalışmada, AChE genindeki fenilalaninin tirozin amino asiti ile yer değiştirmesinin organofosfat direncine sebep olduğu açık olarak kanıtlanmıştır (Fournier et al., 1992).

Bu konuda yapılan başka bir çalışmada AChE geninde tirozinin aspartik asitle yer değiştirmesinin enzimi pek çok organofosfata karşı dirençsiz hale

getirdiği belirtilmiştir (Mutero et al., 1992). Ancak *D.melanogaster* açısından bakıldığında, direncin pek çok farklı genle ilişkili olması nedeniyle, dūřuk AChE aktivitesinin bireyleri daha dirençli hale getirdiği anlaşılmamalıdır (Singh and Morton, 1981).

Bu tez çalışması kapsamında, doğadan *D.melanogaster* populasyonları elde edilmiş ve direnç mekanizmalarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu noktadan hareketle, organofosfatlı bir insektisit olan Malathion'un direnç dūzeyleri, direnlilikle ilişkili olduğu gözlenen genel esteraz ve asetilkolinesteraz enzimlerinin aktiviteleri ve Est-6 polimorfizmi araştırılmış, Est-6 enziminin alel sıklıkları belirlenmiştir. Elde edilen tūm veriler, populasyonların coğrafi konumları, direnç dūzeyleri, enzim aktiviteleri ve genetik uzaklıkları çerçevesinde istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmalarımızın tamamında deney hayvanı olarak seçtiğimiz organizma *Drosophila melanogaster*'dir. *Drosophila*'nın bazı özellikleri deney hayvanı olarak kullanılmasını kolaylaştırmıştır (Ashburner, 1989).

Bu özellikler;

- a- Çok sayıda elde edilmeleri ve bol yumurta vermeleri,
- b- Kısa ömürlü olmaları,
- c- Homojen ya da genetik arıdöl olarak sağlanabilmeleri,
- d- Küçük yapılı oluşları,
- e- Diğer kullanım kolaylıkları ve ekonomik oluşu şeklinde sıralanabilir.

Est 6'nın *D. melanogaster* erkeklerinde üreme fonksiyonunda görevi olduğu ve esteraz enzimlerini spermleri vasıtası ile dişilere transfer etmesi nedeniyle (Gilbert and Richmond, 1982) tüm deneylerde kullanılan dişi bireyler virjin olarak elde edildi.

#### 3.1. *Drosophila* Besiyerinin Hazırlanması

Genetik laboratuvarımızda doğal populasyon kültürleri standart *Drosophila* besiyerinde tutulmaktadır (Bozcuk, 1976; Ünlü and Bozcuk, 1979). Standart *Drosophila* besiyerini hazırlamak için gerekli maddeler, mısır unu, toz şeker, bira mayası, agar (Difco), distile su ve asit karışımıdır. Asit karışımı anti-fungal amaçlı olarak, ortofosforik asit (Merck), propiyonik asit (Merck) ve distile su ile hazırlanır. Asit karışımı dışında, yukarıda sayılanlar karıştırılarak kaynatılır. Kaynamaya başladıktan sonra ateş kısılır ve ara ara karıştırılarak 5 -10 dakika kaynatılır. Bu sürenin sonunda ateşten alınıp, asit karışımı ilave edilir ve iyice karıştırılır. Besiyeri henüz sıcakken, kültür şişelerine 4-5 cm yada cam tüplere 1-2 cm yükseklikte olacak şekilde dökülür ve üzerleri temiz kurutma kağıtlarıyla kapatılarak kurumaya bırakılır. Besiyerleri soğuyup, katılaştığında şişelerin veya tüplerin ağızları pamuk ve gazlı bezden yapılmış tıplarla kapatılır.

### 3.2. Bayıltma Yöntemi

*Drosophila*'lar, yerçekiminin tersine (negatif geotropik) ve ışığa doğru (pozitif fototropik) yönelim gösterirler. Bu nedenle, deneysel işlemler sırasında *Drosophila*'lar çeşitli yöntemlerle hareketsiz hale getirilir. Bunlardan en çok tercih edilen eterle bayıltma yöntemidir (Doane, 1967). Deneylerimizde ekonomik oluşu ve çalışma kolaylığı nedeniyle *Drosophila*'laları bayıltmak için eterle bayıltma yöntemi kullanılmıştır. Bayıltma işlemi 250 cc 'lik mantar tıpalı bayıltma şişelerinde yapılır. Kültür şişesinden bayıltma şişesine aktarılan sinekler, eter (Dieter - Carlo, Fluka) damlatılmış tıpanın bayıltma şişesine kapatılmasıyla eterize edilir. Diğer bir bayıltma yöntemi "karbondioksitle bayıltma yöntemi"dir. Bu yöntem, popülasyonların insektisite karşı dirençlerinin araştırılmasında kullanılmıştır.

### 3.3. *Drosophila* Doğal Popülasyonlarının Elde Edilmesi

*Drosophila* doğal popülasyonları Türkiye'de insektisitlerin yoğun olarak kullanılmakta olduğu güney bölgelerden daha fazla olmak üzere, Temmuz-Ağustos 2005 tarihlerinde toplandı. Bu örnekler Antalya-Merkez, Antalya-Serik, Antalya-Finike, Antakya-Merkez, Hatay-Erzin, Hatay-Dörtyol, Kocaeli-Kerpe, İzmir-Merkez, İzmir-Çandarlı, Eskişehir-Merkez ve Balıkesir-Ayvalık bölgelerinden elde edilerek laboratuvara adapte edildi. Bölgelerin haritada yerleşimleri Şekil 3.1'de enlem ve boylam değerleri Çizelge 3.1'de görülmektedir.

*Drosophila*'ların elde edildiği bölgelerdeki belediyelerin günümüzde hangi insektisitleri uyguladıkları Çizelge 3.2'de belirtilmiştir. Belediyelerin son yıllarda daha çok sentetik pirethroidleri tercih ettikleri görülmektedir. Bunun yanında, T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri internet sitesinden alınan bilgiye göre, günümüzde, uzman personeller tarafından kurumlarda ve evlerde kullanılmak üzere izinli olarak satılan Malathion içerikli insektisit ürünleri bulunmaktadır (<http://www.biyosidal.saglik.gov.tr/izinliler.htm>). Bu bilgiye göre, evlerde kullanılmak için izinli sekiz ürün, uzman personellerce kullanılmak üzere izinli 13 ürün olduğu belirtilmiştir.

Ülkemizde, zirai mücadele alanında kullanılan insektisitlerden biri olan Malathion, baklagil tohum böceği, yonca hortumlu böceği, kiraz sineği, yaprak bitleri, elma pamuklu biti, armut kaplanı, soyada çizgili yaprak kurdu, bağda bağ unlu biti, çizgili pamuk yaprak kurdu, haşhaşa kök kurdu, susam güvesi gibi zararlılara karşı kullanılmaktadır (www.tarimziraat.com/zirai\_mucadele\_ilaclari). Tarım Bakanlığı tarafından izinli 47 adet ürün bulunmaktadır (Aydınöğlu ve ark., 2002).



**Şekil 3.1.** Türkiye haritasında *D.melanogaster*'in elde edildiği bölgeler (Antalya-Merkez, Balıkesir-Ayvalık, İzmir-Çandarlı, Hatay-Dört Yol, Hatay-Erzin, Eskişehir-Merkez, Antakya-Merkez, İzmir-Merkez, Kocaeli-Kerpe, Antalya-Serik)

**Çizelge 3.1.** *Drosophila melanogaster* doğal popülasyonlarının toplandığı bölgelerin enlem ve boylam değerleri (Bilgiler internetten derlenmiştir).

	Popülasyon	Enlem (kuzey)	Boylam (Doğu)
1	Antalya-Merkez	36 <sup>0</sup> 54'	30 <sup>0</sup> 42'
2	Balıkesir-Ayvalık	39 <sup>0</sup> 16'	26 <sup>0</sup> 42'
3	İzmir-Çandarlı	38 <sup>0</sup> 57'	26 <sup>0</sup> 58'
4	Hatay-Dört Yol	36 <sup>0</sup> 49'	36 <sup>0</sup> 13'
5	Hatay-Erzin	36 <sup>0</sup> 95'	36 <sup>0</sup> 03'
6	Eskişehir-Merkez	39 <sup>0</sup> 46'	30 <sup>0</sup> 32'
7	Antakya-Merkez	36 <sup>0</sup> 13'	36 <sup>0</sup> 09'
8	İzmir-Merkez	38 <sup>0</sup> 25'	27 <sup>0</sup> 09'
9	Kocaeli-Kerpe	41 <sup>0</sup> 20'	30 <sup>0</sup> 20'
10	Antalya-Serik	36 <sup>0</sup> 55'	31 <sup>0</sup> 06'



**Çizelge 3.2.** *Drosophila melanogaster* populasyonlarının toplandığı bölgelerde ergin ve larva mücadelesinde kullanılan insektisitler (Bilgiler belediyelerden alınmıştır).

	Bölge	Belediye	Kullanılan İsektisitler
1	Antalya	Antalya Büyükşehir Belediyesi	Ergin:Permethrin,Cypermethrin Larva:Temephos, Diflubenziron ve <i>Bacillus thuringiensis</i>
2	Ayvalık	Ayvalık Belediyesi (Balıkesir)	Ergin:Cypermethrin,Deltamethrin Larva:Temephos
3	Çandarlı	Çandarlı Belediyesi (İzmir)	Ergin:Cypermethrin Larva:Temephos
4	Dört Yol	Antakya Belediyesi	Ergin:Cyphenothrin,Cypermethrin , Deltamethrin Larva:Temephos
5	Erzin	Erzin Belediyesi (Hatay)	Ergin: Cypermethrin
6	Eskişehir	Eskişehir Büyükşehir Belediyesi	Ergin:Permethrin, Etophenprox Larva: <i>Bacillus thuringiensis</i>
7	Finike	Finike Belediyesi (Antalya)	Ergin:Permethrin
7	Antakya	Antakya Belediyesi	Ergin:Cypermethrin,Deltamethrin Larva:Temephos
8	İzmir	İzmir Büyükşehir Belediyesi	Ergin:Permethrin,Cyphenothrin, Cyfluthrin, Etophenprox Larva: <i>Bacillus thuringiensis</i>
9	Kerpe	Kandıra Belediyesi (Kocaeli)	Ergin:Cyfluthrin Larva: <i>Bacillus thuringiensis</i>
10	Serik	Antalya Belediyesi	Ergin:Permethrin Larva:Temephos

### 3.4. *D.melanogaster* Populasyonlarında Malathion'a Karşı Direncin Ölçülmesi

#### 3.4.1. *D.melanogaster*'de Direnç Ölçme Yönteminin Belirlenmesi

Direnç ölçümünde, *Drosophila*'ya uygulanabilirlik yönünden en uygun direnç yöntemini belirlemek üzere Ağustos 2005 tarihinden itibaren elde edilmiş olan doğal populasyonlarda Malathion'a karşı direnci ölçme çalışmaları yapılmıştır. Bu

çalışmalar, 1 Eylül 2005- 1 Şubat 2006 süresince Erasmus kapsamında Avrupa Ülkelerinden biri olan Hollanda'da Groningen Üniversitesi Genetik Bölümü Evrimsel Genetik Laboratuvarında sürdürülmüştür.

Türkiye'den götürülen tüm doğal populasyonlar, 5 Eylül 2005 tarihinde Groningen Üniversitesinde yeni besiyerlerine alınmış ve bir iki nesil sonra uyum sağlamışlardır. Ancak, Finike populasyonu toplandığı zamandan itibaren laboratuvara uyum sorunu yaşamakta olması nedeniyle direnç testlerinden sonraki deneylerde kullanımı iptal edilmiştir.

Eskişehir populasyonunda *Drosophila simulans* ile karışık olarak toplanmış olan *D.melanogaster* bireylerinin dişileri virjin olarak elde edilip *D.simulans* erkeklerinden arındırılarak *D.melanogaster* bireylerin üretilmesi sağlandı. *D.simulans* erkek bireylerinde abdomenin uç kısmı *D.melanogaster*'den farklı bir yapıda olması ile birbirinden ayrılabilir. Ancak dişilerini mikroskop altında ayırt etme olanağı yoktur. Bu nedenle Eskişehir populasyonunun dişileri bireysel olarak tüplere alındı ve populasyonun *D.melanogaster* erkek bireyleri ile bir tüpe bir dişi üç erkek konularak çaprazlandı. Bu çaprazlardan üreme gerçekleşen tüpler ayrılarak aynı deney bir kere daha tekrar edildi. Sonuçta, populasyonun tamamen *D.simulans*'tan arındırıldığından emin olunarak direnç testlerine alındı.

*Drosophila* ile yapılan çalışmalarda, duyarlı soy olarak, organofosfatlı insektisitlere hassas olan Canton S populasyonu kullanılmaktadır (Ashour et al., 1987; Fournier et al., 1989; Pyke et al., 2004). Bu nedenle tüm deneylerde *D.melanogaster*'in Canton S soyu, duyarlı kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Canton S populasyonu, canlılarda önemli bir direnç kazanma şekli olan gen amplifikasyonunu, P elementi içermemesinden dolayı gerçekleştirmez. Bu nedenle araştırmalarda duyarlı populasyon olarak kullanılmaktadır.

Hollanda'da bulunan Groningen Üniversitesi'nde çalışmaya başlamadan önce Hacettepe Üniversitesinde Malathion direnç düzeylerinin saptanması amacıyla

yapılan pilot deneylerde, Dünya Sağlık Örgütü'nün karasinek direnç testi olarak belirlediği üç yöntemden biri olan Topikal Aplikasyon uygulandı. Bu uygulama sonrasında canlı kalan bireylere göre doz ayarlamaları yapıldı. Ancak bu yöntemin oldukça küçük bir canlı olan *Drosophila* üzerinde elverişli bir şekilde uygulanmasında güçlükler çekildi. Uygulanabilen en küçük miktarın 0.25 mikrolitre olması ve canlının toraksına damlatılması sırasında karşılaşılan güçlükler sebebiyle bu yöntem uygulanamadı.

Groningen Üniversitesi'nde yapılan çalışmalarda, direnç düzeyi saptanmasında belirlenen diğer bir yöntem olan besiyerine insektisit eklenmesi, 3 populasyon (Kerpe, İzmir, Ayvalık) ile 3 deney seti olarak yapıldı. Bunlarda ulaşılan doz ayarlaması, temas yöntemine göre daha farklı çıktığından ve her populasyon için ayrı ayrı olarak letal dozun belirlenmesinde fazla zaman aldığından direnç genlerinin araştırılmasında sürenin kısıtlı olması sebebiyle tercih edilmedi.

Direnç düzeylerinin saptanmasında uygulanan başka bir yöntem olan temas yöntemi (rezidüel yöntem) hem kolay uygulanması, hem de çok sayıda bireyin aynı anda denemeye alınabilmesi açısından tercih edildi. Canlının insektisite temasından kaçınması durumu da düşünülerek, her populasyon için uygulamalar en az 5 deney seti olarak uygulandı. Ayrıca her deney setinde dozlar 3 kere tekrarlandı.

### **3.4.2. *D.melanogaster* Populasyonlarında Malathion Direnç Testleri**

Malathion'a karşı direncin (LC<sub>50</sub>) saptanması amacıyla seçilen temas yöntemi, Miyo et al. (2001)'den uyarlanmıştır.

#### **3.4.2.1. Çevre Koşulları**

Deneyde kullanılan tüm *Drosophila* stokları, 25±1°C sıcaklık ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık koşullarına sahip genetik laboratuvarında yetiştirildi. *Drosophila*'da 25°C sıcaklıkta embriyonik gelişim, dişiler kültür şişelerine

yumurtladıktan yaklaşık 24 saat sonra başlar. Birinci instar larvalar besiyerinin üst kısımlarında beslenerek, ikinci ve üçüncü instar larvalar besiyerinin iç kısımlarında kanallar açarak ilerlerler. Olgun üçüncü instar larvalar, yaklaşık 96 saat sonra besiyerini terk ederek kültür şişesinin üst kısımlarına çıkarak pupa evresine girer. Pupadan çıkış (eklozyon), yumurtadan itibaren yaklaşık 9 günde gerçekleşir. Erişkin dişiler popülasyona göre ilk 6-12 saat arasında çiftleşmezler. Deneyler, dişilerin pupadan çıkışından itibaren 8-10 saat içinde erkek bireylerden ayrılarak çiftleşmemiş (virjin) olduklarından emin olunur. Deneylerde kullanılacak dişilerin 7 günlükten daha yaşlı olmamaları gerekir. Bunun nedeni, sahip oldukları enzimlerin aktivitelerinin azalması, hücresel faaliyetlerde değişim ve bireydeki yaşlanma etkilerinin artması gibi sonuçları değiştirecek etkenlerin artmasıdır (Ashburner, 1989).

Bu koşullar göz önünde tutularak, deneyler *Drosophila* dişilerinin görece genç olmalarına (3-5 günlük) dikkat edilerek yapılmıştır. Deney öncesinde kullanılacak stoklar çoğaltılarak, pupadan çıkıştan itibaren 3-5 gün boyunca virjin dişi ve erkek *Drosophila*'lar toplanarak elde edilen erginler, bir tüpte 25 adet olmak üzere besiyeri içeren tüplere konuldu.

#### **3.4.2.2. Malathion'un LC<sub>50</sub> Düzeylerinin Saptanması**

Malathion'a karşı direnç düzeylerinin saptanması çalışmaları temas yöntemine göre yapıldı.

a) 1 cm eninde 7,5 cm boyunda kesilen kurutma kağıtlarına 0,1 ml Malathion-aseton karışımları (0,1ml/7,5 cm<sup>2</sup>) emdirildi ve besiyeri içermeyen boş tüplere konuldu.

b) Kontrol gruplarında, 0,1 ml aseton emdirilen kurutma kağıtları kullanıldı.

c) Kağıtlar tamamen kuruduktan sonra, karbondioksitle hafifçe bayıltılan sinekler her tüpe 10 adet olacak şekilde yerleştirildi.

d) Lastikli tülbent ile ağız kapatılan tüpler, insektisit test laboratuvarında bulunan 25±1°C sıcaklık odasına alınarak üzerlerine 1 ml distile su emdirilmiş pamuklar konuldu.

e) 24 saat sonunda ölümler kaydedilerek istatistik analizleri yapıldı.

f) Deneyley için hesaplanan dozlar artan 5 doz, ve her doz için 3 tekrar olarak uygulandı.

### **3.4.3. *D.melanogaster* Populasyonlarında Esteraz Allozimlerinin Araştırılması**

Nişasta jel elektroforezi, esteraz allozimlerinin araştırılmasında elektroforetik yöntem olarak seçilmiştir (Shaw and Prasad, 1970). Elektroforezde, jel tamponu ile yürütme tamponu (PH 7 Tris sitrat) birbiri ile aynı olan, sürekli sistem kullanılmıştır. Pilot denemelerde, elektroforezde oluşan tüm bantlar yüzeye yayılmış görünerek allozimleri ayırt etmeyi zorlaştırması nedeniyle farklı tamponlar ve yürütme hızları denenmiştir. Bu problem akımın 75 mA (mili Amper)'den 30 mA'e düşürülmesiyle çözülmüştür. Sonuçta, jelin 75mA'de 2 saat yürütülmesi yerine, 30 mA'de 5 saat yürütülmesiyle bantlaşmalar net bir Şekilde elde edimiştir (Şekil 3.2).

Top Agar nişasta elektroforezi yönteminde boya, kaynatılıp 50°C'ye soğutulmuş 30 ml distile su ile 0,3 gr agara eklenerek hazırlandı. Kullanılan malzemeler Sigma ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

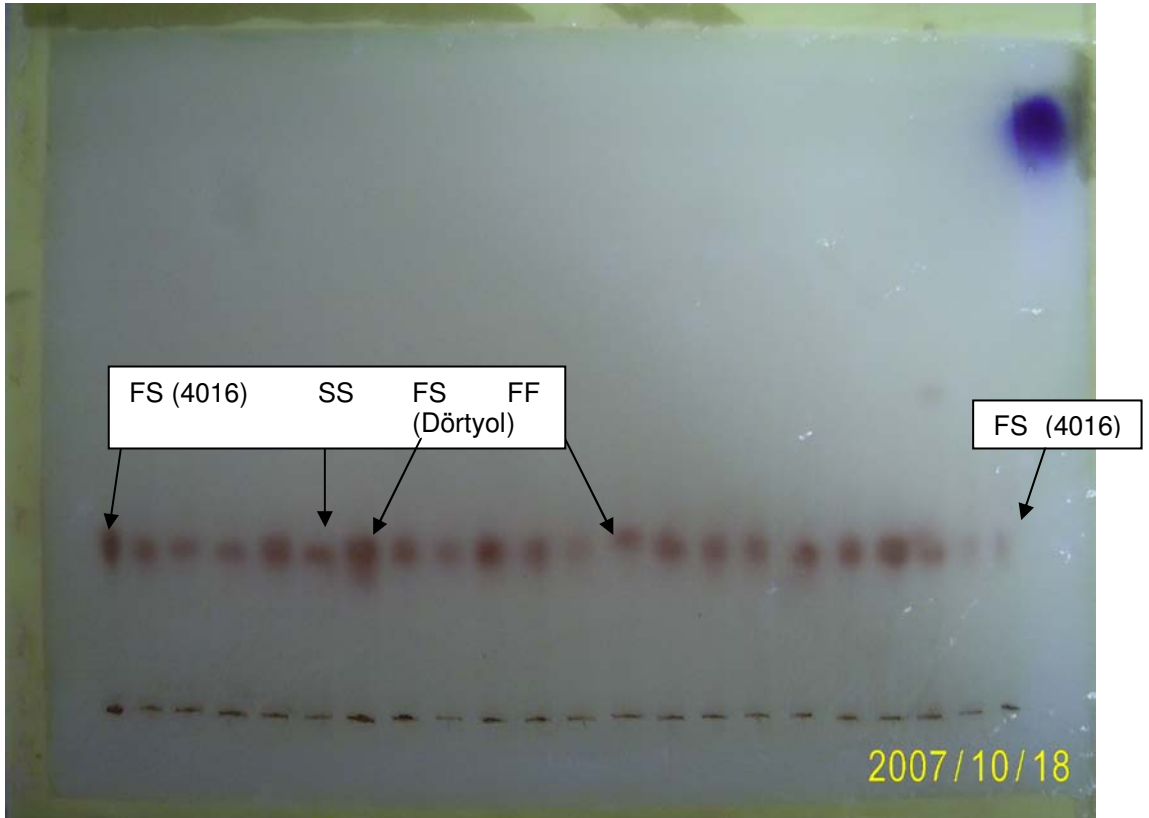
#### **3.4.3.1. Top Agar Nişasta Jelinin Hazırlanması**

Nişasta jelin hazırlanması amacıyla 18 gr nişasta tartılır ve 15 ml tampon eklenerek 180 ml distile su ile tamamlanır (~%9'luk jel). Nişasta, tampon ve distile su eklendikten sonra iyice karıştırılır. Ocakta alev üzerinde aynı yönde karıştırılarak kaynatılır. Jel kaynadıktan sonra vakumlanarak hava kabarcıklarından arındırılır. Jel kaba dökülür önce 30 dakika oda sıcaklığında daha sonra en az 1 saat buzdolabında bekletilir. Örnekler jele yüklenmeden hemen önce, daha homojen ve düzgün bir yüzey elde etmek amacıyla, jelin üst kısmı kesilip atılır. Jele 20 rnek alabilen bir tarakla kuyucuklar açılır.

Bireyler birbirinden ayrı kuyucuklar içeren porselen bir kap üzerine alınarak tek tek homojen bir Şekilde 100 l distile su ile ezilerek filtre kağıtlarına emdirildi ve kağıtlar bekletmeden jele yüklendi. Bu işlemler sırasında bireyler enzim aktivitesinde bozulmayı önlemek amacıyla buz üzerinde tutuldu. Jelde yürümeyi

görmek üzere konulan marker, 10 ml %50'lik etanol içerisinde 20 mg bromocresol green çözdürülerek hazırlandı.

Hazırlanan jel 75 mili amper'i (mA) aşmayacak şekilde, 140-180 Volt arasında 5 saat boyunca yürütülür. Bu süre sonunda kağıtlar çıkarılıp akım yeniden açılır. Marker takibi yapılarak yürütülen jelin akımı kapatılır. Boya çözeltisi, 5 mg alfa naftil asetat ve 5 mg beta naftil asetat, 0.5 ml asetonda çözülmüş fast blue eklenerek fosfat tamponu içinde hazırlanır (Allendorf et al., 1977). Agar çözeltisi, 0,3 gr agar ve 30 ml distile su kaynatılıp, 50 dereceye soğutulmuş agar çözeltisine eklenir ve bekletmeden jelin üzerine dökülür. Jel 37°C etüvde 30 dakika bekletilerek bantlar elde edilir (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** Elektroferez sonucunda Hatay-Dörtyol populasyonunda izlenen bantlar (Jelin ilk ve son kuyucuklarında bulunan 4016 numaralı populasyon Est 6'nın heterozigot marker populasyonudur).

Elektroforezde gözlenen bantların incelenmesi amacıyla esteraz 6 (Est 6)'nın elektroforetik varyantı (4016 numaralı marker soy), Amerika'da bulunan Bloomington *Drosophila* Stok Merkezinden temin edildi. Bu stok esterazın *hızlı* (*Fast*, FF) ve *yavaş* (*Slow*, SS) alellerinin heterozigot (FS) genotipine sahiptir. Est 6 ve esteraz C'nin (Est C)'nin heterozigot marker stok bireyleriyle [ **Est-6[S]** Est-C[F] Fdh[S] Lap-D[F] Acph-1[A] Tpi[6]/TM6, **Est-6[F]** Est-C[S] Fdh[F] Lap-D[S] Acph-1[B] Tpi[4] ] elimizde bulunan bireylerin jeldeki mobiliteleri karşılaştırılarak bantların *hızlı* (*fast*, FF) veya *yavaş* (*slow*, SS) ya da heterozigot (FS) olup olmadığı anlaşıldı (Şekil 3.2).

#### 3.4.3.2. Esteraz (EC 3.1.1.1) Lokusunun Değerlendirilmesi

Protein elektroforezi, bir elektrik alan etkisiyle enzimlerin ve enzim olmayan proteinlerin varyasyonlarını incelemek amacıyla yıllardan beri kullanılmakta olan bir yöntemdir. Bu yöntem, 1960'lardan başlayarak doğal populasyonlarda allozim varyasyonu, gen akışı, hibridizasyon, filogenetik ilişkiler gibi genetik varyasyonları araştırmak amacıyla kullanılmıştır (Hillis et al., 1996).

Est-6 lokusu üçüncü kromozomun 32.5 pozisyonunda haritalanır. Doğal populasyonlarda, Est-6'nın coğrafi veya mevsimsel olarak değişim gösteren iki ana allozimi (*hızlı* ve *yavaş*) olduğu bilinmektedir (White et al., 1988). Yüksek enlemlerde ve daha serin mevsimlerde *yavaş* (slow) alloziminde artış olduğu gözlenmiştir (Franklin, 1981; Oakeshott et al., 1993; Ayala et al., 2002).

Est-6'nın populasyonlardaki alellerini saptamak amacıyla heterozigot elektroforetik varyant olan 4016 numaralı stok kullanılmıştır. Genotipleme sonuçlarında tüm populasyonlar Est-6 yönünden polimorfik bulunmuştur. Doğal populasyonların Est-6 allozimlerinin sıklıkları saptanmış ve Hardy-Weinberg dengesi yönünden incelenmiştir. Mikroevrimsel durağanlık olarak da adlandırılabilen Hardy Weinberg dengesinde, populasyonların dişi ve erkek bireylerinde alel sıklık farkları, dengeden sapma yapabilecek etkenlerden biridir.

Bunun yanı sıra, populasyonlar arasındaki genetik uzaklıklar ( $F_{ST}$  değerleri) hesaplanmıştır.  $F_{ST}$  değerleri, alel sıklıkları üzerinden gerçekleştirilen bir analizdir. Genetik uzaklık değerleri ( $F_{ST}$ ) kullanılarak, populasyonlar arasında Est-6 varyasyonu temelinde akrabalık ilişkisini gösteren topoloji çıkarılabilir, allozim polimorfizmini kullanarak populasyonlar arası direnç farklılıklarına ilişkin bir yorumda bulunulabilir.

### **3.4.3.3. Seçilim Deneyleri**

Bir özellik, eğer genetik temele dayanıyorsa seçilim onu değiştirebileceğinden yapay seçilim ile istenen özellik seçilebilir. Bu şekilde türlerin genetik çeşitliliğinden faydalanılarak istenilen özellik doğrultusunda kuşaklar seçilebilir (Futuyma, 2008).

İnsektisit direncinin uzun zamanlı sonuçlarını yapay olarak elde etmek için, tüm populasyonların erginleri ikinci kuşaktan beşinci kuşağa kadar direnç testlerine tabi tutuldu. Seçilim deneyleri tüm populasyonlardan virjin dişiler elde edilerek yapıldı. Deneye alınacak bireylerin, deneyden önce ve sonra yeterli olarak beslenmelerini sağlamak amacıyla bir tüpe en fazla 10 birey yerleştirildi. Malathion uygulanan her deney setinde canlı kalan bireyler alınıp taze besiyerine konuldu. Bu bireylerden elde edilen yavrular yeniden direnç testine tabi tutularak seçilim gerçekleştirildi. Tüm bayıltma işlemleri eter kullanılarak yapıldı.

### **3.4.4. *D.melanogaster* Doğal Populasyonlarında Direncin Biyokimyasal Olarak Ölçülmesi**

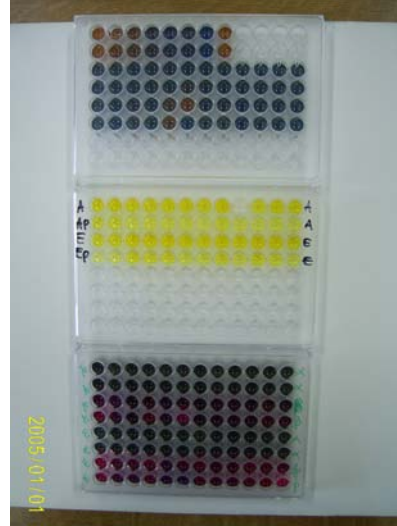
*Drosophila*'nın insektisitlere karşı dirençliliğinde önemli rolleri olan detoksifikasyon enzimlerinden genel esteraz ve asetilkolinesteraz enzimlerinin spesifik aktiviteleri biyokimyasal çalışmalarla belirlenmiştir. Bu deneyler, H.Ü. Biyoloji Bölümü Ekoloji laboratuvarında (EBAL) bulunan Biotek marka mikroplate okuyucu UV spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır.

Enzim aktivitesi deneyleri, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından insektisit direnç mekanizmalarını saptamak amacıyla derlenmiş laboratuvar kitapçığından *Drosophila*'ya uyarlanmıştır (Hemingway, 1998). Bu uyarlamaya göre, örnekler



günlük olarak derin dondurucudan alınarak her bir birey bir ependorf tüpe yerleştirildi. Tüplerdeki örnekler üzerine 200 µl homojenizasyon tamponu (50 mM sodyum fosfat tamponu, pH 7.5) eklenerek iyice ezildi. Bu karışım, 14000 rpm de 4°C soğutmalı santrifüj kullanılarak, 10 dakika santrifüj edildi. Buradan elde edilen süpernatant, enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere mikropipetle alındı ve 96 kuyucuklu mikroplate'lere yerleştirildi (Şekil 3.3). Aktivite ölçümleri literatüre uygun olarak yalnız erkek bireyler kullanılarak yapıldı (Örn. Durusoy et al., 1995). Ölçümleri kullanılacak olan *Drosophila* populasyonlarının erkek bireyleri yumurtadan itibaren aynı yaşta (3 günlük) toplandıktan sonra, -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi (Durusoy et al., 1996).

**Şekil 3.3.** Enzim aktivitesinin belirlenmesi çalışmaları



#### **3.4.4.1. Genel Esteraz (non-spesifik) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

Hazırlanan enzim kaynağından 20 µl alınarak iki tekrarlı olmak üzere mikroplate'e konuldu. 30 mM olarak hazırlanmış olan alfa naftil asetat ve beta naftil asetat çözeltilerinden 120 µl'si bu tekrarların birine alfa naftil asetat diğerine beta naftil asetat olacak şekilde ilave edildi. Reaksiyona girmeleri için 30 dakika oda ısısında bekletildi. Ardından 0,023 gr Fast Blue Salt 2.25 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra üzerine %5'lik olarak hazırlanmış Sodyum Dodesil Sülfat çözeltisinden 5.25 ml ilave edilerek tüm kuyucuklara 50 µl eklendi.

Reaksiyon sonucunda oluşacak renklenmeye göre 570 nm'de absorbans ölçüldü (Van Asperen, 1962).

#### **3.4.4.2. Bireysel Protein Miktarının Belirlenmesi**

Bireyde bulunan protein miktarı genel esteraz aktivitesi hesaplamalarında kullanılacağı için ayrıca standart protein ölçümleri de yapılmıştır. Çalışılan tüm populasyonlarda ayrı ayrı bireysel protein miktarları saptandı. Standart protein olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanıldı. 96 kuyucuklu mikropate'in ilk iki sırasına 1'den 12 µl'ye kadar değişen konsantrasyonlarda 1 mg/ml olarak hazırlanmış BSA konuldu. İlgili populasyonun her bireyinden iki tekrar olacak şekilde 10 µl konuldu. Ardından 300 µl Bradford reagent (ajan) eklenerek 5 dakika sonunda spektrofotometrede 595 nm'de verdikleri absorbans kaydedildi (Bradford, 1976).

#### **3.4.4.3. Asetilkolinesteraz Aktivitesinin Belirlenmesi**

Asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi, substrat olarak konulan asetiltiokolin iodür çözeltisinin bireyin asetilkolinesteraz enzimi ile tiyokolin ve asetat bileşiklerine ayrılıp, daha sonra ilave edilen dithiobisnitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girişiyle elde edilen sarı rengin absorbansının ölçümüne bakılarak yapılmaktadır. Buna göre, hazırlanan enzim kaynağından 25 µl alınarak iki tekrarlı olmak üzere mikropate'e konuldu. Her kuyucuğa 145 µl %1'lik triton-X içeren fosfat tamponu eklendi. Ardından 0,008g DTNB (5,5 Di-thio-bis 2-Nitrobenzoic acid) 0,1 M 2ml fosfat tamponunda pH 7.0 çözülürerek tüm örneklerle 10 µl ilave edildi. Substrat olarak kullanılacak olan Asetilthiokolin iodid 0,023g tartılıp 5 ml distile su içerisinde çözüldü. Başka bir tüp içerisine bu çözeltinin yarısı alınarak, inhibitör olarak 5 µl 0.01M karbamatlı bir insektisit olan "analitik grade propoxur" ilave edildi. Kuyucuklardaki örneklerin birinci tekrarına propoxursuz olarak hazırlanan asetilthiokolin iodid çözeltisi 25 µl eklenip, diğer tekrara inhibitör içeren çözelti yine 25 µl olarak ilave edildi. Kinetik ölçümler 405 nm'de, 6 dakika 51 saniye olarak yapıldı (Ellman et al., 1961).

### 3.5. İstatistiksel Değerlendirmeler

Malathion direnç testlerinden elde edilen verilerin analizi Finney's Probit istatistik programı ile yapıldı (Finney, 1962). Sürekli ölçümlü verilerin dağılımının normal dağılım varsayımına uygun olup olmadığı SPSS (Statistical Package for Social Science) 11.5 paket programı kullanılarak Shapiro Wilk testi ile araştırıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli ölçümlü değişkenler için ortalama  $\pm$  standart sapma biçiminde, kategorik değişkenler içinse gözlem sayısı yüzde (%) şeklinde gösterildi. Populasyon grupları arasında enzim aktivite göstergeleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı farkın olup olmadığı yine aynı program dahilinde Kruskal Wallis analizi ile değerlendirildi. Kruskal Wallis analizi sonucunun anlamlı görüldüğü yerlerde farka neden olan grupları belirlemek amacıyla Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Olası tüm grup içi ve ikili karşılaştırmalarda sonuçlar Bonferroni Düzeltmesine göre sunulurken  $p < 0,05$  için tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Populasyonlardaki Est 6 alel sıklıkları, Arlequin 3.1 version (Schneider et al., 2000) kullanılarak maksimum likelihood sıklıklar şeklinde hesaplandı. Populasyonlardaki Hardy Weinberg dengesi, yine belirtilen program bünyesinde yer alan Bayesian hesaplama tekniği ile saptandı. Her bir populasyonun eşey grupları içerisinde Hardy Weinberg dengesinin sağlanıp sağlanmadığı kontrol edildi. Populasyon içerisinde dişi ve erkek bireylerde saptanan Est 6 alel sıklıkları bakımından farkın anlamsız olduğu populasyonlar belirlendi. Buna göre, dişi ve erkek arasında farkın anlamsız bulunduğu 6 populasyonda eşey karışık olarak F ve S alel sıklıkları saptandı. Bu populasyonlar ikili olarak karşılaştırılarak populasyonlar arası genetik uzaklık ( $F_{ST}$ ) değerleri bulundu ve Hardy Weinberg dengesi yönünden sınılandı. Sınımlar Arlequin 3.1. kullanılarak yapıldı (Schneider et al., 2000).

Ayrıca, populasyonlar arası genetik uzaklıklar ( $F_{ST}$ ), coğrafi uzaklık, direnç ölçen  $LC_{50}$  değerleri (seçilimi yapılmış –seçilimi yapılmamış populasyonlar) ve genel esterez aktivite farkları kullanılarak oluşturulan çeşitli matrisler arasında korelasyonlar Mantel testi ile saptandı (Mantel, 1967).

## 4. BULGULAR

İnsektisitlere direnç mekanizmalarının anlaşılması için, Türkiye'deki değişik yörelerden toplanan bazı *Drosophila melanogaster* doğal populasyonlarında, Malathion'a karşı direnç düzeyleri, genel estera ve asetilkolinesteraz aktiviteleri ölçülmüş, estera enzim allozimleri araştırılmış ve seçim yönünden incelenmiştir.

### 4.1. *D.melanogaster*'in Malathion Direnç Testleri (LC<sub>50</sub>) Bulguları

Populasyonların dişi ve erkeklerinin Malathion direnç testleri sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.1'de verilmiştir. Direnç düzeylerinin en az ve en fazla değerleri (minimum ve maksimum LC<sub>50</sub>) dişi ve erkek bireylerde ayrı ayrı Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3 üzerinde gösterilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre, en dirençli populasyonun Antakya-Merkez (3,850 µg/cm<sup>2</sup>), en duyarlı populasyonun Serik (1,050 µg/cm<sup>2</sup>) populasyonu olduğu görülmüştür. Diğer populasyonlar en dirençliden en duyarlıya doğru sırasıyla, Finike (3,187 µg/cm<sup>2</sup>), Çandarlı (2,992 µg/cm<sup>2</sup>), Dört Yol (2,917 µg/cm<sup>2</sup>), Erzin (2,640 µg/cm<sup>2</sup>), Ayvalık (2,034 µg/cm<sup>2</sup>), Kerpe (2,021 µg/cm<sup>2</sup>), İzmir (1,601 µg/cm<sup>2</sup>), Eskişehir (1,410 µg/cm<sup>2</sup>) ve Antalya (1,315 µg/cm<sup>2</sup>) populasyonları olarak saptanmıştır.

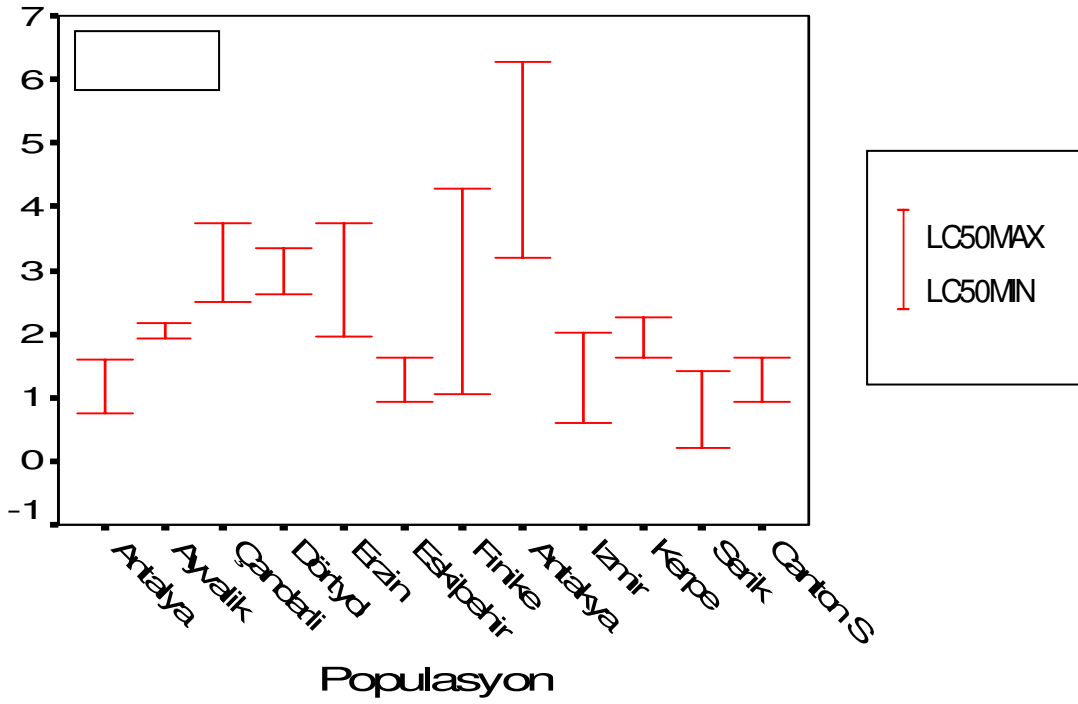
**Çizelge 4.1.** Populasyonların dişi ve erkek bireylerinin LC<sub>50</sub> direnç düzeyleri (µg/cm<sup>2</sup>)

No	Populasyon	LC <sub>50</sub> (%95 GA)	Eğim (±SH)	X <sup>2</sup>
1	Antalya ♀	1,315 (0,762-1,604)	4,68±1,230	7,045**
2	Antalya ♂	1,058 (0,000-1,426)	6,211±2,969	1,071
3	Ayvalık ♀	2,034 (1,916-2,160)	12,832±2,11	6,277*
4	Ayvalık ♂	1,161 (0,455-1,497)	4,567±1,411	2,520
5	Çandarlı ♀	2,992 (2,515-3,742)	3,478±1,102	4,914*
6	Çandarlı ♂	1,998 (1,850±2,133)	9,64±1,485	0,947
7	Dörtyol ♀	2,917 (2,615-3,354)	4,561±0,854	6,735**
8	Dörtyol ♂	2,154 (1,951±2,298)	11,46±2,33	1,967
9	Erzin ♀	2,640 (1,968-3,741)	2,09±0,760	0,678
10	Erzin ♂	1,874 (1,401-2,112)	2,979±1,887	0,790
11	Eskişehir ♀	1,410 (0,921-1,634)	6,927±1,980	5,400*
12	Eskişehir ♂	0,994 (0,742-1,334)	2,053±0,389	5,605*
13	Finike ♀	3,187 (1,040-4,286)	5,968±2,795	0,175
14	Finike ♂	2,397 (1,948-2,697)	8,746±2,377	1,304
15	Antakya ♀	3,850 (3,189-6,286)	3,118±0,926	3,311
16	Antakya ♂	2,458 (1,958-2,763)	10,936±3,232	1,469
17	İzmir ♀	1,601 (0,602-2,016)	4,236±1,418	2,918
18	İzmir ♂	1,922 (1,539-2,092)	11,243±3,163	0,363
19	Kerpe ♀	2,021 (1,621-2,251)	6,912±1,579	4,277*
20	Kerpe ♂	1,767 (1,430-1,995)	4,985±0,985	3,200
21	Serik ♀	1,050 (0,215-1,423)	4,598±1,644	1,318
22	Serik ♂	0,704 (0,00-0,00)	4,62±3,55	0,828
23	Canton S ♀	1,360 (0,938-1,616)	4,310±0,908	3,205
24	Canton S ♂	0,934 (0,763-1,071)	5,041±1,003	0,067

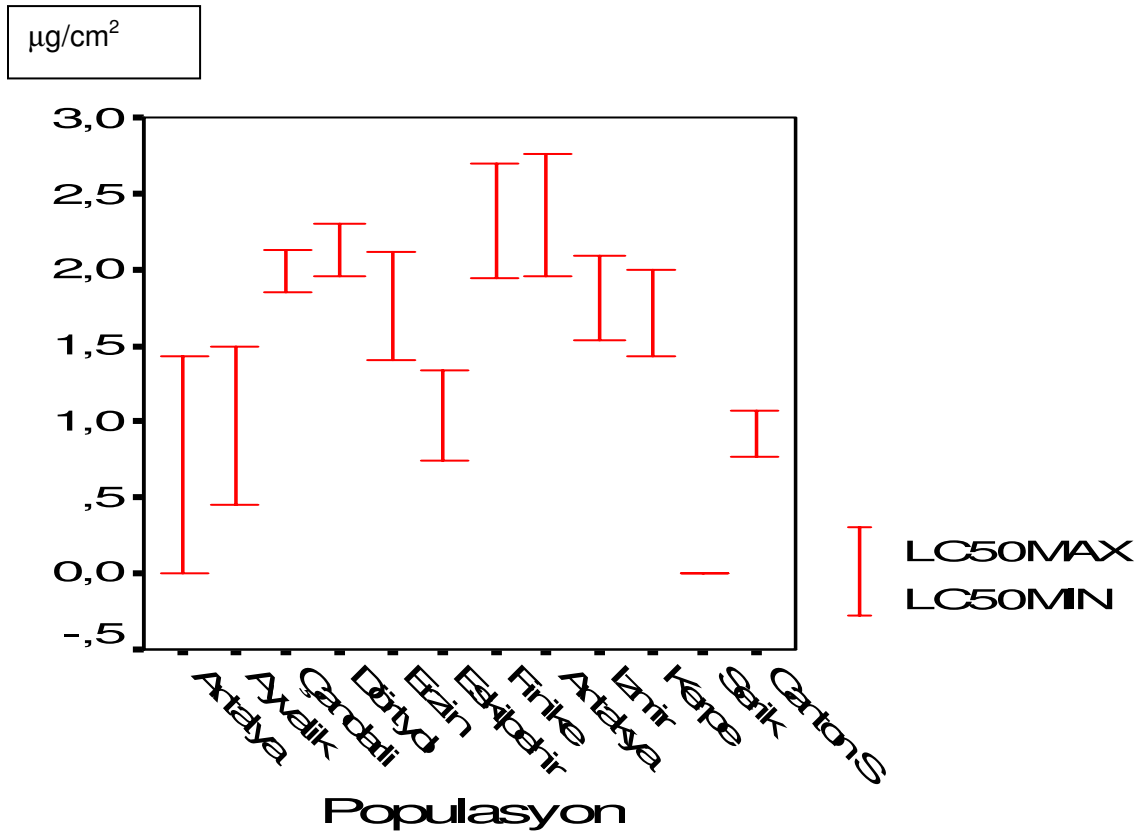
GA: güven aralığı, SH: Standart hata

Serbestlik derecesi: 1

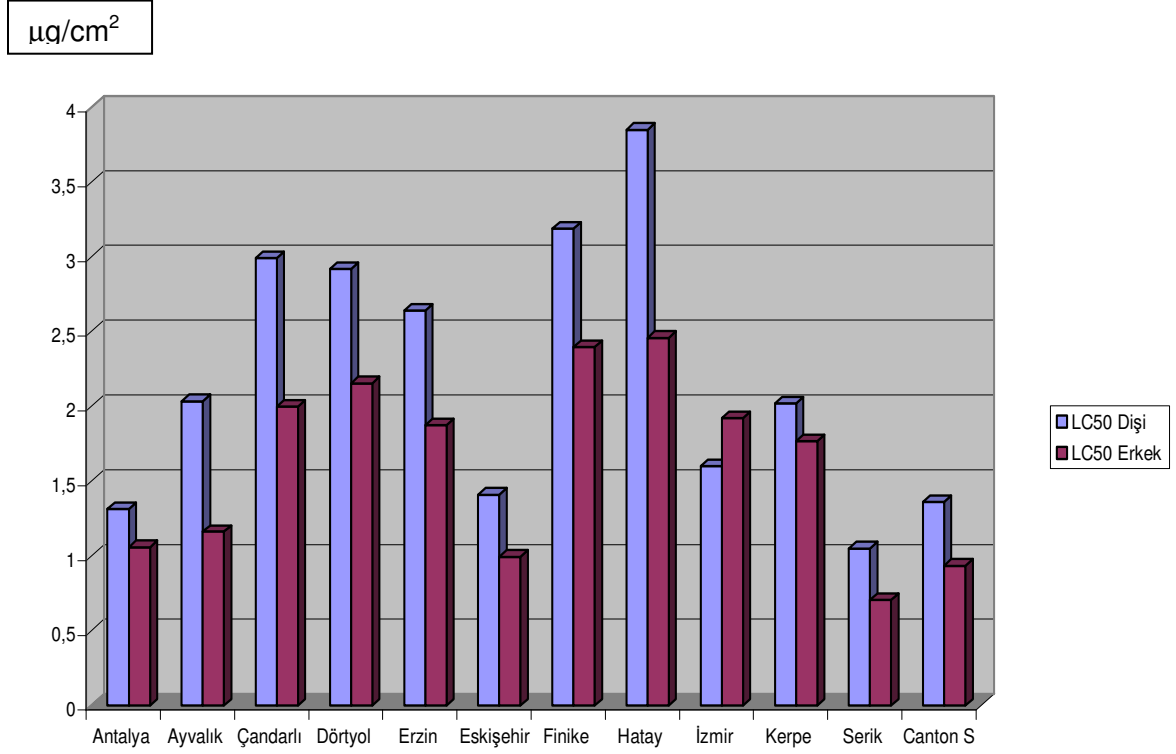
\*p<0,05 \*\*p<0,01



**Şekil 4.1** *D.melanogaster* doğal populasyonlarının dişi bireylerinin LC<sub>50</sub> değerleri (µg/cm<sup>2</sup>)



**Şekil 4.2.** *D.melanogaster* doğal populasyonlarının erkek bireylerinin LC<sub>50</sub> değerleri (µg/cm<sup>2</sup>)



**Şekil 4.3** *D.melanogaster* doğal populasyonlarının dişi ve erkek bireylerinin Malathion direnç düzeyleri ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , LC<sub>50</sub>)

## 4.2. Esteraz Allozimlerinin Populasyon Genetiği Bulguları

Arazi çalışmalarıyla elde edilen tüm doğal populasyonlar elektroforetik olarak incelenmiştir. Elektroforez kullanılarak tanımlaması yapılan esteraz lokusunda, iki alelli polimorfizm söz konusudur. Bu aleller *yavaş* (*Slow*, **S**) ve *hızlı* (*Fast*, **F**) şeklinde jeldeki yürüme hızları doğrultusunda adlandırılmıştır.

### 4.2.1. Populasyonların Genotipleme Sonuçları

Elektroforezde gözlenen bantların incelenmesinde Est 6'nın *hızlı* ve *yavaş* alellerinin heterozigot (FS) genotipine sahip olan 4016 numaralı stok kullanıldı ve elimizde bulunan doğal populasyonların jeldeki mobiliteleri ile karşılaştırılarak bantların *hızlı* (**F**), *yavaş* (**S**) veya heterozigot (**FS**) olup olmadığı anlaşıldı. Her populasyon için esteraz enzimi lokusunun genotipleme sonuçları ve incelenen toplam birey sayıları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.2.** *Drosophila melanogaster* doğal populasyonlarının elektroforez ile belirlenen genotipleme sonuçları ve incelenen toplam birey sayısı

Populasyon	Eşey	SS*	FF*	FS*	SS**	FF**	FS**	İncelenen toplam birey sayısı
ANTALYA	Dişi	0	16	19	1	22	36	<u>59</u>
	Erkek	1	6	17				
AYVALIK	Dişi	1	12	7	2	32	40	<u>74</u>
	Erkek	1	20	33				
ÇANDARLI	Dişi	5	12	3	18	36	34	<u>88</u>
	Erkek	13	24	31				
DÖRTYOL	Dişi	6	12	21	17	17	39	<u>73</u>
	Erkek	11	5	18				
ERZİN	Dişi	0	26	10	3	34	38	<u>75</u>
	Erkek	3	8	28				
ESKİŞEHİR	Dişi	8	21	11	17	34	29	<u>80</u>
	Erkek	9	13	18				
KERPE	Dişi	1	31	7	14	33	31	<u>78</u>
	Erkek	13	2	24				
İZMİR	Dişi	20	0	0	36	18	6	<u>60</u>
	Erkek	16	18	6				
ANTAKYA	Dişi	0	21	7	0	43	15	<u>58</u>
	Erkek	0	22	8				
SERİK	Dişi	3	22	13	12	26	33	<u>71</u>
	Erkek	9	4	20				

\*Aleller Yavaş (SS), Hızlı (FF) ve Heterozigot (FS) olarak gösterilmiştir.

\*\* Eşey karışık olarak tüm populasyonun genotipleme sonuçları

#### 4.2.2. Doğal Populasyonlarda Esteraz Lokusunun Alel Sıklıkları

Bir lokustaki en yaygın alele ait sıklık 0.95 ya da 0.99'u geçmediğinde o lokus polimorfik olarak adlandırılır (Ayala et al., 1972; Costa et al., 1982). Bu tanımlamaya göre İzmir populasyonu hariç tüm populasyonlar esteraz lokusu yönünden 0,95'lik en yüksek alel sıklığı tanımlamasına göre polimorfik olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). İzmir populasyonu yavaş (S) alelinde fikse olmuştur.



Çizelge 4.3'de verilen bilgilere göre, Erzin, Kerpe ve Serik populasyonları içerisinde dişi ve erkekler arasında alel sıklık dağılımı yönünden istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). Bu populasyonlarda erkeklere göre dişilerde F aleli daha sık görülürken, dişilere göre erkeklerde S aleli daha sık görülmektedir.

İzmir populasyonu içerisinde dişi ve erkekler arasında alel sıklık dağılımı yönünden istatistiksel fark anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). Bu populasyonda erkeklere göre dişilerde S aleli daha sık görülürken, dişilere göre erkeklerde F aleli daha sık görülmektedir. İzmir populasyonu dişi bireylerinde alel sıklığı bir (1,000) olarak bulunmuştur. Bu değer İzmir populasyonu dişilerinde, esteraz lokusunda sadece yavaş (S) aleli'nin bulunduğunu göstermektedir (Bir alelin sıklığının 1'e eşit olup başka alel bulunmama durumu).

Çizelge 4.3'de doğal populasyonlarda Est 6 enziminin alel sıklıklarının eşeyler arası karşılaştırması verilmiştir. Bu karşılaştırmalar Pearson Ki-Kare testi kullanılarak yapılmıştır. 10 farklı populasyon arasında dişi ve erkeklerin alel sıklıklarının incelendiği bu tabloda toplam 10 adet karşılaştırma yapılmıştır. Bu 10 karşılaştırmaya ilişkin Tip 1 hata düzeyi %40,1'e kadar çıkmaktadır. Gerçekte eşeyler arasında fark yokken test istatistiği sonucunda fark vardır derken yapılacak hata miktarının %40'lar civarında olması kabul edilemeyeceğinden ve çoklu karşılaştırma probleminden dolayı Tip 1 hatayı kontrol edebilmek için  $p < 0.005$  ise sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Ancak, yapılan bazı kıyaslamalarda test istatistiği sonucunda elde edilen P değerleri 0.001'den küçük bulunduğu için bu sonuçların gösterimi için notasyon olarak  $p < 0.001$  ifadesi kullanılmıştır. Çizelgede, P değeri 0.001'den küçük olarak bulunan populasyonlarda, P değerlerinin aynı zamanda 0.005'ten de küçük olması nedeniyle  $p < 0.001$  şeklinde gösterimde bulunmak uygun kabul edilmiştir. Dörtüol bölgesinde ise dişi ve erkekler arasında ortaya çıkan farklılık Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.005$ ). Çizelge 4.3'de görülen populasyonların dişi ve erkek bireylerinin ayrı ayrı hesaplanmış olan sıklık değerleri karşılaştırılarak sonuçlar aynı tabloda belirtilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Doğal populasyonlarda Est 6 enziminin alel sıklıkları ve eşeyler arası karşılaştırma

Populasyon	Eşey	Alel mobilitesi	Alel sıklığı	P değeri <sup>a</sup>
ANTALYA	Dişi (♀)	S	0,271	0,155
		F	0,729	
AYVALIK	Erkek (♂)	S	0,396	
		F	0,604	
ÇANDARLI	Dişi (♀)	S	0,225	0,242
		F	0,775	
DÖRTYOL	Erkek (♂)	S	0,324	
		F	0,676	
ERZİN	Dişi (♀)	S	0,325	0,285
		F	0,675	
ESKİŞEHİR	Erkek (♂)	S	0,419	
		F	0,581	
KERPE	Dişi (♀)	S	0,423	0,046 <sup>b</sup>
		F	0,577	
İZMİR	Erkek (♂)	S	0,588	
		F	0,412	
ANTAKYA	Dişi (♀)	S	0,139	<0,001
		F	0,861	
SERİK	Erkek (♂)	S	0,436	
		F	0,564	
ANTAKYA	Dişi (♀)	S	0,338	0,145
		F	0,663	
SERİK	Erkek (♂)	S	0,450	
		F	0,550	
ANTAKYA	Dişi (♀)	S	0,115	<0,001
		F	0,885	
SERİK	Erkek (♂)	S	0,641	
		F	0,359	
SERİK	Dişi (♀)	S	1,000	<0,001
		F	0	
SERİK	Erkek (♂)	S	0,475	
		F	0,525	
SERİK	Dişi (♀)	S	0,125	0,894
		F	0,875	
SERİK	Erkek (♂)	S	0,133	
		F	0,867	
SERİK	Dişi (♀)	S	0,250	<0,001
		F	0,750	
SERİK	Erkek (♂)	S	0,576	
		F	0,424	

F: Hızlı (*fast*); S: Yavaş (*slow*) a: Pearson Chi-Square test ( $p < 0.005$  ise anlamlı)

b: Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ( $p > 0.005$ ).

#### 4.2.3. Populasyon Çiftleri Arasındaki Genetik Uzaklıklar ( $F_{ST}$ Değerleri)

Populasyon çiftleri arasındaki genetik uzaklıkları hesaplamakta kullanılan  $F_{ST}$  (standardize gen sıklığı varyasyonu) değerleri, lokuslardaki genetik varyasyonu populasyonlar arasındaki genetik varyans olarak ifade eder (Hedrick, 2005). Genetik uzaklık ( $F_{ST}$ ) formülü farklı genlerin sıklık değişkenliğinin karşılaştırılması amacıyla kullanılır. Genel formülü  $F_{ST}=\delta^2_p/pxq$  olarak gösterilir. Formülde  $\delta^2_p$  gen sıklığının varyansını belirtirken p ve q ortalama alel sıklıklarını belirtir.

Populasyonların  $F_{ST}$  değerlerini bulmak amacıyla, dişi ve erkek bireylerinin ayrı ayrı hesaplanmış alel frekansları arasında anlamlı fark olan populasyonlar hariç tutularak diğer populasyonların genetik uzaklık değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen  $F_{ST}$  değerleri Çizelge 4.4'de görülmektedir. Bu değerlerde, Antakya populasyonu ile diğer populasyonlar arasında belirgin fark göze çarpmaktadır. Bunun yanında Dört Yol ile Ayvalık ve Antalya arasında, Çandarlı ile Ayvalık arasında belirgin uzaklık gözlenmiştir. Antakya diğer tüm populasyonlardan daha dirençli olup diğer tüm populasyonların genetik uzaklıklarından anlamlı ölçüde farklı bulunmuştur. Dört Yol populasyonu, Antakya'dan sonra ikinci dirençli populasyondur. Dört Yol, Antalya ile Ayvalık gibi duyarlı populasyonlara göre anlamlı derecede farklı  $F_{ST}$  değerleri vermiştir. Yine Çandarlı, Dört Yol'dan sonra üçüncü dirençli populasyondur ve  $F_{ST}$  değerleri bakımından Ayvalık'dan anlamlı derecede farklı bulunmuştur (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.4.** Populasyonların sıklıklarının çiftler halinde karşılaştırılması ve populasyonlar arası genetik uzaklıklar ( $F_{ST}$  Değerleri)

No	Populasyon	Antalya	Ayvalık	Çandarlı	Dört Yol	Eskişehir	Antakya
1	Antalya	0.00000					
2	Ayvalık	-0.00623	0.00000				
3	Çandarlı	0.01256	0.02521	0.00000			
4	Dört Yol	0.05569	0.07594	0.00698	0.00000		
5	Eskişehir	0.00372	0.01390	0.00478	0.01616	0.00000	
6	Antakya	0.09291	0.07095	0.17403	0.26074	0.15217	0.00000

**Çizelge 4.5.** Populasyonların  $F_{ST}$  değerlerinin ikili karşılaştırıldığında elde edilen P değerleri

Populasyon	Antalya	Ayvalık	Çandarlı	Dört Yol	Eskişehir	Antakya
Antalya	-					
Ayvalık	0.59±0.028	-				
Çandarlı	0.117±0.03	0.045±0.02*	-			
Dört Yol	0.0±0.0*	0.0±0.0*	0.16±0.026	-		
Eskişehir	0.21±0.043	0.108±0.026	0.76±0.045	0.09±0.03	-	
Antakya	0.0±0.0*	0.0±0.0*	0.0±0.0*	0.0±0.0*	0.0±0.0*	-

\*  $P < 0,05$  düzeyinde anlamlıdır.

#### 4.2.4. Doğal Populasyonlarda Hardy-Weinberg Dengesinin Belirlenmesi

Populasyonların genotipleme sonuçlarının alel sıklıkları hesaplanarak Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadıklarının anlaşılabilmesi için Arlequin 3.1 uygulanmış ve her populasyon için Hardy-Weinberg dengesinden olan sapmanın istatistiksel önem derecesi hesaplanmıştır (Çizelge 4.6).

Hardy-Weinberg ilkesine göre dengede olan bir populasyonda değişmezlik vardır. Fakat populasyonlardaki alel sıklığı genelde sabit kalmaz ve zamanla gen sıklıkları değişir. Denge için gerekli olan koşullardan biri alel sıklıklarının populasyon içindeki dişi ve erkek bireylerde aynı olmasıdır (Hedrick, 2005, Bozcuk, 2005).

Çizelge 4.3'de dişi ve erkek ayrı ayrı olarak hesaplanmış alel sıklıkları uygun populasyonlarda eşey karışık olarak yeniden hesaplanarak Hardy-Weinberg dengesi sınanmıştır (Çizelge 4.6). Buna göre, Çandarlı, Dört Yol ve Antakya populasyonlarının dengede olduğu belirlenmiştir.

Dört Yol populasyonu haricinde tüm populasyonlarda eşey karışık Est 6 allozim sıklıkları elde edilmiş ve F aleli sıklığı daha yüksek olarak saptanmıştır. Dört Yol populasyonunda ise S ve F tam olarak aynı sıklık değerini vermektedir (0,5). Buna göre, populasyonlarda F alelinin daha yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir.

**Çizelge 4.6.** Populasyonlar için belirlenen genotipleme sonuçları, alel sıklıkları ve Hardy-Weinberg testi sonuçları

Populasyon	SS <sup>a</sup>	FF <sup>a</sup>	FS <sup>a</sup>	S alel sıklığı	F alel sıklığı	İncelenen toplam birey sayısı	Hardy Weinberg P değeri
Antalya	1	22	36	0,322	0,678	<u>59</u>	0,002**
Ayvalık	2	32	40	0,2972	0,703	<u>74</u>	0,0136*
Çandarlı	18	36	34	0,419	0,581	<u>88</u>	<b>0,1895</b>
Dört Yol	17	17	39	0,50	0,50	<u>73</u>	<b>0,648</b>
Eskişehir	17	34	29	0,393	0,606	<u>80</u>	0,0343*
Antakya	0	43	15	0,129	0,871	<u>58</u>	<b>0,577</b>

<sup>a</sup>Aleller yavaş (*SS*), hızlı (*FF*) ve heterozigot (*FS*) olarak gösterilmiştir.

\*P<0,05 Hardy Weinberg dengesinde değildir.

\* \*P<0,01 Hardy Weinberg dengesinde değildir (Arlequin programı kullanılmıştır).

### 4.3. Seçilim Deneylerinin Bulguları

Seçilim deneylerinin pilot uygulamalarında uygulama yapılan bireyler oldukça hassas doz ayarlamaları yapılmasını gerektirecek ölçüde hızlı öldüler. Deneyin daha sonrasındaki günlerinde de ölümler devam etti. Bu nedenle seçilime öncelikle her populasyona kendi LC<sub>50</sub> dozundan yüksek olan dozlar uygulanarak başlanmıştır.

#### 4.3.1. Seçilimi Yapılmış Populasyonlarda Direnç Düzeyleri

Dirençli bireylerin seçiliminde her bireyin LC<sub>50</sub> değerinden daha yüksek olan dozların uygulanmasından sağ kalan bireyler besiyerine alınarak yetiştirildi. Her aşamada sağ kalan bireyler bir sonraki yüksek doz ile muamele edildi. Elde edilen yavrular beş nesil boyunca 0,8 aralıklı, stabil dozlar kullanılarak seçildi. F5'e kadar üretildikten sonra dirençli bireyler -80 °C'de dondurularak elektroforez yapmak amacıyla saklandı. Çizelge 4.7'de ilk uygulamadan son uygulamaya kadar verilen dozlar görülmektedir.

**Çizelge 4.7.** Seçilim süresince uygulanan Malathion dozları

Populasyon	Uygulanan Doz Değerleri (µg/cm <sup>2</sup> )				
	F1	F2	F3	F4	F5
<b>P</b>					
<b>Antalya</b>	1,64	2,05	2,56	3,2	4
<b>Ayvalık</b>	1,64	2,05	2,56	3,2	4
<b>Çandarlı</b>	2,05	2,56	3,2	4	5
<b>Dörtyol</b>	2,56	3,2	4	5	6,25
<b>Erzin</b>	2,05	2,56	3,2	4	5
<b>Eskişehir</b>	1,64	2,05	2,56	3,2	4
<b>Kerpe</b>	2,05	2,56	3,2	4	5
<b>İzmir</b>	2,05	2,56	3,2	4	5
<b>Antakya</b>	2,56	3,2	4	5	6,25
<b>Serik</b>	1,31	1,64	2,05	2,56	3,2

Seçilim deneyleri beş nesil sürdürülmüştür. Son olarak elde edilen populasyonların direnç düzeyleri Çizelge 4.8'de görülmektedir. Buna göre en dirençli populasyon 5,653 µg/cm<sup>2</sup> direnç düzeyi ile Antakya olarak görünmektedir. En dirençsiz populasyon da 1,811 µg/cm<sup>2</sup> direnç düzeyi ile Serik olarak göze çarpmaktadır. Diğer populasyonlar en dirençliden en duyarlıya doğru sırasıyla, Dörtyol (5,252 µg/cm<sup>2</sup>), Çandarlı (4,211 µg/cm<sup>2</sup>), Antalya (3,632 µg/cm<sup>2</sup>), Ayvalık (3,501 µg/cm<sup>2</sup>), İzmir (3,319 µg/cm<sup>2</sup>), Erzin (3,305 µg/cm<sup>2</sup>), Kerpe (3,184 µg/cm<sup>2</sup>) ve Eskişehir (2,959 µg/cm<sup>2</sup>) populasyonları olarak saptanmıştır.

**Çizelge 4.8.** Seçilim sonucunda populasyonlarda ölçülen LC<sub>50</sub> direnç düzeyleri (µg/cm<sup>2</sup>)

No	Populasyon	LC <sub>50</sub> (%95 GA)	Eğim (±SH)	X <sup>2</sup>
1	Antalya ♀	3,632 (3,333-3,880)	10,414±2,11	2,507
2	Antalya ♂	3,461 (3,155-3,689)	11,305±2,35	2,912
3	Ayvalık ♀	3,501 (3,222-3,720)	11,92±2,39	2,56
4	Ayvalık ♂	3,329 (2,963-3,566)	10,87±2,44	2,094
5	Çandarlı ♀	4,211 (3,719-5,063)	5,44±1,76	0,063
6	Çandarlı ♂	3,832 (3,404-4,215)	7,02±1,82	0,067
7	Dört Yol ♀	5,252 (4,927-5,644)	10,98±2,089	0,012
8	Dört Yol ♂	4,878 (4,567-5,192)	11,56±2,11	0,056
9	Erzin ♀	3,305 (2,776-3,603)	8,25±2,082	2,053
10	Erzin ♂	3,245 (2,762-3,519)	9,339±2,286	3,579
11	Eskişehir ♀	2,959 (2,738-3,155)	10,86±2,12	2,872
12	Eskişehir ♂	2,820 (2,593-3,000)	11,596±2,32	3,318
13	Antakya ♀	5,653 (5,226-6,245)	9,949±2,11	0,001
14	Antakya ♂	5,121 (4,775-5,521)	10,011±1,99	0,708
15	İzmir ♀	3,319 (2,879-3,800)	5,211±1,233	0,228
16	İzmir ♂	3,027 (2,697-3,338)	7,170±1,504	2,247
17	Kerpe ♀	3,184 (2,769-3,594)	5,633±1,283	0,005
18	Kerpe ♂	2,943 (2,546-3,275)	6,319±1,428	0,122
19	Serik ♀	1,811 (1,587-1,988)	7,537±1,71	0,020
20	Serik ♂	1,723 (1,464-1,896)	7,523±1,86	0,749

GA: güven aralığı, SH: Standart hata Serbestlik derecesi: 1

#### 4.3.2. Seçilimi Yapılmış Populasyonlarda Genotipleme Sonuçları

Elektroforezde gözlenen bantların seçilimi yapılmış populasyonlarda incelenmesinde Est 6'nın *hızlı* (fast) ve *yavaş* (slow) alellerinin heterozigot (FS) genotipine sahip olan 4016 numaralı stok kullanıldı ve seçilmiş populasyonların jeldeki mobiliteleri ile karşılaştırılarak bantların *hızlı*, *yavaş* veya heterozigot olup olmadığı araştırıldı. Söz konusu olan iki alelli polimorfizm (F ve S), bu alellerin jeldeki yürüme hızları doğrultusunda adlandırılmıştır.

Seçimli yapılmış populasyonlarda hesaplanan *Hızlı* (F) ve *Yavaş* (S) alel sıklıklarında herhangi bir değişim saptanmamıştır. Ayrıca bantlaşmalarda belirgin bir farklılığa rastlanmamıştır. Her populasyon için esteraz enzimi lokusunun genotipleme sonuçları ve incelenen toplam birey sayıları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

**Çizelge 4.9.** Seçilimi yapılmış *Drosophila melanogaster* doğal populasyonlarının genotipleme sonuçları

Populasyonlar	Eşey	SS*	FF*	FS*	İncelenen Toplam Birey Sayısı	
ANTALYA	Dişi (♀)	0	13	12	25	42
	Erkek (♂)	2	4	11	17	
AYVALIK	Dişi (♀)	0	10	5	15	49
	Erkek (♂)	1	12	21	34	
ÇANDARLI	Dişi (♀)	3	10	3	16	65
	Erkek (♂)	7	18	24	49	
DÖRTYOL	Dişi (♀)	5	7	14	26	50
	Erkek (♂)	8	4	12	24	
ERZİN	Dişi (♀)	0	18	8	26	53
	Erkek (♂)	1	6	20	27	
ESKİŞEHİR	Dişi (♀)	5	14	9	28	59
	Erkek (♂)	6	9	16	31	
KERPE	Dişi (♀)	2	22	6	30	57
	Erkek (♂)	7	4	16	27	
İZMİR	Dişi (♀)	14	0	0	14	42
	Erkek (♂)	11	13	4	28	
ANTAKYA	Dişi (♀)	0	18	9	27	50
	Erkek (♂)	0	16	7	23	
SERİK	Dişi (♀)	2	15	11	28	53
	Erkek (♂)	6	6	15	25	

\*Aleller *Slow* (SS), *Fast* (FF) ve Heterozigot (FS) olarak gösterilmiştir.



### 4.3.3. Seçilimi Yapılmış Populasyonlarda Esteraz Lokusu Alel Sıklıkları

Genotipleme sonuçları kullanılarak seçilen tüm populasyonların alel sıklıkları hesaplanmıştır. Bir lokustaki en yaygın alele ait sıklık 0.95 ya da 0.99'u geçmediğinde o lokus polimorfik olarak adlandırılır (Ayala et al., 1972; Costa et al., 1982). Buna göre, seçilimi yapılmış populasyonlarda İzmir populasyonu hariç tüm populasyonlar esteraz lokusu yönünden 0,95'lik en yüksek alel sıklığı tanımlamasına göre polimorfik olarak saptanmıştır. İzmir populasyonu yavaş (S) alelinde fikse olmuştur (Çizelge 4.10).

Elde edilen verilere göre, F aleli İzmir populasyonu hariç diğer tüm populasyonlarda erkeklere göre dişilerde daha sık görülürken, dişilere göre erkeklerde S aleli daha sık görülmektedir. **İzmir** populasyonu içerisinde dişi ve erkekler arasında alel sıklık dağılımı yönünden istatistiksel fark anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). Bu populasyonda erkeklere göre dişilerde S aleli daha sık görülürken, dişilere göre erkeklerde F aleli daha sık görülmektedir. Bu değer İzmir populasyonu dişilerinde, esteraz lokusunda sadece yavaş (S) aleli'nin bulunduğunu göstermektedir (Bir alelin sıklığının 1'e eşit olup başka alel bulunmama durumu).

**Çizelge 4.10.** Seçilimi yapılmış *Drosophila melanogaster* doğal populasyonlarının alel sıklıkları

Populasyon	Eşey	Alel mobilitesi	Alel sıklığı
ANTALYA	Dişi (♀)	S	0,240
		F	0,760
	Erkek (♂)	S	0,441
		F	0,558
AYVALIK	Dişi (♀)	S	0,167
		F	0,833
	Erkek (♂)	S	0,338
		F	0,662
ÇANDARLI	Dişi (♀)	S	0,281
		F	0,719
	Erkek (♂)	S	0,388
		F	0,612
DÖRTYOL	Dişi (♀)	S	0,461
		F	0,539
	Erkek (♂)	S	0,583
		F	0,417
ERZİN	Dişi (♀)	S	0,154
		F	0,846
	Erkek (♂)	S	0,407
		F	0,593
ESKİŞEHİR	Dişi (♀)	S	0,339
		F	0,661
	Erkek (♂)	S	0,452
		F	0,548
KERPE	Dişi (♀)	S	0,167
		F	0,833
	Erkek (♂)	S	0,556
		F	0,444
İZMİR	Dişi (♀)	S	1,000
		F	0
	Erkek (♂)	S	0,464
		F	0,536
ANTAKYA	Dişi (♀)	S	0,167
		F	0,833
	Erkek (♂)	S	0,152
		F	0,848
SERİK	Dişi (♀)	S	0,268
		F	0,732
	Erkek (♂)	S	0,540
		F	0,460

F: Hızlı (*fast*); S: Yavaş (*slow*)

#### 4.3.4. Seçilimi Yapılmış Populasyon Çiftleri Arasında Genetik Uzaklıklar ( $F_{ST}$ ) Değerleri

Populasyon çiftleri arasındaki genetik uzaklıkları hesaplamakta kullanılan  $F_{ST}$  (standardize gen sıklığı varyasyonu) değerleri, lokuslardaki genetik varyasyonu populasyonlar arasındaki genetik varyans olarak ifade eder (Hedrick, 2005). Genetik uzaklık ( $F_{ST}$ ) formülü farklı genlerin sıklık değişkenliğinin karşılaştırılması amacıyla kullanılır.

Populasyonların  $F_{ST}$  değerlerini bulmak amacıyla, dişi ve erkek bireylerinin ayrı ayrı hesaplanmış alel frekansları arasında anlamlı fark olan populasyonlar hariç tutularak diğer populasyonların genetik uzaklık değerleri Arlequin programı kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.11).

Sonuçta, Antakya populasyonu ile diğer populasyonlar arasında belirgin fark göze çarpmaktadır. Antakya diğer tüm populasyonlardan daha dirençli olup diğer tüm populasyonların genetik uzaklıklarından anlamlı ölçüde farklı bulunmuştur. Dört Yol populasyonu, Antakya'dan sonra ikinci dirençli populasyondur. Dört Yol ile Ayvalık, Antalya ve Çandarlı arasında belirgin uzaklık gözlenmiştir (Çizelge 4.12).

**Çizelge 4.11.** Dirençli olarak seçilmiş populasyonların sıklıklarının çiftler halinde karşılaştırılması ve populasyonlar arası genetik uzaklıklar ( $F_{ST}$  Değerleri)

No	Populasyon	Antalya	Ayvalık	Çandarlı	Dört Yol	Eskişehir	Antakya
1	Antalya	0,000					
2	Ayvalık	-0,00812	0,000				
3	Çandarlı	-0,00631	0,00403	0,000			
4	Dört Yol	0,06712	0,09873	0,04144	0,000		
5	Eskişehir	0,00249	0,01841	-0,00526	0,02038	0,000	
6	Antakya	0,05989	0,03495	0,08903	0,24478	0,12109	0,000

**Çizelge 4.12.** Seçilimi yapılan populasyonların  $F_{ST}$  değerlerinin ikili karşılaştırıldığında elde edilen P değerleri

<b>Populasyon</b>	<b>Antalya</b>	<b>Ayvalık</b>	<b>Çandarlı</b>	<b>Dört Yol</b>	<b>Eskişehir</b>	<b>Antakya</b>
<b>Antalya</b>	-					
<b>Ayvalık</b>	0.531±0.0478	-				
<b>Çandarlı</b>	0.559±0.0297	0.243±0.067	-			
<b>Dört Yol</b>	0.00±0.00*	0.009±0.009*	0.00±0.00*	-		
<b>Eskişehir</b>	0.288±0.050	0.099±0.032	0.658±0.056	0.108±0.035	-	
<b>Antakya</b>	0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	-

\* P<0,05 düzeyinde anlamlıdır.

#### 4.3.5. Seçilimi Yapılmış Populasyonlarda Hardy Weinberg Dengesi

Seçilimi yapılmış olan populasyonlarda dişi ve erkek ayrı ayrı hesaplanmış alel sıklıkları, dişi ve erkekler arasında anlamlı fark bulunmayan 6 populasyon için eşey karışık olarak yeniden hesaplanarak Hardy Weinberg dengesi sınanmıştır. Buna göre, tüm populasyonların dengede olduğu görülmüştür (Çizelge 4.13).

**Çizelge 4.13.** Seçilimi yapılmış olan populasyonların genotipleme sonuçları, alel sıklıkları ve Hardy-Weinberg testi sonuçları

Populasyon	SS <sup>a</sup>	FF <sup>a</sup>	FS <sup>a</sup>	S alel sıklığı	F alel sıklığı	İncelenen toplam birey sayısı	Hardy Weinberg P değeri*
Antalya	2	17	23	0,321	0,678	42	0,159
Ayvalık	1	22	26	0,285	0,714	49	0,0739
Çandarlı	10	28	27	0,362	0,638	65	0,426
Dört Yol	13	11	26	0,48	0,52	50	1,000
Eskişehir	11	23	25	0,398	0,601	59	0,415
Antakya	0	43	16	0,160	0,840	50	0,329

<sup>a</sup>Aleller yavaş (SS), hızlı (FF) ve heterozigot (FS) olarak gösterilmiştir.

(Arlequin programı kullanılmıştır) \*Tüm populasyonlar Hardy Weinberg dengesindedir ( $p > 0,05$ ).

#### 4.4. Biyokimyasal Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

*Drosophila*'da direnç mekanizmasını daha detaylı araştırmak için tek bir birey üzerinde çoklu enzim aktivitesi denemeleri yapılması gerekmektedir. Bu nedenle biyokimyasal çalışmalar tek bir bireyin genel esteraz ve asetilkolinesteraz aktiviteleri ve protein miktarları ölçülerek gerçekleştirilmiştir.

#### 4.4.1. Genel Esteraz Enzim Aktivitesinin (Non-spesifik) Sonuçları

Tüm populasyonlar genel esteraz enzim aktivitesi yönünden değerlendirilmiştir. Böceklerde spesifik enzim aktivitesinin hesaplanabilmesi için protein miktarlarının da bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla standart protein olarak Bovine Serum Albumin kullanılarak Bradford standart protein değerleri elde edilmiştir. Tüm populasyonlar için yapılan her deneyde ilgili bireye ait olan protein değerleri tek tek bulunmuştur. Bu değerlerin verdiği doğruya ait regresyon denklemi ve katsayısı bulundu ve bu değer non-spesifik esteraz enzimi aktivitesi hesaplarında kullanıldı. Bu ölçümler, incelenen tüm bireylerde iki tekrar olarak yapıldı. Alfa naftil asetat substrat olarak kullanıldığında elde edilen değerler Çizelge 4.14'de verilmektedir.

**Çizelge 4.14.** Populasyonların ortalama alfa naftol miktarları ve duyarlı stok ile karşılaştırılmasının istatistiksel anlam kontrolü

Populasyon	B.S.	Ortalama nmol alfa naphthol/min/mg Değerleri	S. S.	Duyarlı Canton S'e göre istatistiksel anlam kontrolü
Antakya	20	0,000213	0,000036	<0,001***
Serik	20	0,000173	0,000024	<0,001***
Antalya	12	0,000151	0,000021	0,015***
Erzin	12	0,000154	0,000016	0,006***
Eskişehir	24	0,000137	0,000030	0,119
Dörtüyl	24	0,000146	0,000049	0,079
Kerpe	36	0,000129	0,000044	0,120
Ayvalık	24	0,000125	0,000021	0,744
Çandarlı	24	0,000242	0,000415	0,002***
İzmir	24	0,000478	0,000606	0,053
Canton S*	24	0,000123	0,000010	-
4016**	24	0,000071	0,000020	<0,001***

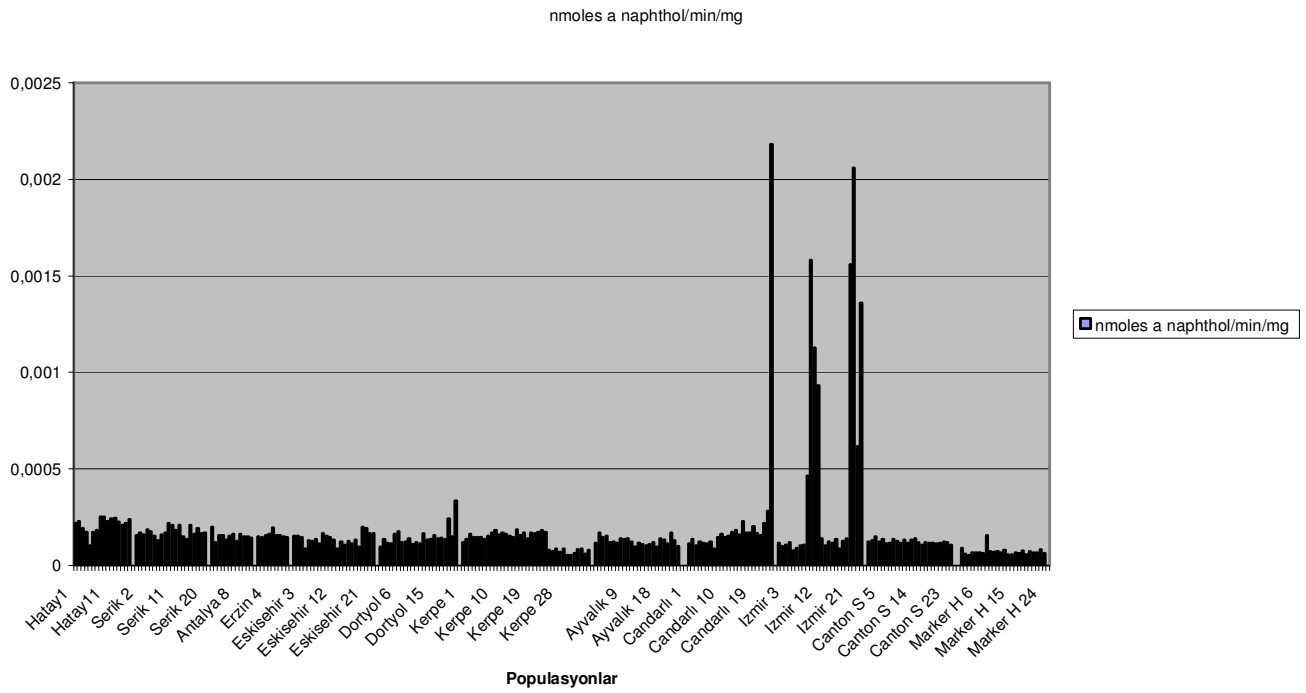
\*Organofosfatlara duyarlı stok

\*\*Est6 ve EstC yönünden heterozigot (fs genotipi) olan elektroforetik varyant stok \*\*\*Grup karşılaştırmalarında bulunan fark  $p < 0,001$  düzeyinde anlamlıdır. B.S. Birey Sayısı, S. S. Standart Sapma

Elde edilen veriler doğrultusunda, doğal populasyonlar ve organofosfatlı insektisitlere duyarlı stok olan Canton S'le karşılaştırılarak yapılan istatistiksel ölçümlerde, populasyonlar ile duyarlı Canton S arasında alfa naphthol düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( $p < 0,001$ ). Bu değerler incelendiğinde, Antakya, Serik, Antalya, Erzin ve Çandarlı populasyonlarının

duyarlı soya göre anlamlı derecede yüksek aktivite gösterdiği, 4016 numaralı soyun ise duyarlı soya göre anlamlı derecede düşük aktivite gösterdiği görülmektedir.

Enzim aktivitesi değerlerine göre çizilen grafikte de (Şekil 4.4), populasyonlardaki bireylerin (İzmir hariç) genelde homojen hale geldikleri ve benzer esteraz aktiviteleri gösterdikleri görülmektedir. İzmir populasyonunda ise dirençli ve dirençsiz bireylerin birlikte heterojen olarak bulunduğu dikkati çekmektedir.



**Şekil 4.4.** Populasyonların alfa naftil asetat substratına göre enzim aktivitesi (nmol alfa naphthol/min/mg)

Söz konusu farkın kaynağını saptamak amacıyla populasyonlar birbiriyle ikili olarak karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.15).

Bu karşılaştırma sonucunda; Antakya populasyonu, Serik hariç diğer tüm populasyonlara göre, Serik populasyonu, Eskişehir, Dört Yol, Kerpe, Ayvalık, İzmir ve marker soya (4016) göre, Antalya ve Erzin populasyonları, Ayvalık ve 4016 numaralı marker soya göre, Eskişehir, Kerpe, İzmir ve Dört Yol populasyonları, 4016 numaralı soya göre, Ayvalık populasyonu, Çandarlı ve 4016 numaralı soya göre anlamlı derecede farklı bulunmuştur. İkili karşılaştırmalar  $p < 0,05$  düzeyinde yapılmıştır.

**Çizelge 4.15.** Populasyonların alfa naftol ürün miktarlarına (nmol alfa naphthol/min/mg) göre birbirleriyle ikili olarak karşılaştırılması

Populasyon	B.S.	Ortalama nmol alfa naphthol/min/mg Değerleri	S. S.	Sadece Anlamlı Farklar *
Antakya	20	0,000213	0,000036	1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-12
Serik	20	0,000173	0,000024	2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-10, 2-12
Antalya	12	0,000151	0,000021	3-8, 3-12
Erzin	12	0,000154	0,000016	4-8, 4-12
Eskişehir	24	0,000137	0,000030	5-12
Dörttyol	24	0,000146	0,000049	6-12
Kerpe	36	0,000129	0,000044	7-12
Ayvalık	24	0,000125	0,000021	8-9, 8-12
Çandarlı	24	0,000242	0,000415	9-12
İzmir	24	0,000478	0,000606	10-12
Canton S**	24	0,000123	0,000010	11-12
4016***	24	0,000071	0,000020	-

\*\*\*Est6 ve EstC yönünden heterozigot (fs genotipi) olan elektroforetik varyant stok

\*\*Organofosfatlara duyarlı stok

\*p<0,05

B.S. Birey Sayısı, S. S. Standart Sapma

Beta naftil asetat substrat olarak kullanıldığında elde edilen değerler Çizelge 4.16'da verilmektedir. Enzim aktivitesi değerlerine göre çizilen grafikte, populasyonlardaki bireylerin (İzmir hariç) genelde homojen hale geldikleri ve benzer esterez aktiviteleri gösterdikleri görülmektedir (Şekil 4.5). Diğer tüm populasyonların genel esterez aktivitesi yönünden homojen oldukları söylenebilir.

**Çizelge 4.16.** Populasyonların ortalama beta naftol miktarları ve duyarlı stok ile karşılaştırmaları

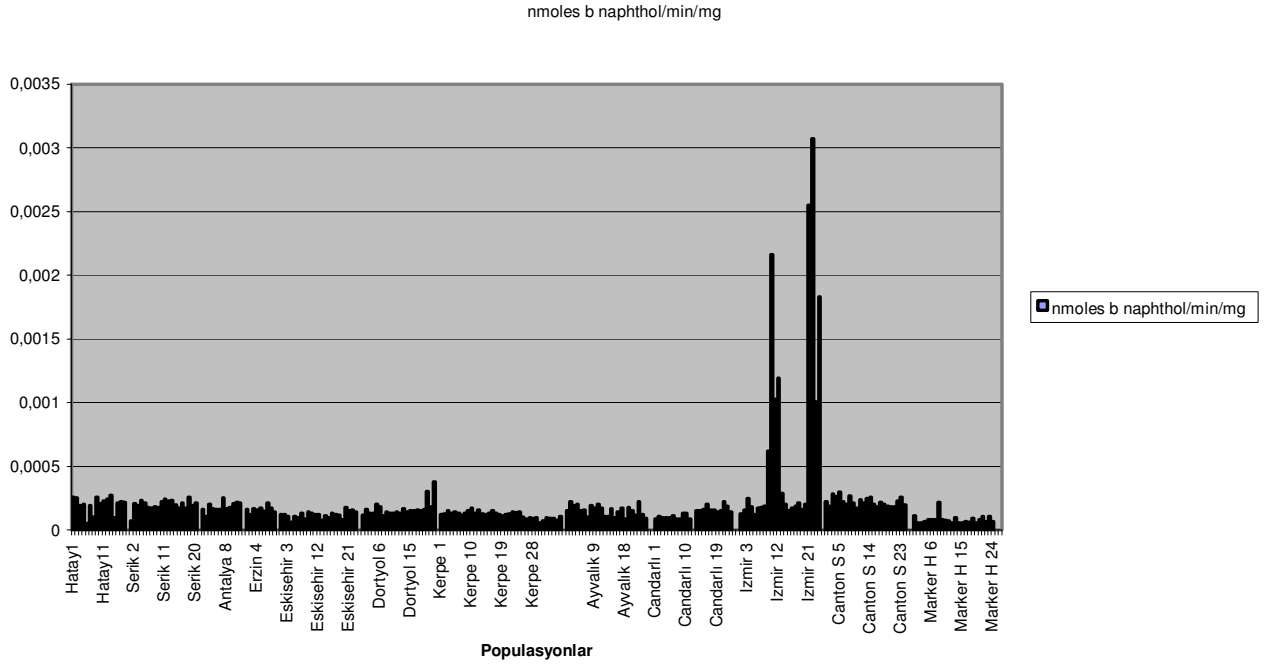
Populasyon	B.S.	Ortalama nmol beta naphthol/min/mg Değerleri	S. S.	Duyarlı Canton S'e göre istatistiksel anlam kontrolü
Antakya	20	0,000205	0,000058	0,358
Serik	20	0,000197	0,000039	0,293
Antalya	12	0,000182	0,000037	0,096
Erzin	12	0,000163	0,000022	0,011***
Eskişehir	24	0,000118	0,000026	<0,001***
Dörttyol	24	0,000165	0,000059	<0,001***
Kerpe	36	0,000118	0,000026	<0,001***
Ayvalık	24	0,000152	0,000041	<0,001***
Çandarlı	24	0,000121	0,000055	<0,001***
İzmir	24	0,000683	0,000864	0,473
Canton S*	24	0,000220	0,000035	-
4016**	24	0,000081	0,000034	<0,001***

\*Organofosfatlara duyarlı stok, B.S. Birey Sayısı, S. S. Standart Sapma

\*\*Est6 ve EstC yönünden heterozigot (fs genotipi) olan elektroforetik varyant stok

\*\*\*Grup karşılaştırmalarında bulunan fark p<0,001 düzeyinde anlamlıdır.





**Şekil 4.5.** Populasyonların beta naftil asetat substratına göre enzim aktivitesi (nmol beta naphthol/min/mg)

Duyarlı stok olan Canton S'le karşılaştırılarak yapılan ölçümlerde populasyonlar arasında beta naphthol düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ( $p < 0,001$ ). İlgili değerler Çizelge 4.16'da gösterilmiştir.

Söz konusu farkın kaynağını tespit etmek amacıyla populasyonlar birbiriyle ikili olarak karşılaştırıldı (Çizelge 4.17).

Bu karşılaştırma sonucunda,

Antakya ve Serik populasyonları Eskişehir, Dörtöl, Kerpe, Ayvalık Çandarlı ve 4016 numaralı populasyonlardan,

Antalya populasyonu, Eskişehir, Çandarlı ve 4016 numaralı marker stoktan, Erzin populasyonu, Eskişehir, Kerpe, Çandarlı, İzmir ve 4016 numaralı stoktan,

Eskişehir populasyonu, Dörtöl, Ayvalık, İzmir ve 4016 numaralı stoktan,

Dörtöl populasyonu, Kerpe, Çandarlı, İzmir ve 4016 numaralı stoktan,

Kerpe populasyonu, Ayvalık, İzmir ve 4016 numaralı stoktan,

Ayvalık ve Çandarlı populasyonları, İzmir ve 4016 numaralı stoktan,

anlamlı derecede farklı bulunmuştur. İkili olarak yapılan karşılaştırmalar  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlıdır.

**Çizelge 4.17.** Populasyonların beta naftol ürün miktarlarına (nmol beta naphthol/min/mg) göre birbirleriyle ikili olarak karşılaştırılması

Populasyon	B.S.	Ortalama nmol beta naphthol/min/mg Değerleri	S. S.	Sadece Anlamlı Farklar *
Antakya	20	0,000205	0,000058	1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-12
Serik	20	0,000197	0,000039	2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-12
Antalya	12	0,000182	0,000037	3-5, 3-7, 3-9, 3-12
Erzin	12	0,000163	0,000022	4-5, 4-7, 4-9, 4-10, 4-12
Eskişehir	24	0,000118	0,000026	5-6, 5-8, 5-10, 5-12
Dört Yol	24	0,000165	0,000059	6-7, 6-9, 6-10, 6-12
Kerpe	36	0,000118	0,000026	7-8, 7-10, 7-12
Ayvalık	24	0,000152	0,000041	8-10, 8-12
Çandarlı	24	0,000121	0,000055	9-10, 9-12
İzmir	24	0,000683	0,000864	10-12
Canton S**	24	0,000220	0,000035	11-12
4016***	24	0,000081	0,000034	-

B.S. Birey Sayısı, S. S. Standart Sapma

\*\*\*Est6 ve EstC yönünden heterozigot (fs genotipi) olan elektroforetik varyant stok

\*\*Organofosfatlara duyarlı stok, \*p<0,05

#### 4.4.2. Asetilkolinesteraz Aktivitesi Sonuçları

Tüm populasyonlarda asetilkolinesteraz aktivitesi ölçümleri yapıldı. Elde edilen örneklerin inhibisyon kinetiği saptandı. İncelenen tüm bireylerde asetilkolinesteraz aktivitesi iki tekrar olarak ölçüldü. Çizelge 4.18 ve Çizelge 4.19'da populasyonlara ilişkin asetilkolinesteraz direncini belirleyici değerler ve istatistik karşılaştırmalar yer almaktadır.

Populasyonların ortalama inhibisyon kinetiği değerleri, duyarlı soy Canton S ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.18). Canton S'in ortalama inhibisyon kinetiği değeri 37,91 olarak saptanmıştır. Antakya, Kerpe ve İzmir populasyonları duyarlı soya göre anlamlı derecede daha düşük inhibisyon kinetiği değerlerine sahiptir. Bu durum, bu populasyonların asetilkolinesteraz direnci bakımından duyarlı soya göre çok daha dirençli olduklarını gösterir. Eskişehir, Çandarlı ve 4016 numaralı soylar, duyarlı soydan daha yüksek inhibisyon kinetiği değerlerine sahiptir. Bu durum, asetilkolinesteraz direnci bakımından bu populasyonların, duyarlı soydan daha duyarlı olduklarını gösterir.

**Çizelge 4.18.** Populasyonların ortalama inhibisyon kinetiği değerleri ve duyarlı stok ile karşılaştırılmaları

Populasyon	B.S.	Ortalama inhibisyon kinetiği Değerleri (min-maks)	S. S.	Duyarlı Canton S'e göre istatistiksel anlam kontrolü
Antakya	20	19,97 (0-42,06)	12,73	0,002***
Serik	20	35,509 (9,96-157,11)	34,78	0,089
Antalya	12	33,27 (21,74-44,82)	6,72	0,451
Erzin	12	28,24 (0-57,4)	19,01	0,229
Eskişehir	24	46,62 (0-59,18)	14,38	0,049***
Dörtyol	24	44,52 (0-149,97)	26,18	0,333
Kerpe	12	25,81 (18,18-34,77)	4,97	0,035***
Ayvalık	24	48,32 (9,21-303,99)	56,37	0,875
Çandarlı	24	247,99 (0-674,96)	159,67	<0,001***
İzmir	24	14,53 (0-39,53)	12,13	<0,001***
Canton S*	24	<b>37,91</b> (16,66-65,38)	11,98	-
4016**	24	206,99 (0-2188,38)	519,81	<0,001***

\*Organofosfatlara duyarlı stok B.S. Birey Sayısı S. S. Standart Sapma

\*\*Est6 ve EstC yönünden heterozigot (fs genotipi) olan elektroforetik varyant stok

\*\*\*Grup karşılaştırmalarında bulunan fark  $p < 0,001$  düzeyinde anlamlıdır.

Asetilkolinesteraz inhibisyon kinetiği düzeyleri yönünden tüm populasyonlar, duyarlı stok olan Canton S'le karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmaya göre belirlenen farklılıkların tüm populasyonlar için anlamlı olduğu saptandı ( $p < 0,001$ ).

Söz konusu farkın kaynağını saptamak amacıyla populasyonlar birbiriyle ikili olarak karşılaştırıldı (Çizelge 4.19).

Bu karşılaştırma sonucunda:

Antakya populasyonu, Eskişehir, Dörtyol, Ayvalık, Çandarlı ve 4016 numaralı populasyonlardan,

Serik populasyonu, Eskişehir, Dörtyol ve İzmir populasyonlarından,

Antalya ve Erzin populasyonları, Eskişehir, Çandarlı ve İzmir populasyonlarından,

Eskişehir populasyonu, Kerpe, Çandarlı, İzmir ve 4016 numaralı populasyonlardan,

Dörtyol populasyonu, Kerpe Çandarlı ve İzmir populasyonlarından,

Kerpe populasyonu, Ayvalık ve Çandarlı populasyonlarından,

Ayvalık populasyonu, Çandarlı ve İzmir populasyonlarından,

Çandarlı populasyonu, İzmir ve 4016 numaralı populasyonlardan,

İzmir populasyonu, 4016 numaralı populasyonundan, anlamlı derecede farklı bulundu.

**Çizelge 4.19.** Populasyonların inhibisyon kinetiği düzeyleri yönünden birbirleriyle ikili olarak karşılaştırılması

Populasyon	B.S.	Ortalama inhibisyon kinetiği değerleri	S. S.	Sadece Anlamlı Farklar *
Antakya	20	19,97 (0-42,06)	12,73	1-5, 1-6,1-8, 1-9, 1-12
Serik	20	35,509 (9,96-157,11)	34,78	2-5, 2-6, 2-9, 2-10
Antalya	12	33,27 (21,74-44,82)	6,72	3-5, 3-9, 3-10
Erzin	12	28,24 (0-57,4)	19,01	4-5, 4-9, 4-10
Eskişehir	24	46,62 (0-59,18)	14,38	5-7, 5-9, 5-10, 5-12
Dörtyol	24	44,52 (0-149,97)	26,18	6-7, 6-9, 6-10
Kerpe	12	25,81 (18,18-34,77)	4,97	7-8, 7-9
Ayvalık	24	48,32 (9,21-303,99)	56,37	8-9, 8-10
Çandarlı	24	247,99 (0-674,96)	159,67	9-10, 9-12
İzmir	24	14,53 (0-39,53)	12,13	10-12
Canton S**	24	<b>37,91</b> (16,66-65,38)	11,98	11-12
4016***	24	206,99 (0-2188,38)	519,81	-

B.S. Birey Sayısı, S. S. Standart Sapma, \* $p < 0,05$

\*\*Organofosfatlara duyarlı stok

\*\*\*Est6 ve EstC yönünden heterozigot (fs genotipi) olan elektroforetik varyant stok

#### 4.5. Mantel Testi Değerlendirme Sonuçları

##### 4.5.1. Populasyonlar Arası Genetik Uzaklıklar ile Coğrafi Konumlarının Korelasyonu

Populasyonlar arası genetik uzaklıklar ile coğrafi konum arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığını araştırmak amacıyla daha önce Arlequin programı ile hesaplanmış olan  $F_{ST}$  değerleri ile populasyonların birbirlerine olan coğrafi uzaklık değerlerinin matrisleri oluşturularak Mantel testi yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle tüm populasyonların ikili olarak enlem ve boylam değerleri Geografic Distance Matrix Generator programı kullanılarak desimal değerlere çevrilmiştir. Ardından, bu değerlerin ikili olarak farkları hesaplanarak bir matris elde edilmiştir (Çizelge 4.20).

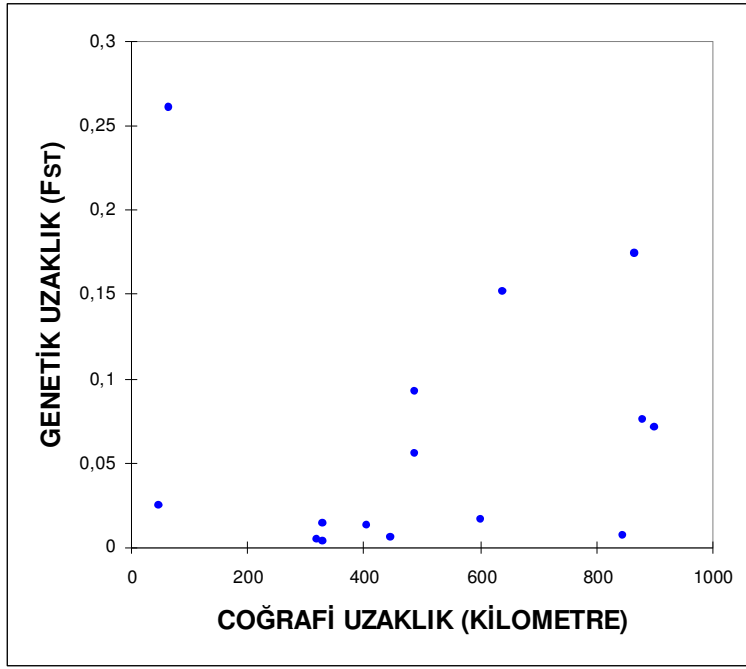
Elde edilen genetik uzaklık ( $F_{ST}$ ) ve coğrafi uzaklık matrisleri, Microsoft Excel programına eklenen bir program olan XLSTAT kullanılarak Mantel testi ile karşılaştırılmıştır. Genetik uzaklık ile coğrafik uzaklık matrislerinin ilişkilene düzeyini gösteren grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.6). Karşılaştırma sonucunda, düşük korelasyon katsayısı ( $r=0,015$ ,  $p=0,948$ ) bulunması, genetik uzaklık ile

coğrafi uzaklık arasında korelasyon bulunmadığını göstermektedir (Şekil 4.7). Bu sonuç, Est-6 lokusundaki alellerin sıklıklarının genetik sürüklenmeyi öngören Uzaklıkla Yalıtım (Isolation by distance) modeline uymadığını göstermektedir.

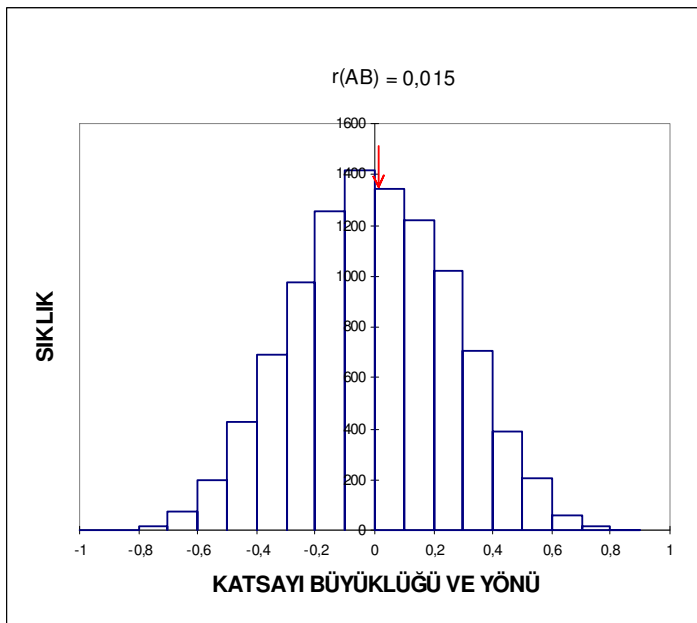
Antalya ( $p=0,002$ ), Ayvalık ( $p=0,0136$ ) ve Eskişehir ( $p=0,0343$ ) popülasyonlarında Hardy Weinberg dengesinden olan sapmalar Çizelge 4.6'da (Sayfa 38) gösterilmiştir. Bu popülasyonlardan Antalya ve Ayvalık popülasyonlarında gözlenen heterozigotluk beklenen heterozigotluktan yüksek olarak saptanmıştır. Eskişehir popülasyonunda beklenen heterozigotluk gözlenen heterozigotluktan daha yüksek bulunmuştur. Bu durumda Antalya ve Ayvalık popülasyonlarında gözlenen Hardy Weinberg dengesinden sapma, örneklem hatasından kaynaklanabilir.

**Çizelge 4.20.** Popülasyonların coğrafi uzaklıklarının (enlem ve boylam) matrisi (Kilometre)

Popülasyon	Antalya	Ayvalık	Çandarlı	Dört Yol	Eskişehir	Antakya
Antalya	0	448,37	405,25	486,86	331	489,37
Ayvalık	448,37	0	48,13	878,41	330,77	900,78
Çandarlı	405,25	48,13	0	845,65	319,5	865,54
Dört Yol	486,86	878,41	845,65	0	600,34	66,94
Eskişehir	331	330,77	319,5	600,34	0	638,05
Antakya	489,37	900,78	865,54	66,94	638,05	0



**Şekil 4.6.**  $F_{ST}$  ve coğrafi uzaklık matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafik ( $p=0,948$ )



**Şekil 4.7.**  $F_{ST}$  ve coğrafi uzaklık arasında yapılan Mantel testinin temel alınan korelasyon katsayıları

#### 4.5.2. Populasyonların Direnç Düzeyleri (LC<sub>50</sub>) ile Coğrafi Konumlarının Korelasyonu

*Drosophila melanogaster* populasyonlarının dişi ve erkek bireylerinde LC<sub>50</sub> direnç düzeylerinin matrisi oluşturularak coğrafi uzaklıkların matrisi ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.21, Çizelge 4.22). Matrisler Mantel testi ile karşılaştırılarak aralarındaki ilişkilene düzeyini gösteren grafikler oluşturulmuştur (Şekil 4.8, Şekil 4.10).

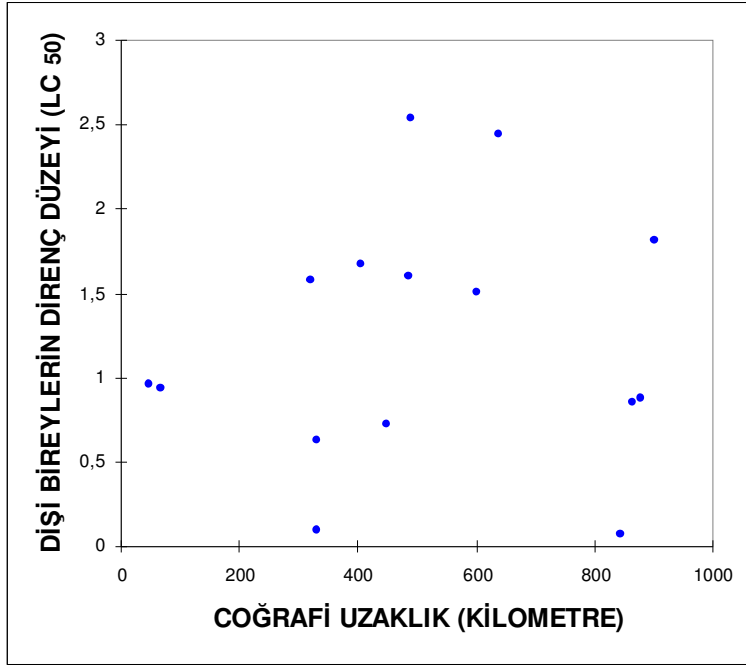
Mantel testi sonucunda, dişi ve erkek bireylerin direnç düzeyleri ve coğrafi uzaklık matrisleri arasında düşük korelasyon katsayısı (dişi:  $r=0,074$ ,  $p=0,805$  ve erkek:  $r=0,237$ ,  $p=0,387$ ) tespit edilmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.11). Bu katsayıların düşüklüğü, populasyonlarda Malathion'a karşı evrimleşen direncin, populasyonlara özgü bir örüntü sergilemediğine işaret ediyor olabilir.

**Çizelge 4.21.** *Drosophila melanogaster* populasyonlarının erkek bireylerinin LC<sub>50</sub> direnç düzeylerinin matrisi

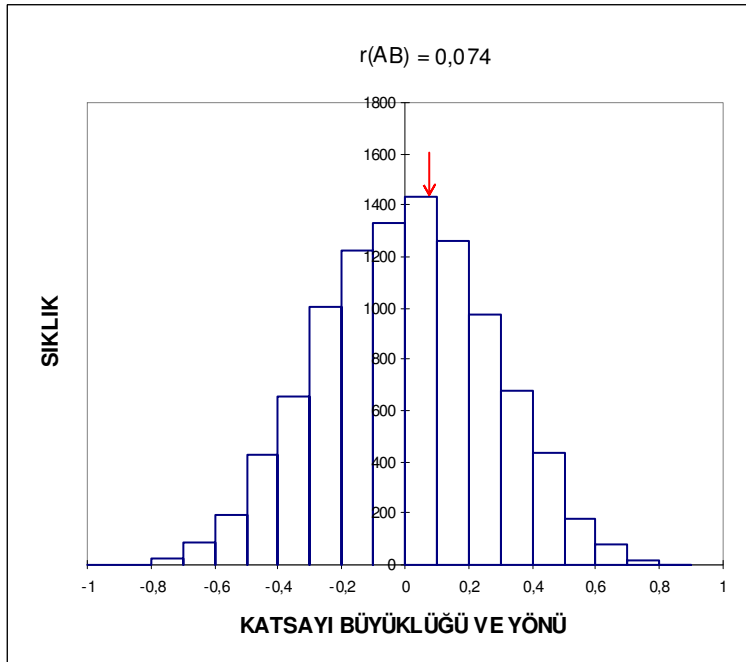
Populasyon	Antalya	Ayvalık	Çandarlı	Dörtyol	Eskişehir	Antakya
Antalya	0	0,103	0,94	1,096	0,064	1,40
Ayvalık	0,103	0	0,837	0,993	0,167	1,297
Çandarlı	0,94	0,837	0	0,156	1,004	0,46
Dörtyol	1,096	0,993	0,156	0	1,16	0,304
Eskişehir	0,064	0,167	1,004	1,16	0	1,464
Antakya	1,40	1,297	0,46	0,304	1,464	0

**Çizelge 4.22.** *Drosophila melanogaster* populasyonlarının dişi bireylerinin LC<sub>50</sub> direnç düzeylerinin matrisi

Populasyon	Antalya	Ayvalık	Çandarlı	Dörtyol	Eskişehir	Antakya
Antalya	0	0,719	1,677	1,602	0,095	2,535
Ayvalık	0,719	0	0,958	0,883	0,624	1,816
Çandarlı	1,677	0,958	0	0,075	1,582	0,858
Dörtyol	1,602	0,883	0,075	0	1,507	0,933
Eskişehir	0,095	0,624	1,582	1,507	0	2,44
Antakya	2,535	1,816	0,858	0,933	2,44	0

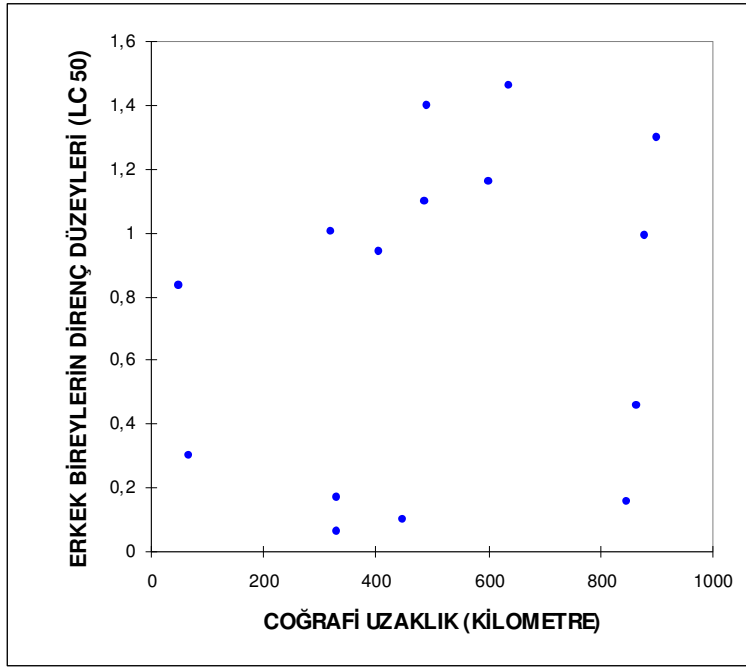


**Şekil 4.8.** Dişi bireylerin Malathion direnç düzeyleri ve coğrafi uzaklık matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafik

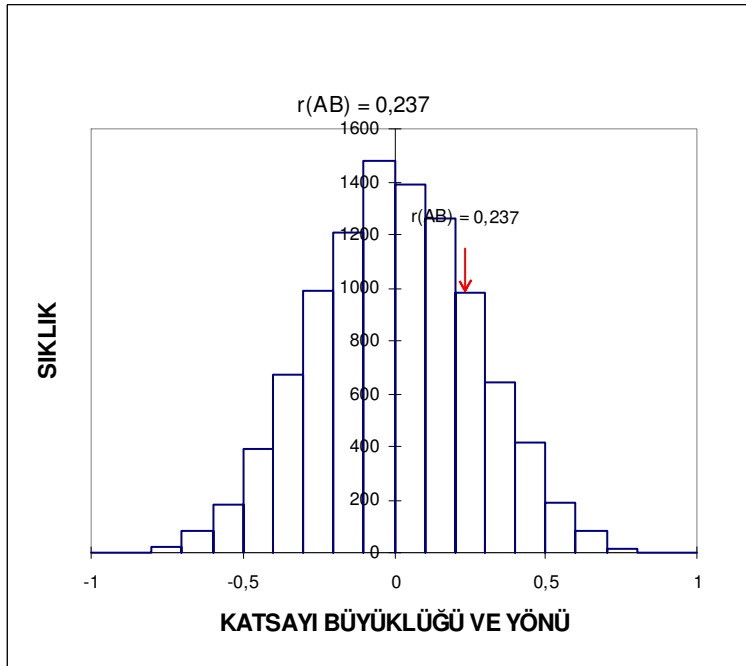


**Şekil 4.9.** Dişi bireylerin Malathion direnç düzeyleri ve coğrafi uzaklık matrisleri arasında yapılan Mantel testinin temel alınan korelasyon katsayıları





**Şekil 4.10.** Erkek bireylerin Malathion direnç düzeyleri ve coğrafi uzaklık matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafik



**Şekil 4.11.** Erkek bireylerin Malathion direnç düzeyleri ve coğrafi uzaklık matrisleri arasında yapılan Mantel testinin temel alınan korelasyon katsayıları

#### 4.5.3. Seçilimi Yapılmış ve Seçilimi Yapılmamış Populasyonların Direnç Düzeylerinin Korelasyonu

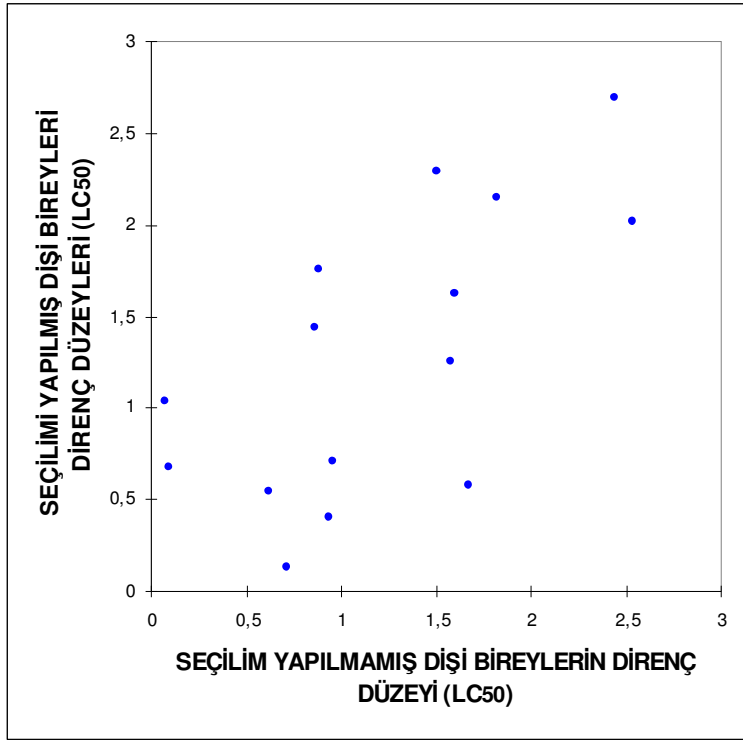
Seçilimi yapılmış *D.melanogaster* populasyonlarının dişi ve erkek bireylerinin direnç düzeyleri ile seçilimi yapılmamış olan dişi ve erkek bireylerin direnç düzeylerinin arasında bir korelasyon bulunup bulunmadığını test etmek amacıyla, populasyonların ikili olarak farkları alınarak matrisler oluşturulmuştur (Çizelge 4.23, Çizelge 4.24). Matrislerin ilişkilene düzeyine ait grafikler Şekil 4.12 ve Şekil 4.14'de görülmektedir.

Seçilimi yapılmış ve seçilimi yapılmamış *Drosophila melanogaster* populasyonlarının dişi ve erkek bireylerinin LC<sub>50</sub> direnç düzeylerinin Mantel testi sonucunda, yüksek korelasyon katsayıları (dişi  $r=0,672$ ,  $p=0,005$ ; erkek  $r=0,752$ ,  $p=0,001$ ) elde edilmiştir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.15). Bu sonuç, seçim yapılmış ve yapılmamış populasyonlar arasında yüksek ilişkilene olduğunu göstermektedir. Bu çalışma kapsamında 5 kuşak gerçekleştirilebilen seçim ile direnci etkileyen genetik varyasyon açısından, seçilmiş ve seçilmemiş populasyonlar arasında fark oluşturulmadığı sonucunu vermektedir.

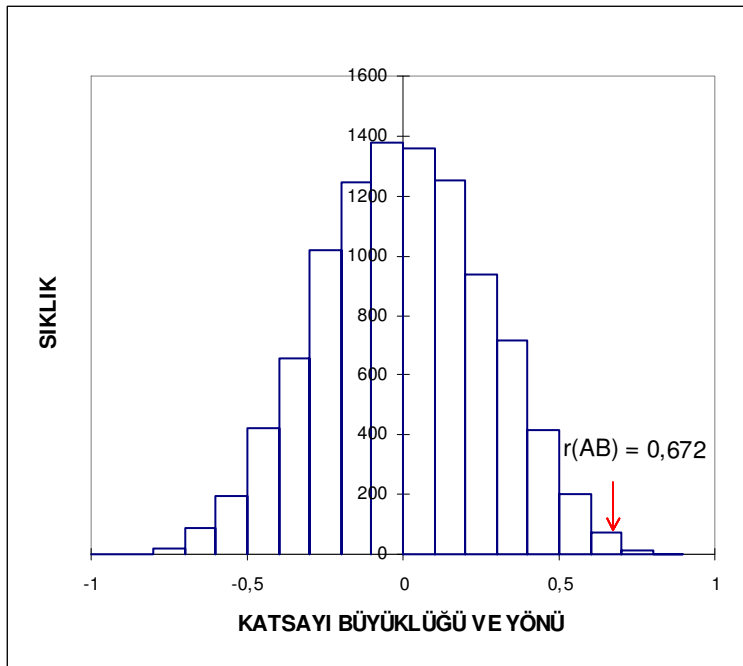
Sonuç olarak, seçim ile birlikte direnç düzeyinin artmış olduğunu ancak populasyonlar arasındaki farkın korunduğunu söyleyebiliriz.

**Çizelge 4.23.** Seçilimi yapılmış *Drosophila melanogaster* populasyonlarının dişi bireylerinin LC<sub>50</sub> direnç düzeylerinin matrisi

Populasyon	Antalya	Ayvalık	Çandarlı	Dört Yol	Eskişehir	Antakya
Antalya	0	0,131	0,579	1,62	0,673	2,021
Ayvalık	0,131	0	0,71	1,751	0,542	2,152
Çandarlı	0,579	0,71	0	1,041	1,252	1,442
Dört Yol	1,62	1,751	1,041	0	2,293	0,401
Eskişehir	0,673	0,542	1,252	2,293	0	2,694
Antakya	2,021	2,152	1,442	0,401	2,694	0



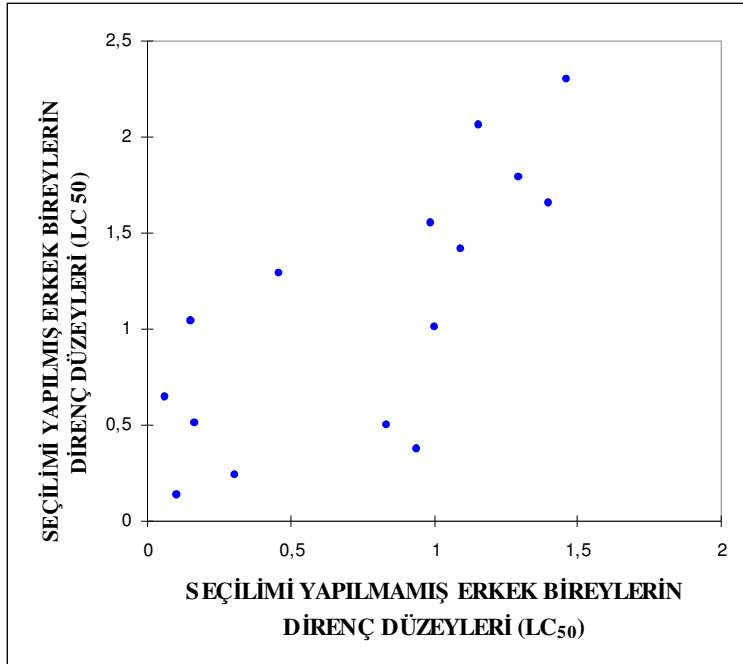
**Şekil 4.12.** Seçilimi yapılmış ve seçilimi yapılmamış *Drosophila melanogaster* populasyonlarının dişi bireylerinin LC<sub>50</sub> direnç düzeylerinin matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafik



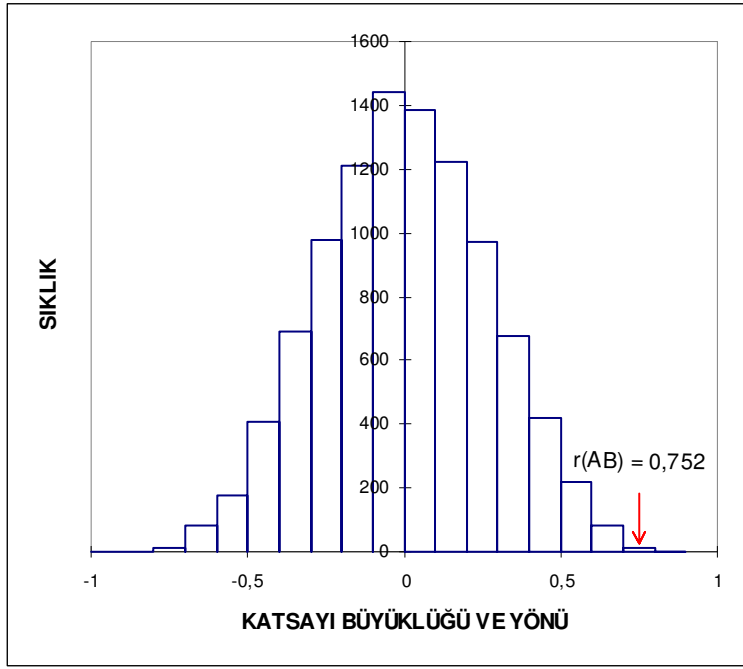
**Şekil 4.13.** Seçilimi yapılmış ve seçilimi yapılmamış *Drosophila melanogaster* populasyonlarının dişi bireylerinin LC<sub>50</sub> direnç düzeylerinin Mantel testine temel alınan korelasyon katsayıları

**Çizelge 4.24.** Seçilmiş populasyonların erkek bireylerinde LC<sub>50</sub> direnç düzeylerinin matrisi

Populasyon	Antalya	Ayvalık	Çandarlı	Dört Yol	Eskişehir	Antakya
Antalya	0	0,132	0,371	1,417	0,641	1,66
Ayvalık	0,132	0	0,503	1,549	0,509	1,792
Çandarlı	0,371	0,503	0	1,046	1,012	1,289
Dört Yol	1,417	1,549	1,046	0	2,058	0,243
Eskişehir	0,641	0,509	1,012	2,058	0	2,301
Antakya	1,66	1,792	1,289	0,243	2,301	0



**Şekil 4.14.** Seçilimi yapılmış ve yapılmamış *Drosophila melanogaster* populasyonlarının erkek bireylerinin LC<sub>50</sub> direnç düzeyleri matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafik



**Şekil 4.15.** Seçilimi yapılmış ve seçilimi yapılmamış *Drosophila melanogaster* populasyonlarının erkek bireylerinin LC<sub>50</sub> direnç düzeylerinin Mantel testine temel alınan korelasyon katsayıları

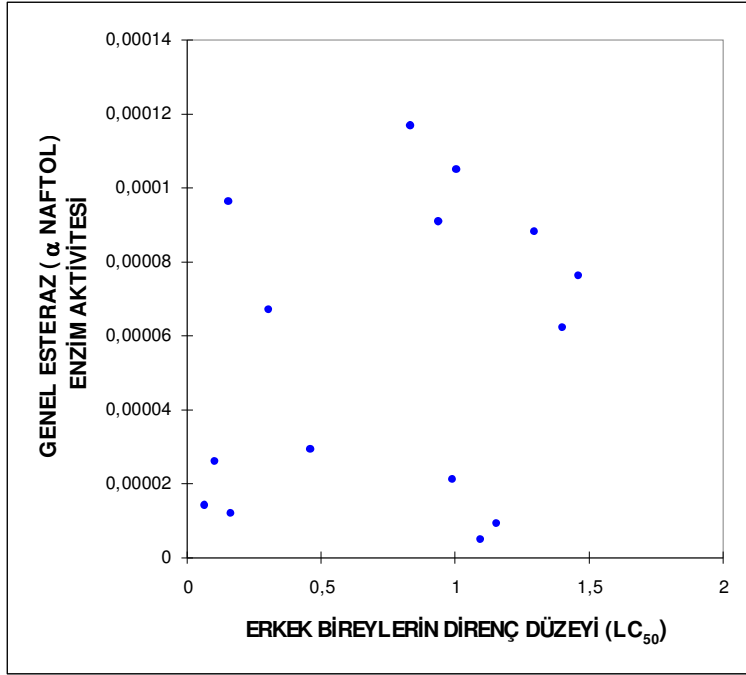
#### 4.5.4. Genel Esteraz Enzim Aktivitesi Sonuçları ile Direnç Düzeylerinin Korelasyonu

Genel Esteraz enzim aktivitesi sonuçları ile direnç düzeyleri arasında korelasyon olup olmadığını test etmek için yalnızca erkek bireylerde yapılan enzim aktivitesi ölçümleri, alfa ve beta naftol değerleri için ayrı ayrı matrisler oluşturulmuştur (Çizelge 4.25 ve Çizelge 4.26). Malathion direnç düzeyleri ile genel esteraz (alfa ve beta naftol) enzim aktiviteleri matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafikler Şekil 4.16 ve Şekil 4.18’de görülmektedir.

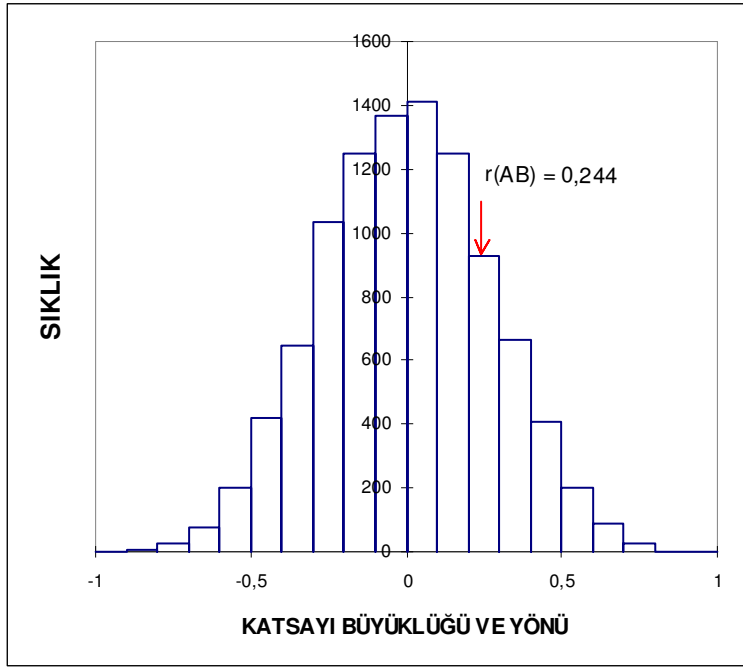
Mantel testi ile erkek bireylerin direnç düzeyleri ve genel esteraz aktivitelerinin matrislerinin karşılaştırılması sonucunda elde edilen düşük korelasyon katsayıları, (alfa  $r=0,244$ ,  $p=0,382$ ; beta  $r=0,059$ ,  $p=0,826$ ) populasyonlarda genel esteraz aktiviteleri ile direnç düzeyleri arasında korelasyon bulunmadığını göstermektedir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.19).

**Çizelge 4.25.** Genel esteraz enzim aktivitesi değerlerinin matrisi (Alfa naftol, nmol alpha naphthol/min/mg)

Populasyon	Antalya	Ayvalık	Çandarlı	Dört Yol	Eskişehir	Antakya
Antalya	0	0,000026	0,000091	0,000005	0,000014	0,000062
Ayvalık	0,000026	0	0,000117	0,000021	0,000012	0,000088
Çandarlı	0,000091	0,000117	0	0,000096	0,000105	0,000029
Dört Yol	0,000005	0,000021	0,000096	0	0,000009	0,000067
Eskişehir	0,000014	0,000012	0,000105	0,000009	0	0,000076
Antakya	0,000062	0,000088	0,000029	0,000067	0,000076	0



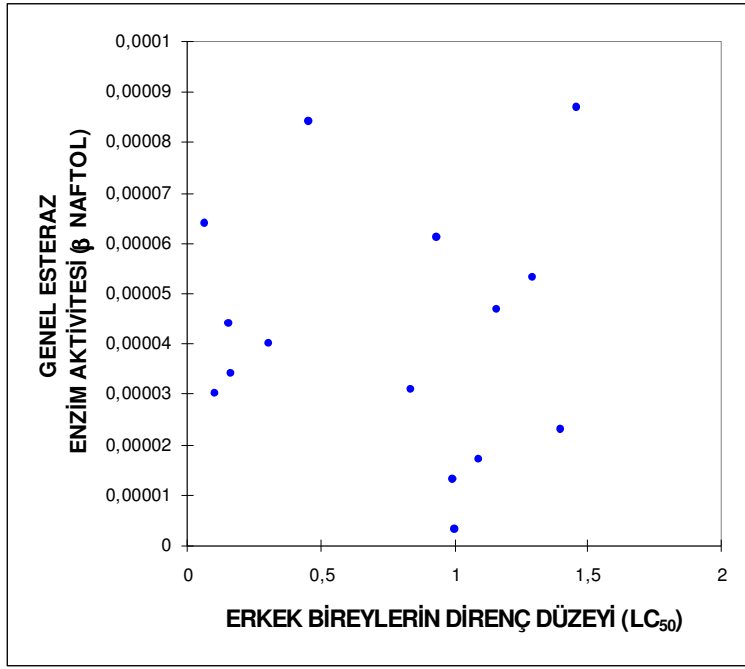
**Şekil 4.16.** Erkek bireylerde Malathion direnç düzeyleri ile genel esteraz (alfa naftol) enzim aktivitesi matrislerinin ilişkilendirme düzeyini gösteren grafik



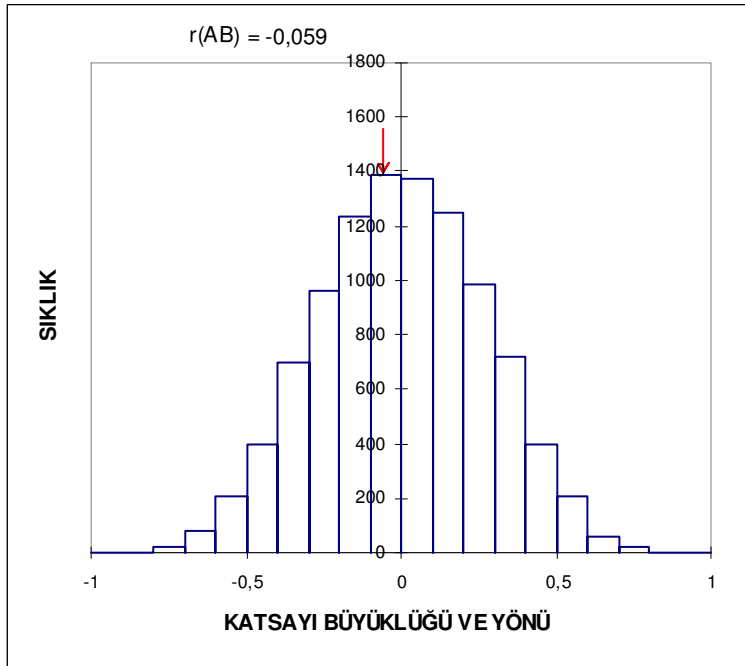
**Şekil 4.17.** Erkek bireylerde Malathion direnç düzeyleri ile genel esteraz (alfa naftol) enzim aktivitesi matrislerinin Mantel testine temel alınan korelasyon katsayıları

**Çizelge 4.26.** Genel esteraz enzim aktivitesi değerlerinin matrisi (Beta naftol, nmol beta naphthol/min/mg)

Populasyon	Antalya	Ayvalık	Çandarlı	Dört Yol	Eskişehir	Antakya
Antalya	0	0,00003	0,000061	0,000017	0,000064	0,000023
Ayvalık	0,00003	0	0,000031	0,000013	0,000034	0,000053
Çandarlı	0,000061	0,000031	0	0,000044	0,000003	0,000084
Dört Yol	0,000017	0,000013	0,000044	0	0,000047	0,00004
Eskişehir	0,000064	0,000034	0,000003	0,000047	0	0,000087
Antakya	0,000023	0,000053	0,000084	0,00004	0,000087	0



**Şekil 4.18.** Erkek bireylerde Malathion direnç düzeyleri ile genel esteraz (beta naftol) enzim aktivitesi matrislerinin ilişkilene düzeyini gösteren grafik



**Şekil 4.19.** Erkek bireylerde Malathion direnç düzeyleri ile genel esteraz (beta naftol) enzim aktivitesi matrislerinin Mantel testine temel alınan korelasyon katsayıları



#### 4.5.5. Seçilimi Yapılmış ve Yapılmamış Populasyonların Genetik Uzaklık ( $F_{ST}$ ) Değerlerinin Korelasyonu

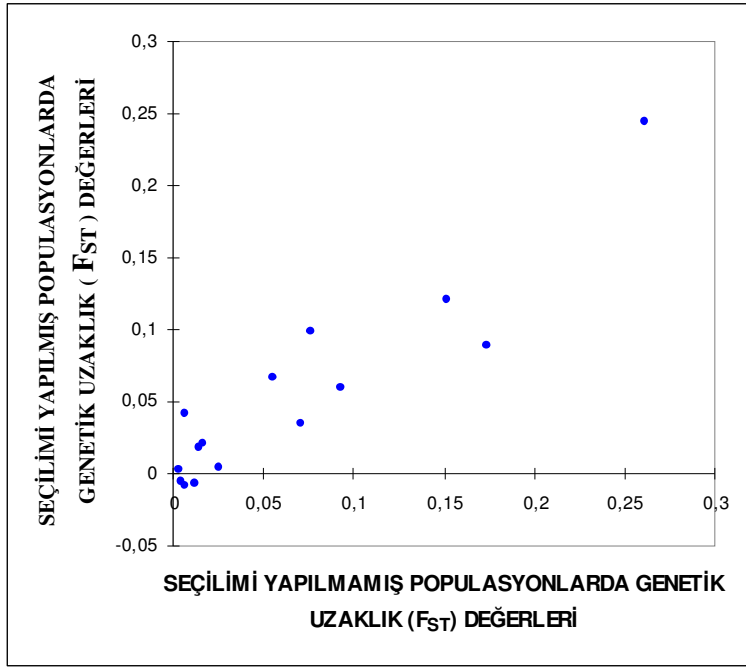
Dirençli olarak seçilimi yapılmış olan populasyonların genetik uzaklık ( $F_{ST}$ ) değerleri Arlequin programı kullanılarak hesaplandı ve bu değerlerin matrisi oluşturuldu. Aynı şekilde seçilimi yapılmamış olan populasyonların  $F_{ST}$  matrisleri oluşturularak seçilimi yapılmış populasyonlar ile korelasyonuna bakılmak üzere Mantel testi yapılmıştır (Çizelge 4.27 ve Çizelge 4.28). Test sonucunda elde edilen yüksek korelasyon katsayısı ( $r=0,929$ ,  $p<0,005$ ), Est-6 alel sıklıklarının populasyonlar arasındaki sıklık farkı örüntüsünün, bu çalışma kapsamında 5 nesil yapılabilen seçim ile değişmediğini göstermektedir (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21).

**Çizelge 4.27.** Seçilimi yapılmamış populasyonlarda Arlequin 3.1 ile bulunan  $F_{ST}$  değerleri

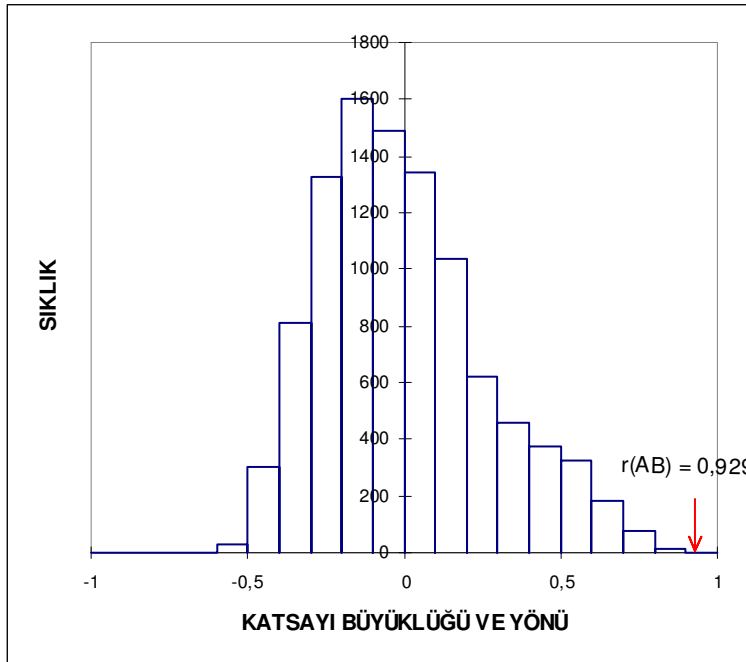
Populasyon	Antalya	Ayvalık	Çandarlı	Dörtyol	Eskişehir	Antakya
Antalya	0	0,00623	0,01256	0,05569	0,00372	0,09291
Ayvalık	0,00623	0	0,02521	0,07594	0,0139	0,07095
Çandarlı	0,01256	0,02521	0	0,00698	0,00478	0,17403
Dörtyol	0,05569	0,07594	0,00698	0	0,01616	0,26074
Eskişehir	0,00372	0,0139	0,00478	0,01616	0	0,15217
Antakya	0,09291	0,07095	0,17403	0,26074	0,15217	0

**Çizelge 4.28.** Dirençli olarak seçilmiş populasyonların frekanslarının çiftler halinde karşılaştırılması ve populasyonlar arası genetik uzaklıklar ( $F_{ST}$  Değerleri)

Populasyon	Antalya	Ayvalık	Çandarlı	Dörtyol	Eskişehir	Antakya
Antalya	0,000	0,00812	0,00631	0,06712	0,00249	0,05989
Ayvalık	0,00812	0	0,00403	0,09873	0,01841	0,03495
Çandarlı	0,00631	0,00403	0	0,04144	0,00526	0,08903
Dörtyol	0,06712	0,09873	0,04144	0	0,02038	0,24478
Eskişehir	0,00249	0,01841	-0,00526	0,02038	0	0,12109
Antakya	0,05989	0,03495	0,08903	0,24478	0,12109	0



**Şekil 4.20.** Seçilimi yapılmış ve seçilimi yapılmamış olan populasyonların genetik uzaklık (F<sub>ST</sub>) değerleri matrislerinin Mantel testi sonuçları



**Şekil 4.21.** Seçilimi yapılmış ve seçilimi yapılmamış olan populasyonların genetik uzaklık (F<sub>ST</sub>) değerleri matrislerinin Mantel testi grafiği

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında, *Drosophila melanogaster*'in ülkemizde bulunan doğal populasyonlarında, Malathion direnci ile esteraz polimorfizmi, genel esteraz ve asetilkolinesteraz enzim aktiviteleri arasındaki ilişkiler araştırılmıştır.

Bu amaçla, *D.melanogaster*'in Antalya-Merkez, Antakya-Merkez, İzmir-Merkez, İzmir-Çandarlı, Hatay-Dört Yol, Hatay-Erzin, Eskişehir- Merkez, Kocaeli-Kerpe, Antalya-Serik, Balıkesir-Ayvalık yörelerinden toplanan doğal populasyonları kullanılmıştır. Bu populasyonlarda Malathion'un LC<sub>50</sub> değerleri "temas yöntemi" ile belirlenmiştir.

*D. melanogaster*'in Türkiye'deki 10 doğal populasyonunda genel esteraz polimorfizmi, nişasta jel elektroforezi ile araştırılmıştır. İnsektisit direncinin biyokimyasal olarak araştırıldığı analizlerde, *D. melanogaster* populasyonlarının Genel Esteraz ve Asetilkolinesteraz (AChE) enzimlerinin aktiviteleri belirlenmiştir.

Bu araştırmada *D.melanogaster* populasyonlarının Malathion'a karşı direnç düzeyleri (LC<sub>50</sub>), her populasyon için dişi ve erkek olarak ayrı ayrı belirlenmiştir. Bu araştırmalar sonucunda saptanan dirençlilik düzeyleri, dişilerde 1,050 µg/cm<sup>2</sup> ile 3,850 µg/cm<sup>2</sup> arasında değişirken, erkeklerde 0,704 µg/cm<sup>2</sup> ile 2,458 µg/cm<sup>2</sup> arasında değişmektedir. Organofosfatlı insektisitlere duyarlı soy olan Canton S populasyonunda direnç düzeyi, dişilerde 1,360 µg/cm<sup>2</sup> bulunurken erkeklerde 0,934 µg/cm<sup>2</sup> olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Populasyonların direnç testleri sonucunda elde edilen direnç düzeyleri (LC<sub>50</sub>) değerlerine göre Malathion'a en dirençli populasyonun Antakya, en duyarlı populasyonun Serik olduğunu, diğer populasyonların en dirençliden en duyarlıya doğru "Dört Yol, Çandarlı, Erzincan, Kerpe, Ayvalık, İzmir, Eskişehir, Antalya" şeklinde sıralandığı belirlenmiştir (Şekil 4.3).

İnsektisitlerin yoğun olarak kullanıldığı sıcak bölgeler arasında olan Antakya, Dört Yol ve Çandarlı populasyonları beklenen şekilde direnç gösterirken, Antalya, İzmir, Ayvalık, Kerpe, Erzin ve Serik populasyonları beklenenden az direnç göstermiştir. Ülkemizin iç kısımlarında bulunan, sıcak bölgeler arasında olmayan Eskişehir populasyonunun duyarlı Canton S'e göre fazla dirençli olmayışı beklenen bir sonuçtur.

Bu çalışmada, doğal populasyonlarda esteraz enzim polimorfizmi araştırılmış ve bu yönden polimorfik bulunmuştur. Deneyler sonucunda elde edilen elektroforez bantları incelenmiş ve Esteraz 6 (Est 6) enziminin alel sıklıkları belirlenmiştir. Jelde hızlı hareket eden bantlar *Hızlı* (Fast), yavaş hareket eden bantlar *Yavaş* (Slow) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.3). Bu iki değer arasında olan bantlar ise heterozigot olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler, Est 6 ve Est C'nin heterozigot marker populasyonu olan 4016 numaralı soyun bantları ile karşılaştırılarak yapılmıştır.

Doğal populasyonları, dişi ve erkek ayrı ayrı *Hızlı* ve *Yavaş* alellerinin sıklıklarına göre sıralayacak olursak, *Hızlı* alelinin sıklığı, *Yavaş* alelinden fazla olan populasyonlar, Antalya, Ayvalık, Çandarlı, Erzin, Eskişehir ve Antakya populasyonlarıdır. *Yavaş* alelinin sıklığının *Hızlı* alelinin sıklığından fazla olduğu tek populasyon İzmir populasyonudur. *Yavaş* alelinde fikse olmuş olan tek populasyon İzmir populasyonunun dişi bireyleri olarak bulunmuştur. Yalnızca İzmir populasyonunda, en düşük alel sıklığı olan *Yavaş* alelin sıklığı 0,05'den küçük bulunmuştur ( $P < 0,001$ ). *Yavaş* alelinin sıklığı ile *Hızlı* alelinin sıklığı birbirine yakın olan populasyonlar ise, Dört Yol, Kerpe, İzmir ve Serik populasyonlarıdır. Her populasyon için esteraz enzimi lokusunun genotipleme sonuçları ve incelenen toplam birey sayıları Çizelge 4.2'de, alel sıklıkları da Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Populasyon çiftleri arasındaki genetik uzaklıklar, ( $F_{ST}$  ya da gen sıklığı varyasyonu) Est 6 yönünden populasyonların karşılaştırılması amacıyla Arlequin 3.1 programı ile hesaplanmıştır.  $F_{ST}$  değerleri, Est 6'nın *Hızlı* ve *Yavaş* alel frekansları arasında anlamlı derecede farklılık bulunmuş olan populasyonlar hariç

tutularak hesaplanmıştır. Buna göre  $F_{ST}$  değerleri, doğal populasyonlardan Antalya, Ayvalık, Çandarlı, Dört Yol, Eskişehir ve Antakya için karşılaştırmalı olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.4). Bu populasyonlar için yapılan hesaplamalarla eşey karışık olarak alel sıklıkları hesaplanmış ve  $F_{ST}$  değerleri belirlenmiştir. En dirençli populasyon olan Antakya populasyonu, tüm diğer populasyonlardan belirgin derecede farklı bulunmuştur. Dört Yol populasyonu da Antalya ve Ayvalık'tan anlamlı ölçüde farklıdır. Yine Çandarlı ile Ayvalık arasında belirgin ölçüde farklılık gözlenmiştir (Çizelge 4.5).  $F_{ST}$  değerlerindeki bu farklılık aynı zamanda direnci diğerlerine göre yüksek olan populasyonlarda gözlenmiştir.

Populasyonların genotipleme sonuçlarının alel sıklıkları hesaplanarak Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadıklarının anlaşılabilmesi için Arlequin 3.1 programı kullanılmıştır. Populasyonun dişi ve erkek bireylerinin alel frekansları anlamlı derecede farklı olan populasyonlar bu kapsamın dışında tutulmuştur. Diğer populasyonlar olan Antalya, Ayvalık, Çandarlı, Dört Yol, Eskişehir ve Antakya populasyonlarında hesaplanan değerler göz önüne alınarak Hardy Weinberg dengesinden sapmalar belirlenmiştir. Dört Yol haricinde tüm populasyonların eşey karışık olarak hesaplanan alel sıklıklarında  $F$  alelinin sıklığı daha yüksek bulunmuştur. Buna ek olarak Dört Yol populasyonunun alel sıklığının 0,5 olduğu saptanmıştır. Hesaplamalar sonucunda, Çandarlı, Dört Yol ve Antakya populasyonlarının dengede olduğu, Antalya, Ayvalık ve Eskişehir populasyonlarının dengede olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Populasyonlar arası genetik uzaklıklar ile coğrafi konum arasında bir korelasyon olup olmadığını araştırmak amacıyla hesaplanan  $F_{ST}$  değerleri ile populasyonların enlem boylam konumlarının kilometre olarak ifadeleri kullanılarak Mantel testi ile karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda belirlenen düşük korelasyon katsayısı ( $r=0,015$ ,  $p=0,948$ ), genetik uzaklıklar ile coğrafi uzaklıklar arasında korelasyon bulunmadığını göstermiştir (Şekil 4.7). Bu durum, Est 6 lokusundaki alellerin sıklıklarının genetik sürüklenmeyi öngören “uzaklıkla yalıtım” modeli'ne uymadığını göstermektedir (Futuyma, 2008).

Mantel testi kullanılarak, *D.melanogaster* populasyonlarının dişi ve erkek bireylerinde  $LC_{50}$  direnç düzeylerinin matrisi oluşturulmuş, coğrafi uzaklıkların

matrisi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta elde edilen düşük korelasyon katsayısı (dişi:  $r=0,074$ ,  $p=0,805$  ve erkek:  $r=0,237$ ,  $p=0,387$ ) populasyonlarda Malathion'a karşı evrimleşen direncin, populasyonlara özgü bir örüntü sergilemediğini gösteriyor olabilir (Şekil 4.9, Şekil 4.11).

Dirençli populasyonlar elde etmek için tüm populasyonlar Malathion uygulanarak beş nesil boyunca seçilime uğratılmıştır. Seçilime uğratılmış olan populasyonların direnç düzeyleri Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. Buna göre yine en dirençli populasyon olarak Antakya, daha sonra Dört Yol olarak görülmektedir. En duyarlı populasyon olarak Serik belirlenmiştir.

Seçilimi yapılmış olan doğal populasyonların erkek ve dişi bireyleri elektroforeze alınarak genotiplenmeleri yapılmış ve populasyonların *Yavaş* (SS) ve *Hızlı* (FF) alellerinin sıklıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.9, Çizelge 4.10). Bu incelemeler sonucunda seçilen populasyonlar ile seçilmeyen populasyonlar arasındaki farklar tüm yönleri ile sınanmıştır. Ancak dirençli olarak elde edilen populasyonlarda herhangi bir yönden değişim saptanmamıştır. Buna benzer bir çalışma *D.melanogaster* kullanılarak yapılmıştır (El-Abidin Salam and Pinsker, 1981). Bu çalışmada, seçilimin 10'uncu ile 12'inci nesli arasında, Est 6 *Yavaş* (S) aleli sıklığında çok çarpıcı bir düşme saptanması (%33 iken %1'e düşüş) çok daha uzun süreli uygulamanın Est 6 S ve F alellerinde seçimde daha etkili olabileceğini düşündürmüştür. Bu konuda yapılan diğer çalışmalarda bazı araştırmacılar 30-40 nesil boyunca seçim uygularken (Singh and Morton, 1981), bazıları 8-13 (El-Abidin Salam and Pinsker, 1981; Peris and Aguade, 1982), bazı da 2-4 nesil gibi daha kısa sürede uygulama yapmıştır (Kence ve Kence, 1993). Bu konuda literatürde yapılmış çalışmalarda Est 6 allozimlerinin seleksiyonunun laboratuvar ortamında yapılarak allozimlerin saptanmasındaki zorluklardan da bahsedilmektedir (Oakeshott et al., 1993).

Elektroforez kullanılarak belirlenen esteraz bantları canlı bünyesindeki genel esterazlardır. Ancak daha önce belirtildiği gibi Est 6 marker stokları her uygulamada jele yüklenerek heterozigot bantlar elde edilmiş ve doğal populasyonlar bu bantlarla karşılaştırılarak yorumlanmıştır. Bu nedenle, genel esterazlar ya da Est 6 yönünden olası bir nükleotit değişimi veya mutasyonları

izlediğimiz seçilim deneyleri sonucunda gerçekleşmiş olabilir. Bu tür bir seçilimin saptanabilmesi amacıyla moleküler çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Seçilimi yapılmış populasyonlarda Hardy Weinberg dengesi sınınanarak sonuçlar Çizelge 4.13'de verilmiştir. Bu sonuçlar, seçilimi yapılmamış populasyonların dengesi (Çizelge 4.6) ile karşılaştırıldığında dengede olmayan Ayvalık, Eskişehir ve Antalya populasyonlarının da seçilim sonucunda dengede olduğu görülmüştür.

Seçilimi yapılmış populasyonlar çiftler halinde karşılaştırılarak genetik uzaklıklar ( $F_{ST}$  değerleri) belirlenmiştir. Populasyonların  $F_{ST}$  değerlerini bulmak amacıyla, dişi ve erkek bireylerinin ayrı ayrı hesaplanmış alel frekansları arasında anlamlı fark olan populasyonlar hariç tutularak diğer populasyonların genetik uzaklık değerleri Arlequin 3.1 programı kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.11). Bu değerlendirme sonucunda, Antakya populasyonu ile diğer populasyonlar arasında belirgin fark göze çarpmıştır. Antakya diğer tüm populasyonlardan daha dirençli olup diğer tüm populasyonların genetik uzaklıklarından anlamlı ölçüde farklı bulunmuştur. Dörtyol populasyonu, Antakya'dan sonra ikinci dirençli populasyondur. Dörtyol ile Ayvalık, Antalya ve Çandarlı arasında belirgin uzaklık gözlenmiştir (Çizelge 4.12).

Dirençli olarak seçilimi yapılmış olan populasyonların genetik uzaklık ( $F_{ST}$ ) değerlerinin matrisi ile seçilimi yapılmamış olan populasyonların  $F_{ST}$  matrisleri oluşturularak ikisi arasındaki korelasyon Mantel testi kullanılarak test edilmiştir. Sonuçta elde edilen yüksek korelasyon katsayısı ( $r=0,929$ ,  $p<0,005$ ), Est-6 alel frekanslarının populasyonlar arasındaki frekans farkı örüntüsünün, bu çalışma kapsamında 5 nesil yapılabilen seçilim ile değişmediğini göstermektedir (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21).

Seçilimi yapılmış *D.melanogaster* populasyonlarının dişi ve erkek bireylerinin direnç düzeyleri ile seçilimi yapılmamış olan dişi ve erkek bireylerin direnç düzeylerinin arasında bir korelasyon bulunup bulunmadığını test etmek amacıyla Mantel testi uygulanmıştır. Populasyonların dişi ve erkek bireylerinin

LC<sub>50</sub> direnç düzeylerinin Mantel testi sonucunda, yüksek korelasyon katsayıları (dişi r=0,672, p=0,005; erkek r=0,752, p=0,001) elde edilmiştir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.15). Bu sonuç, seçilim yapılmış ve yapılmamış populasyonlar arasında yüksek ilişkilene olduğunu göstermektedir. Bu çalışma kapsamında 5 kuşak gerçekleştirilebilen seçilim ile direnci etkileyen genetik varyasyon açısından, seçilmiş ve seçilmemiş populasyonlar arasında fark oluşturulmadığı sonucunu vermektedir. Yapılan seçilim ile birlikte direnç düzeyinin artmış olduğunu ancak populasyonlar arasındaki farkın korunduğunu söyleyebiliriz.

Direncin biyokimyasal temelini araştırmak amacıyla, genel esteraz (non-spesifik) ve asetilkolinesteraz aktiviteleri ölçülmüştür. Tüm doğal populasyonların genel esteraz aktivite ölçümleri için alfa ve beta naftil asetatın ayrı ayrı substrat olarak kullanıldığı ölçümler yapılmıştır. Alfa naftil asetat substrat olarak kullanıldığı zaman saptanan ortalama aktivite değerleri, duyarlı Canton S populasyonu ile karşılaştırılmıştır. Canton S'in gösterdiği ortalama değer 0,000123 nmol alfa naphthol/min/mg'dir. Bu değerden anlamlı derecede yüksek aktiviteye sahip olan populasyonlar; Antakya (0,000213), Serik (0,000173), Antalya (0,000151), Erzin (0,000154), Çandarlı (0,000242) ve İzmir (0,000478)'dir.

Beta naftil asetat substrat olarak kullanıldığı zaman belirlenen ortalama aktivite değerleri, duyarlı Canton S populasyonu ile karşılaştırılmıştır. Canton S'in gösterdiği ortalama değer 0,000220'dir. Bu değer üzerinde bir aktivite göstermiş olan tek populasyon İzmir'dir (0,000683). Bu değerden anlamlı derecede düşük aktiviteye sahip olan populasyonlar, Erzin (0,000163), Eskişehir (0,000118), Dört Yol (0,000165), Kerpe (0,000118), Ayvalık (0,000152) ve Çandarlı (0,000121) populasyonlarıdır.

Bu sonuçları, populasyonların dirençlilik düzeyleri (LC<sub>50</sub> değerleri) ile karşılaştırdığımızda, dirençlilik ile artmış ya da azalmış genel esteraz aktivitesi arasında anlamlı bir bağlantı olmadığı görülmektedir. En duyarlı ve en dirençli populasyonların buradaki gibi benzer esteraz aktivitesi göstermesi, genel esterazların *D. melanogaster* doğal populasyonlarında Malathion'a direnç



kazanmada bir etkisinin olmayabileceğine işaret etmektedir. *D.melanogaster*'in Muğla populasyonları ile yapılan bir çalışmada, bulgularımıza benzer sonuçlar görülmüştür (Taşkın et al., 2007).

Genel Esteraz enzim aktivitesi sonuçları ile direnç düzeyleri arasında korelasyon olup olmadığını test etmek için yalnızca erkek bireylerde yapılan enzim aktivitesi ölçümleri, alfa ve beta naftol değerleri Mantel testi ile karşılaştırılmıştır. Mantel testi sonucunda elde edilen düşük korelasyon katsayıları, (alfa naftol için  $r=0,244$ ,  $p=0,382$ ; beta naftol için  $r=0,059$ ,  $p=0,826$ ) populasyonlarda genel esteraz aktiviteleri ile direnç düzeyleri arasında korelasyon bulunmadığını göstermektedir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.19).

Bu sonuçlar ışığında, bir populasyonun dirençliliği ile genel esteraz aktiviteleri arasında doğrudan bir ilişki görünmemektedir. Ayrıca, heterojen bir dağılıma sahip olan İzmir populasyonunun aktivite açısından gösterdiği dağılım, diğer populasyonlar arasında göze çarpmaktadır. Malathion'a karşı ortalama bir dirence sahip olan İzmir populasyonu, *Yavaş (Slow)* alelinin sıklığının yüksek olması ve genel esteraz aktivitesinin duyarlı soya göre yüksek olması bakımından diğer doğal populasyonlardan farklı olarak dikkati çekmektedir.

İnsektisite karşı dirençte önemli rolü olduğu düşünülen diğer bir enzim de asetilkolinesterazdır. Bir populasyonun duyarlı sayılması için inhibisyon kinetiği değerinin 30 ve daha az olması gerekmektedir (Hemingway, 1998). İnhibisyon kinetiğinin 30 olması, o populasyonda %30 oranında inhibisyon olduğunu, diğer bir deyişle, populasyonda %70 oranında asetilkolinesterazın inhibe edilmediğini ve o populasyona ait bireylerin %70'inin asetilkolinesteraz enzimine bağlı insektisit direnci taşıdığı anlamına gelmektedir (Hemingway, 1998).

Doğal populasyonlarda Asetilkolinesteraz enzimine bağlı insektisit direncini araştırmak için enzimin aktivitesi ölçülmüş ve ortalama inhibisyon kinetiği değerleri belirlenerek, Canton S (Duyarlı) populasyonu ile karşılaştırılmıştır. Canton S için belirlenen ortalama inhibisyon kinetiği değeri 37,91'dir. Bu değer Canton S

populasyonunun % 62,09'unda asetilkolinesteraz enzimine bağlı insektisit direnci görüldüğü anlamına gelmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlenen AChE inhibisyon kinetiği değereri 30 olarak gösterilmiş ve bu değererin üzerinde bulunan populasyonlar duyarlı, altında bulunan populasyonlar dirençli olarak ele alınması gerektiği belirtilmiştir (Hemingway, 1998). Asetilkolinesteraz enziminin İnhibisyon kinetiği değerleri bakımından, Canton S populasyonunun inhibisyon kinetiği değerinin anlamlı derecede üzerinde olan populasyonlar, Eskişehir (46,62), Çandarlı (247,99) ve 4016 numaralı marker (206,99) populasyonlarıdır. Bu sonuçlar, Eskişehir, Çandarlı ve 4016 numaralı populasyonlarda asetilkolinesteraz enzimine bağlı insektisit direnci bulunmadığını göstermektedir.

Duyarlı Canton S populasyonunun ihlibisyon kinetiği değerleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük inhibisyon kinetiği değereri göstermiş olan populasyonlar ise Antakya (19,97), Kerpe (24,81) ve İzmir (14,53) populasyonlarıdır. Bu populasyonlarda asetilkolinesteraz enzimine bağlı insektisit direnci bulunduğunu göstermektedir. Bulunan bu değerler, Antakya populasyonunda %80,03, Kerpe populasyonunda %75,19 ve İzmir populasyonunda %85,47 oranında asetilkolinesteraz direnci olan birey olduğu anlamına gelmektedir.

Elde edilen bu veriler, diğerlerine göre en dirençli populasyon olan Antakya populasyonunun sahip olduğu Malathion direncinin genel esteraz enzimlerinden çok, asetilkolinesteraz enzimi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde organofosfatlı insektisitlere dirençlilikte ana mekanizmanın asetilkolinesterazın dirençliliği (duyarsızlığı) olabileceği (El-Abidin Salam and Pinsker, 1981) ve genel esteraz aktivitesi ile ilişkili olmayabileceği görülmektedir (Taşkın et al., 2007; Baffi et al., 2008). Canlıda direnci belirleyen faktörlerin yalnızca esterazlar değil, glutatyon S-transferazlar ve monooksijenazlar vasıtasıyla olduğunu belirtmiştik. Dirençli olan canlıda esteraz enzimi aktivitesi yükselmiş

görünmese de, bireyin dirençsiz olduğu anlamına gelmediği belirtilmiştir (Ahmed and Wilkins, 2002).

Sivrisinek *Culex quinquefasciatus* kullanılarak esteraz aktivitesi ile insektisit direncinin karşılaştırıldığı bir araştırmada, Malathion kullanılan grupta genel esteraz aktivitesi ile insektisit direnci arasında pozitif bağıntı bulunmuştur. Bu artış, genel esteraz enziminin *C. quinquefasciatus*'un insektisit direncinde önemli rol oynadığını göstermiştir (Selvi et al., 2005; Selvi et al., 2007). Benzer şekilde sivrisineklerde yapılan pek çok araştırmada, organofosfat direncinin artan esteraz aktivitesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Pasteur et al., 1981; Field et al., 1984; Mouches et al., 1986; Khoo et al., 1992; Raymond et al., 1998; Lüleyap ve Kasap, 2000). Sivrisineklerdeki bu enzim artışının *Culex* esteraz geninin amplifikasyonundaki artış sonucunda oluştuğu belirlenmiştir (Mouches et al., 1986).

Diğer popülasyonlara göre Kerpe popülasyonu, Malathion dirençliliği yönünden ortalama bir duruma sahiptir. Genel esteraz aktivitesi açısından, duyarlı Canton S soyundan daha düşük bir aktivite göstermiştir. Ancak Kerpe popülasyonunun asetilkolinesteraz direncine sahip olduğu görülmektedir. Bu durum, dirence katılan diğer pek çok enzim olmasından (glutatyon S-transferaz, monooksidazlar) kaynaklanıyor olabilir.

Daha önce de belirttiğimiz gibi, *D. melanogaster* doğal popülasyonları, Est 6 enzimi de dahil olmak üzere genel esteraz enzimleri yönünden polimorfiktir. Diğer bir deyişle, doğal popülasyonlar genotiplerinde *Hızlı* ve *Yavaş* alellerini (Est 6-F, Est 6-S) içermektedir (Labate et al., 1989).

Coğrafi farklılık, bireyin dirençliliğini belirleyen faktörlerin nesiller boyunca değişmesine neden olur. Örneğin, *D. melanogaster* ile yapılan bir çalışmada, Est 6'nın *Hızlı* ve *Yavaş* varyantlarının sıklığının mevsimsel ve coğrafi (enlemsel) olarak artıp azaldığı tespit edilmiştir (Oakeshott et al., 1993). *Drosophila*'nın farklı bir türü olan *D. willistoni* grubunda yapılan enzim varyasyonları ile ilgili olan bir çalışmada ise, Meksika, Orta ve Güney Amerika, Güney Brezilya gibi farklı

coğrafyalardan elde edilip incelenen 70 popülasyonun 28 farklı gen lokusunda alelik varyasyon saptanmış, ortalama %58'i polimorfik olarak bulunmuştur (Ayala et al., 1972). Coğrafi farklılığın yanı sıra, yapay olarak oluşturulan insektisit seçim baskısı ile popülasyonda farklı aleller seçilime uğrayabilmektedir (Menozzi et al., 2004).

Deneilerde kullandığımız doğal popülasyonlar arasında Antakya popülasyonu önemli ölçüde dikkat çekicidir. Malathion direnç düzeyi bakımından en dirençli popülasyon, Antakya popülasyonu olarak belirlenmiştir. Bu popülasyonda, Est-6 enziminin *Hızlı* alelinin çoğunlukta olduğu saptanmıştır. Aktivite deneyleri sonucunda genel esteraz aktivitesi Canton S popülasyonuna göre dirençli bulunmamıştır. Ancak asetilkolinesteraz aktiviteleri yönünden Canton S ile karşılaştırıldığında, %80,3 oranında asetilkolinesteraz direncine sahip birey olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu bulgular ışığında, dirençlilik ile asetilkolinesteraz enziminin ilişkili olabileceği söylenebilir. Bu konuda yapılan bir çalışmada, bulgularımıza benzer olarak, organofosfatlı insektisitlere karşı direnç arttıkça AChE aktivitesinin ve Est-6 *Hızlı* aleli sıklığının arttığı gözlenmiştir (El-Abidin Salam and Pinsker, 1981).

Elimizde bulunan popülasyonlarda, farklı olarak göze çarpan İzmir popülasyonu, dirençli ve dirençsiz bireylerin bir arada bulunduğu heterojen bir yapıya sahiptir. Duyarlı Canton S ile karşılaştırıldığında, popülasyonda %85,47 oranında asetilkolinesteraza bağlı insektisit direnci belirlenmiştir. Dirençli ve dirençsiz bireylerin bu şekilde bir arada bulunduğu bir popülasyon için, direnci ya da duyarlılığı belirleyen etkenleri belirlemek oldukça güçtür. Genel esteraz ve asetilkolinesteraza bağlı insektisit direncine sahip İzmir popülasyonunda *Yavaş* aleli sıklığı yüksek bulunmuştur. Genotipinde *Hızlı* aleli sıklığı yüksek bulunan popülasyonlar Malathion'a daha dirençli gibi görünmektedir. Benzer sonuçların alındığı çalışmalar (El-Abidin Salam and Pinsker, 1981; Peris and Aguade, 1982; White et al., 1988) göz önüne alındığında, bu durum, *Yavaş* alelinin Malathion'a duyarlılığın artışı ile ilgili olduğunu düşündürmektedir.

İnsektisitlere karşı oluşan direncin, *D. melanogaster* ve *Musca domestica*'da tanımlanmış olan AChE geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda gerçekleştiği belirlenmiştir (Fournier et al., 1992; Mutero et al., 1994; Walsh et al., 2001; Weill et al., 2002; Menozzi et al., 2004; Labbe et al., 2007). *Drosophila* doğal populasyonlarında, asetilkolinesteraz (AChE) geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda (fenilalanin'in serin'e, isolösin'in valin'e, glisin'in alanin'e) dirençli AChE oluşumu bildirilmiştir (Morton, 1993). Yapılan bir diğer çalışmada, *D.melanogaster*'in 30 farklı doğal populasyonunda, AChE amino asit sekansında değişime yol açan 18 mutasyon belirlenmiştir. Bu mutasyonların dördünün enzimin aktif bölgesine yakın olarak bulunduğu gösterilmiştir (Menozzi et al., 2004).

*M.domestica*'da organofosfatlı insektisitlere karşı AChE direncinin araştırıldığı çalışmalarda, glisinden tirozine (Kozaki et al., 2001), triptofandan serine (Taşkın and Kence, 2004) nokta mutasyonları belirlenmiştir. Bunun yanında, insektisit direncinin, asetilkolinesteraz miktarında artış (Charpentier ve Fournier, 2001), karışık fonksiyonlu oksidaz aktivitesinde artış (Halpern and Morton, 1987), gen amplifikasyonu (Mouches et al., 1986; Field et al., 1984), duplikasyon (Labbe et al., 2007), glutatyon S-transferazların overtranskripsiyonu (Wang et al., 1991) veya nokta mutasyonlarından (Fournier et al., 1992; Ffrench-Constant, 2006) kaynaklandığına ilişkin çalışmalar vardır.

*D.melanogaster* ve *M.domestica* dışında farklı canlılarla yapılan son araştırmalardan birinde, *Locusta migratoria*'da gözlenen insektisit direncinin pek çok faktör ve mekanizmaya bağlı olduğuna ilişkin bulgular elde edilmiştir (Yang et al., 2008). Bu çalışmada direncin nedeni olarak esteraz ve glutatyon S-transferaz enzimlerinin aktivitelerindeki artış ve AChE duyarlılığındaki azalış gösterilmiştir.

## SONUÇ

Bu tezde yapılan deneylerden elde edilen sonuçlara göre, Türkiye'de bazı yörelerdeki *D.melanogaster* doğal populasyonlarının organofosfat direncinin, asetilkolinesteraza bağlı olduğu görüşü desteklenmektedir. Bulgularımız ayrıca, elde edilen diğer bulgulara paralel şekilde insektisit direnci ile AChE direncinin bağlantılı olduğunu göstermektedir (Taşkın et al., 2007; Baffi et al., 2008). Bu

populasyonlardaki benzer bulgulara paralel olarak, genel esteraz aktivitesi ile organofosfat direnci arasında pozitif bağlantı belirlenememiştir (Taşkın et al., 2007).

*D.melanogaster*'de elde edilen bu bulguların aksine incelenen sivrisinek ve ev sineği türlerinde genel esteraz aktivitesi ile direnç arasında doğru orantılı ilişkiler belirlenmiştir ( Selvi et al., 2005; Selvi et al., 2007). Bu farklılık, direnç oluşumunda pek çok etkenin rol almasından kaynaklanabilir. Örneğin *D.melanogaster*'in laboratuvarında seleksiyonu yapılan dirençli populasyonlarında, Malathion direncini kontrol eden genlerin 2. ve 3. kromozomlarda bulunduğu ve direncin karışık fonksiyonlu oksidazların aktivitelerinin artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Haupt et al., 1988). Ayrıca *D.melanogaster*'in dirençli ve hassas olarak elde edilen doğal populasyonları ile yapılan bir çalışma sonucunda, organofosfat direncinin birbirine bağlı pek çok faktörle ilişkili olarak ortaya çıktığı olasılığı üzerinde durulmuştur (Miyao et al., 2001).

Populasyonlar arası genetik uzaklıklar ile coğrafi konumları arasında Est 6 yönünden korelasyon olmadığı, Est 6 lokusundaki alellerin sıklıklarının genetik sürüklenmeyi öngören “uzaklıkla yalıtım” modeline uymadığı belirlenmiştir.

Çandarlı, Dört Yol ve Antakya populasyonlarının Hardy Weinberg dengesinde olduğu, Ayvalık, Antalya ve Eskişehir populasyonlarının ise dengede olmadığı belirlenmiştir. Eskişehir populasyonunda beklenen heterozigotluk gözlenenenden daha yüksek bulunmuştur. Antalya ve Ayvalık populasyonlarında ise gözlenen heterozigotluk beklenen heterozigotluktan daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, Antalya ve Ayvalık populasyonlarında gözlenen Hardy Weinberg dengesinden sapmaların örneklem rastgeleliğinden kaynaklandığını gösteriyor olabilir.

*D. melanogaster* populasyonlarının dişi ve erkek bireylerinde LC<sub>50</sub> direnç düzeyleri ile coğrafi uzaklıkların matrisinin karşılaştırılması sonucunda aralarında korelasyon bulunmamıştır. Bu sonuç, Malathion'a karşı evrimleşen direncin populasyonların coğrafi konumuna özgü bir örüntü sergilemediğine işaret ediyor olabilir.

Genel esteraz enzim aktivitesi sonuçlarının matrisi oluşturulmuş ve bu matris ile populasyonların direnç düzeyleri matrisi arasında korelasyon olup olmadığı test edilmiştir. Sonuçta elde edilen korelasyon katsayısına göre korelasyon belirlenememiştir. Buna göre, *D.melanogaster* doğal populasyonlarında belirlenen direnç düzeyleri ile genel esteraz enzim aktiviteleri arasında bir ilişkinin olmayabileceği söylenebilir.

Seçilimi yapılmış ve seçilimi yapılmamış populasyonların direnç düzeyleri hem erkek hem de dişi bireylerde birbirleriyle korelasyon içinde bulunmuştur. Seçilim ile beraber direnç düzeyleri artmış olsa bile populasyonlar arasındaki fark korunmuştur.

Seçilimi yapılmış ve seçilimi yapılmamış populasyonların genetik uzaklık değerlerinin korelasyonu test edilmiş ve sonuçların korelasyon içinde oldukları bulunmuştur. Bu sonuç, Est-6 alel sıklıklarının populasyonlar arasındaki sıklık farkı örüntüsünün, bu çalışma kapsamında 5 nesil yapılabilen seçilim ile değişmediğini göstermiştir.

Biyokimyasal yöntemler, direnç mekanizmalarını belirlemek açısından kullanışlı olsalar da, DNA düzeyinde direnç mutasyonlarını araştırmaya olanak sağlamamaktadırlar. Örneğin bu kapsamda yapılan bir çalışmada, *Drosophila*'nın Est 6 gen bölgesinde nükleotid varyasyonları saptanmıştır (Balakirev and Ayala, 2003).

Bu tezden elde edilen veriler ışığında, bundan sonraki çalışmalarda insektisite karşı direncin detaylı olarak incelenmesi için, *D.melanogaster* doğal populasyonlarında AChE gen bölgesinin nükleotid düzeyinde polimorfizminin araştırılması ve dirençli populasyonların seçiliminin beş nesilden daha uzun süre yapılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed, S. And Wilkins, R. M., 2002, Studies on some enzymes involved in insecticide resistance in fenitrothion-resistant and susceptible strains of *Musca domestica* L. (Dipt, Muscidae). J. Appl. Entomol., 126 (9): 510-516.
- Akiner, M.M. and Çağlar, S.S., 2006, The status and seasonal changes of organophosphate and pyrethroid resistance in Turkish populations of the house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), Journal of Vector Ecology, 31 (2): 426-432.
- Aldridge, W.N., 1982, Toxicology of Pesticides, Proceedings of a Seminar (31 Augst-12 Sept 1981 in Sofia Bulgaria), Section I, Chemistry of Pesticides, WHO, Health Aspects of Chemical Safety, Interim Document 9, Copenhagen, pp. 21-39.
- Allendorf, F.W., Mitchell, N., Ryman, N. and Stahl, G., 1977, Isosyme loci in Brown trout (*Salmo trutta* L.): detection and interpretation from population data, Hereditas, 86: 179-190.
- Argentine, J.A. and James, A.A., 1995, Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. Insect. Biochem. Mol. Biol. 25 (5): 621-630.
- Arnason, E. and Chambers, G. K., 1987, Macromolecular interaction and the electrophoretic mobility of Esterase-5 from *Drosophila pseudoobscura*, Biochemical Genetics, Apr. Vol. 25 (3-4): 287-307.
- Ashburner, M., 1989, *Drosophila: A Laboratory Handbook and Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Two volumes: xiii + 1331pp; 434pp.



- Ashour, M-B. A., Harshman, L. G. and Hammock B. D., 1987, Malathion Toxicity and Carboxylesterase Activity in *Drosophila melanogaster*, Pesticide Biochemistry and Physiology, 29, 97-111.
- Ayala, F.J., Balakirev, E. S. and Saez, A. G., 2002, Genetic polymorphism at two linked loci, *Sod* and *Est-6*, in *Drosophila melanogaster*, Gene, 300: 19-29.
- Ayala, F.J., Powell, J.R., Tracey, M.L., Mourao, C.A. and Perez-Salas, S., 1972, Enzyme Variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. Genetics, 70: 113-139.
- Aydinoğlu, H., Dursun, H.Y., Bayraktar, L., Bitki Koruma Ürünleri, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, 336s., 2002.
- Baffi, M.A., Souza, G.R.L., Sousa, C.S., Ceron, C.R. and Bonetti, A.M., 2008, Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephallus* (Boophilus) *microplus* (Acari, Ixodidae). Short Communication, Molecular and Biochemical Parasitology, 160: 70-73.
- Bağrıaçık, E.Ü. and Ünlü, H., 1991, Mutagenic effects of Dichlorvos (DDVP) in *Drosophila melanogaster*, Doğa Tr. J. Of Biology, 15: 108-113.
- Balakirev, E. S. and Ayala, F.J., 2003, Nucleotide Variation of the *Est-6* Gene Region in Natural Populations of *Drosophila melanogaster*, Genetics, Vol. 165, 1901-1914.
- Bozcuk, A. N., 1976, Testing the protein error hypothesis of aging, Experimental Gerontology, Vol. 11, 103-112.
- Bozcuk, A.N., 2005, Genetik, Ünite: Populasyon Genetiği, 383 sayfa, ISBN : 9789757477808, Palme Yayıncılık, Ankara.

- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown, A.W.A., Pal, R., 1971, Insecticide Resistance in Artropods, Nature and characterization of resistance, 2<sup>nd</sup> Edition, World Health Organization, Switzerland, 491 pp.
- Campbell, P.M., Newcomb, R.D., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 1998a, Two different aminoacid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28: 139-150.
- Campbell, P.M., Yen, J.L., Masoumi, A., Russell, R.J., Batterham, P., McKenzie, J.A., Oakeshott, J.G., 1998b, Cross-resistance patterns among *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) resistant to organophosphorus insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 91 (2): 367-375.
- Casida, J.E. and Quistad, G.B., 1998, Golden age of insecticide research: Past, Present, or Future?, *Annu. Rev. Entomol.* 43: 1-16.
- Charpentier, A. and Fournier, D., 2001, Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 70 (2): 100-107.
- Claudianos, C., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 1999, The same amino acid substitution in orthologus esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly, *Insect biochemistry and Molecular Biology*, 29: 675-686.
- Costa, R., Danieli, G.A. And Nigro L., 1982, Genetics and biochemistry of esterase-6 in *Drosophila melanogaster*, *Advances in Genetics, Development*

and Evolution of *Drosophila*, Plenum Press, New York and London, edited by Seppo Lakovaara, New York.

Çakır, Ş. ve Yamanel, Ş., 2005, Böceklerde İsektisidlere Direnç, Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi, Cilt 6 Sayı 1, 21-29.

Dickinson, W.J. and Sullivan, D.T., 1975, Gene enzyme systems in *Drosophila*, Springer-Verlag New York Heidelberg Berlin, Germany, 163pp., ISBN 038706977-1.

Doane, W.W., 1967, Quantitation of amylases in *Drosophila* separated by acrylamide gel electrophoresis, J. Exp. Zool., 164 (3), 363-377.

Durusoy, M., Diril, N. and Bozcuk, A.N., 1995, Age-related activity of catalase in different genotypes of *Drosophila melanogaster*. Exp.Geront., 30(1): 77-86.

Durusoy, M., Diril, N., Bozcuk, A. N. ve Muluk, F.Z., 1996, *Drosophila melanogaster*'in farklı soylarında sıcaklığın katalaz ve glutatyon S-transferaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi, Turkish Journal of Zoology, 20, 261-265.

El-Abidin Salam, A.Z. and Pinsker, W., 1981, Effects of selection for resistance to organophosphorus insecticides on two esterase loci in *Drosophila melanogaster*, Genetica, 55: 11-14.

Ellman, G.L., Courtney, D., Andres, V. Jr. and Featherstone, R.M., 1961, A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochemical Pharmacology, Vol.7, pp 8-95.

Feyereisen, R., 1995, Molecular biology of insecticide resistance, Toxicol. Lett., Dec: 82-83: 83-90.

- Ffrench-Constant, R.H., Daborn, P.J. and Le Goff G., 2004, The genetics and genomics of insecticide resistance, Review, Trends in Genetics Vol.20 No.3: 163-170.
- Ffrench-Constant, R.H., 2006, Which came first: insecticides or resistance?, Trends in Genetics, Vol.23, No.1, 1-4.
- Field, W.N., Hitchen, J.M. and Rees, A.T., 1984, Esterase activity in strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) tolerant and susceptible to the organophosphate insecticide Malathion. J. Med. Ent. 21: 412-418.
- Finney, D.J., 1962, Probit Analysis, Cambridge Univ. Pres. 318p.
- Flessel, P., Quintana, P.J.E., Hooper, K., 1993, Genetic toxicity of Malathion: A review, Environmental and Molecular Mutagenesis, 22, 7-17.
- Flores, A.E., Grajales, J.S., Salas, I.F., Garica, G.P., Becerra, M.H.L., Lozano, S., Brogdon, W.G. et al., 2006, Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico, Journal of the American Mosquito Control Association, Vol.22(4), 672-677.
- Forgash, A. J., 1984, History, evolution and consequence of insecticide resistance, Pesticide Biochemistry and Physiology, 22: 178-186.
- Fournier, D., Karch, F., Bride, J.-M., Hall, L.M.C., Berge, J.-B. and Spierer, P., 1989, *Drosophila melanogaster* Acetylcholinesterase Gene Structure, Evolution and Mutations, J. Mol. Biol., 210, 15-22.
- Fournier, D., Bride, J.M., Hoffmann, F. and Karch, F., 1992, Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticide. J. Biol. Chem. 267: 14270-14274.
- Franklin, I.R., 1981, An analysis of temporal variation at isozyme loci in *Drosophila melanogaster*, p217-236 in Genetic Studies of *Drosophila* populations, Edited

by Gibson, J.B. and Oakeshott, J.G., The Australian National University Press, Canberra.

Futuyma, D., 2008, Evolution (Orjinalinden çevirisi: Evrim, Çeviri editörleri: Kence, A., Bozcuk, A.N.), ISBN: 978-9944-341-84-4, s:632, Ankara

Gilbert, D.G. and Richmond, R.C., 1982, Esterase 6 in *Drosophila melanogaster*: reproductive function of active and null males at low temperature., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol 79, 2962-2966.

Gressel, J. 1986, Genetics, biochemical and physiological mechanisms of resistance to pesticides. Pesticide Resistance Strategies and Tactics for Management. National Research Council, National Academy Press Washington, D.C., USA, p45-56.

Halpern, M.E. and Morton, R.A., 1987, Reproductive and developmental defects in a Malathion resistant laboratory selected population of *Drosophila melanogaster*, Pesticide Biochemistry and Physiology, 28, 44-56.

He, Y., Ma, E., and Zhu, K.Y., 2004, Characterizations of general esterases in relation to Malathion susceptibility in two field populations of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen), Pesticide Biochemistry and Physiology, Vol. 78, 103-113.

Healy, M.J., Dumancic, M.M, and Oakeshott J.G., 1991, Biochemical and Physiological Studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*, Biochemical Genetics, Vol. 29, Nos.7/8, 365-388.

Hedrick, P.W., 2005, Genetics of Populations, 3<sup>rd</sup> edition, Jones and Bartlett Publishers, 737p, Massachusetts, USA.

Hemingway, J., 2000, The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance, Insect Biochem. Mol. Biol., 30: 1009-1015.

Hemingway, J., 1998, WHO (World Health Organization), Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (Field and laboratory manual), WHO/CDS/CPC/MAL/98.6, School of Pure&Applied Biology, University of Wales Cardiff, Atlanta, Georgia. USA.

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

Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K., 1996, *Molecular Systematics*, Chapter 4, p:51-63, 2<sup>nd</sup> edition, Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA.

Haupt, D.R., Pursey, J.C., and Morton, R.A., 1988, Genes controlling Malathion resistance in a laboratory selected population of *Drosophila melanogaster*, *Genome*, 30: 844-853.

İnternet: <http://www.biyosidal.saglik.gov.tr/izinliler.htm>, T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından ruhsatlı olan insektisitler.

İnternet: [www.pesticideresistance.org](http://www.pesticideresistance.org), 2003, The-Database of Arthropod Resistance to Pesticides.

İnternet: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Malathion.png>, Malathion'un kimyasal formülü.

İnternet: [http://www.tarimziraat.com/zirai\\_mucadele\\_ilaclari](http://www.tarimziraat.com/zirai_mucadele_ilaclari), Zararlılara karşı kullanılan insektisitler.

Jeffrey, G.S., 1999, Cytochromes P450 and insecticide resistance, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 757-777.

Kaloyanova, F., 1982, Organophosphates, *Toxicology of Pesticides*, Proceedings of a Seminar (31 Augst-12 Sept 1981 in Sofia Bulgaria), Section III: Toxicity

of Selected Groups of Pesticides, WHO, Health Aspects of Chemical Safety, Interim Document 9, Copenhagen, pp. 133-145.

Karotam, J. and Oakeshott, J.G., 1993, Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. *Heredity*, 71: 41-50.

Kence, M., 1988, Ecological genetics of Malathion resistance in housefly, *Musca domestica* L., PhD. Thesis, 108 pp, METU, Ankara.

Kence, M. and Kence, A., 1993, Control of insecticide resistance in Laboratory Populations of house fly (Diptera: Muscidae) by introduction of susceptibility genes, *Insecticide resistance and resistance management.*, J. Econ.Entomol, 86(2): 189-194.

Khoo, H.G.N., Wong, K.P., Sit, K.H. and Ho B.C., 1992, A Fluorimetric Assay of General Esterase Activity in Individual Larva, Pupa and Adult Mosquito, *Insect Biochem. Molec. Biol.* Vol.22, No.3, 227-235.

Koçak, O., 2000, Zararlı Savaşımı, Hacettepe Üniversitesi, Döner Sermaye İsektisit Test ve Üretim Birimi, 59s, Ankara.

Kozaki, T., Shono, T., Tomita, T. and Kono, Y., 2001, Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica*, associated with point mutations, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 991-997.

Labate, J., Bortoli, A., Game, A.Y., Cooke, P.H. and Oakeshott, J.G., 1989, The number and distribution of esterase 6 alleles in populations of *Drosophila melanogaster*, *Heredity*, 63, 203-208.

Labbe, P., Berthomieu, A., Berticat, C., Alout, H., Raymond, M., Lenormand, T. and Weill, M., 2007, Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*, *Mol. Biol. Evol.*, 24 (4): 1056-1067.

- Lockridge, O., Blong, R.M., Mason, P., Froment, M.T., Millard, C. B. and Broomfield, C. A., 1997, A single amino acid substitution, *Gly His*, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase, *Biochemistry*, 36: 786- 795.
- Lüleyap, Ü. ve Kasap H., 2000, Sitma vektörü *Anopheles sacharovi*' de fizyolojik insektisit direnci, *Turk.J. Biol.*, 24, 437-460.
- Mantel, N., 1967, The detection of disease clustering and a generalized regression approach, *Cancer Research*, 27: 209-220.
- Matsumura, F., 1985, *Toxicology of insecticides*: Plenum Press, New York, USA, 598 pp.
- Maruyama, Y., Yasutomi, K. and Ogita, Z., 1984, Electrophoretic analysis of esterase isozymes in organophosphate-resistant mosquitos (*Culex pipiens*), *Insect Biochem.* Vol. 14 No.2 pp 181-188.
- McKenzie, J.A. and Batterham, P., 1998, Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response, *Phil.Trans.R.Soc.Lond.B.*, 353, 1729-1734.
- McKenzie, J.A., 2000, The character or the variation: the genetic analysis of the insecticide-resistance phenotype, *Bulletin of Entomol. Res.*, 90, 3-7.
- Menzio, P., Shi, M.A., Lougarre, A., Tang, Z.H. and Fournier, D., 2004, Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations, *BMC Evolutionary Biology*, 4:4, 1-7.
- Miyo, T. and Charlesworth, B., 2004, Density-independent population projection trajectories of chromosome-substituted lines resistant and susceptible to organophosphate insecticides in *Drosophila melanogaster*, *BMC Genetics*, 5: 31, 1-9.



- Miyo, T. and Oguma Y., 2002, Negative Correlations Between Resistance to Three Organophosphate Insecticides and Productivity Within a Natural Population of *Drosophila melanogaster* (Diptera: *Drosophilidae*), J. Econ. Entomol. 95 (6), 1229-1238.
- Miyo, T., Takamori, H., Kono, Y. and Oguma Y., 2001, Genetic Variation and Correlations among Response to five Insecticides Within Natural Populations of *Drosophila melanogaster* (Diptera: *Drosophilidae*), J. Econ. Entomol. 94 (1), 223-232.
- Montana, C.M., Anguiano, O.L., Gauna, L.E. and Pechen De D-Angelo, A. M., 2003, Mechanisms of resistance to DDT and pyrethroids in Patagonian populations of *Simulium* blackflies, Medical and Veterinary Entomology, 17, 95-101.
- Mouches, C., Pasteur, N., Berge, J.B., Hyrien, O., Raymond, M., de Saint Vincent, B.R., de Silvestri, M. and Georghiou, G. P., 1986, Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. Science, 233: 778–780.
- Morton, R.A., and Singh, R.S., 1982, The association between Malathion resistance and acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*, Biochemical Genetics, Vol 20, 1-2: 179-198.
- Morton, R.A., 1993, Evolution of *Drosophila* insecticide resistance, Genome, Vol.36, 1-7.
- Mullin, C.A. and Scott J.G., 1992, Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance Diversity Among Insects ACS Symposium Series 505, Washington, DC, USA, p322.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Simeon, V., and Fournier D., 1992, Catalytic properties of cholinesterase: importance of tyrosine 109 in *Drosophila* protein. Neuroreport, 3: 39-42.

- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.-M., and Fournier D., 1994, Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 91 pp., 5922-5926.
- Nascimento, A.P. and de Campos Bicudo H.E.M., 2002, Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the *saltans* subgroup (*saltans* group), *Genetica* 114: 41-51.
- Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Campbell, P.M., Newcomb, R.D. and Russell, R.J., 2005, Biochemical genetics and genomics of insect esterases, Chapter 5.10, CSIRO, Elsevier Publish, 310-363, Australia.
- Oakeshott, J.G., van Papenrecht, E.A., Boyce, T.M., Healy, M.J. and Russell, R.J., 1993, Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases, *Genetica*, 90: 239-268.
- Parsons, P.A., 1973, Genetics of resistance to environmental stresses in *Drosophila* populations, *Annual Review of Genetics*, Vol.7: 239-265.
- Pasteur, N., Iseki, A. and Georghiou, G.P., 1981, Genetic and biochemical studies of the highly active esterases A and B associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex., *Biochemical Genetics*, 19, 909-919.
- Peris F. and Aguade M., 1982, Relationship between selection for resistance to Malathion and variability at three enzyme loci in *Drosophila melanogaster*, *Genet. Iber*, 34: 101-115.
- Plapp, F.W., 1984, The genetic basis of insecticide resistance in the housefly: Evidence that a single locus plays a major role in metabolic resistance to insecticides, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Vol. 22; 194-201.
- Pyke, F.M., Bogwitz, M.R., Perry, T., Monk, A., Batterham, P. and McKenzie, J.A., 2004, The genetic basis of resistance to diazinon in natural populations of *Drosophila melanogaster*, *Genetica*, 121: 13-24.

- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M.V., Unger, M.F., Collins, F.H and Feyereisen R., 2002, Evolution of supergene families associated with insecticide resistance, *Science*, 298, 179-181.
- Raymond, M., Chevillon, C., Guillemaud, T., Lenormand, T. and Pasteur, N., 1998, An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 353, 1707-1711.
- Richmond, R.C., Gilbert, D.G., Sheehan, K.B., 1980, Esterase 6 and reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Science*, Vol. 207, 1485-1485.
- Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L., 2000, Arlequin: A software for population genetics data analysis, Version 2.000, Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Selvi, S., Edah, M.A, Nazni, W.A, Lee, H.L. and Azahari, A.H., 2005, Resistance development and insecticide susceptibility in *Culex quinquefasciatus* against selection pressure of malathion and permethrin and its relationship to cross-resistance towards propoxur, *Tropical Biomedicine* 22: 103-113.
- Selvi, S., Edah, M.A, Nazni, W.A, Lee, H.L. and Azahari, A.H., 2007, Characterization on malathion and permethrin resistance by bioassays and the variation of esterase activity with the life stages of the mosquito *Culex quinquefasciatus*, *Tropical Biomedicine* 24 (1): 63-75.
- Shanmugavelu, M., Baytan, A.R., Chesnut, J.D. and Bonning, B.C., 2000, A novel protein that binds juvenile hormone esterase in fat body tissue and pericardial cells of the tobacco hornworm *Manduca sexta* L., *J. Biol. Chem.*, 275 (3):1802-1806.
- Shaw, C.R. and Prasad, R., 1970, Starch gel electrophoresis of enzymes – A compilation of recipes, *Biochemical Genetics*, 4: 297-320.

- Singh, R.S. and Morton, R.A., 1981, Selection for Malathion resistance in *Drosophila melanogaster*, Can. J. Genet. Cytol., 23: 355-369.
- Taşkın, V. and Kence, M., 2004, The genetic basis of Malathion Resistance in Housefly (*Musca domestica* L.) Strains from Turkey, Russian J. of Genetics, Vol 40, No.11, 1215-1222.
- Taşkın, V., Kence, M. and Göçmen, B., 2004, Determination of Malathion and Diazinon Resistance by sequencing the M $\alpha$ E7 Gene from Guatemala, Colombia, Manhattan and Thailand Housefly (*Musca domestica* L.) Strains, Russian Journal of Genetics, Vol.40, No.4, 377-380.
- Taşkın, V., Küçükakyüz, K., Arslan, T., Çöl, B., Taşkın B.G., 2007, The biochemical basis of insecticide resistance and determination of esterase enzyme patterns by using PAGE in field collected populations of *Drosophila melanogaster* from Muğla province of Turkey, Journal of Cell and Molecular Biology 6 (1): 31-40.
- Tavares, M.G., de Azeredo-Oliveira, M.T.V. and Ceron, C.R., 1998, Tissue-specific expression of esterases in *Triatoma infestans* (Triatominae, Heteroptera), Genet. Mol. Biol., Vol.21, No. 4, 1-6.
- Ugurlu, S. and Gürkan M.O., 2007, Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* from cotton growing areas in Turkey., Phytoparasitica, 35 (4):376-379.
- Umetsu N., Grose, F.H., Allahyari, R., Abu-El-Haj S. and Fukuto, T.R., 1977, Effect of imprinties on the mamalian toxicity of technical Malathion and acephate, J.agric. Food. Chem., 25: 946-953.
- Ünlü, H. and Bozcuk, A.N., 1979, Genetics of longevity in *Drosophila*- I. The effects of *w*, *m* and *f* mutant genes in various genotype combinations, Exp. Geront., 14: 117-124.

- Van Asperen, K., 1962, A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method, *J. Ins. Physiol.*, Vol.8, 401-416.
- Walsh, S. B., Dolden, T.A., Moores, G.D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A.L. and Williamson, M.S, 2001, Identification and characterisation of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance, *Biochem. J.*, 359, 175-181.
- Wang, J.Y., McCommas, S. and Syvanen, M., 1991, Molecular cloning of a Glutathione S-transferase overproduced in an insecticide resistant strain of the housefly (*Musca domestica*), *Molecular & General Genetics*, Vol. 227 (2): 260-266.
- Weill, M., Fort, P., Berthomieu, A., Dubois, M.P., Pasteur, N. and Raymond, M., 2002, A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the *ace* gene in *Drosophila*, *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 269, 2007-2016.
- White, M.M., Mane, S.D. and Richmond, R.C., 1988, Studies of Esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. XVIII. Biochemical differences between the *Slow* and *Fast* allozymes, *Mol. Biol. Evol.*, 5 (1): 41-62.
- Willoughby, L., Chung, H., Lumb, C., Robin, C., Batterham, P. and Daborn, P. J., 2006, A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 934-942.
- Wu, H.H., Yang, M.L., Guo, Y.P., Xie, Z.G. and Ma, E.B., 2007, Comparisons of Malathion susceptibility, target sensitivity, and detoxification enzyme activity in nine field populations of *Oxya chinensis* (Orthoptera : Acrididae), *Journal of Economic Entomology*, Vol. 100 (4): 1409-1415.

Yang, M.L., Zhang, J.Z., Zhu, K.Y., Xuan, T., Liu, X.J., Guo, Y.P. and Ma, E.B., 2008, Mechanisms of Organophosphate Resistance in a Field Population of Oriental Migratory Locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen), Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1-10.

Zhou, H.A. and Syvanen, M.,1997, A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*, Molecular Gene Genetics, 256 (2):187-194.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Burcu Koçak Memmi

**Doğum Yeri** : Ankara

**Doğum Yılı** : 04/05/1977

**Medeni Hali** : Evli, 1 çocuklu

### **Eğitim ve Akademik Durumu:**

**Lise:** 1989-1995 Ankara Özel Tevfik Fikret Lisesi Çankaya/Ankara

**Lisans:** 1996-1999 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Beytepe/Ankara

**Yüksek Lisans:** 1999-2002 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı Genetik Bölümü Beytepe/Ankara

**Yabancı Dil:** İngilizce ve Fransızca

**İş Tecrübesi:** Araştırma Görevlisi, Mart 2000-Eylül 2008 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı Genetik Bölümü Beytepe/Ankara