T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Drosophila melanogaster' de DELTAMETHRIN ve THIAMETHOXAM'A KARŞI OLUŞTURULAN İNSEKTİSİT DİRENCİNDE P450, GST ve ABC SİNYAL YOLAKLARININ ROLÜ

FERAH YAMAÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR

EDİRNE-2019

Ferah YAMAÇ'ın hazırladığı "*Drosophila melanogaster*' de Deltamethrin ve Thiamethoxam'a Karşı Oluşturulan İnsektisit Direncinde P450, GST ve ABC Sinyal Yolaklarının Rolü'' başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalınca bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Juri Üyeleri

Prof.Dr. Oğuzhan Doğanlar

Prof.Dr. Ahmet Bayram

Doç.Dr. Cem Tokatlı

Tez Savunma Tarihi: 04 /02 /2019

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli, şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof.Dr.Oğuzhan DOĞANLAR
Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof.Dr.Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğine, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığına, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığına, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığı ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

04/02/2019

Ferah YAMAÇ

Yüksek Lisans Tezi

Drosophila melanogaster'de Deltamethrin ve Thiamethoxam'a Karşı Oluşturulan İnsektisit Direncinde P450, GST ve ABC Sinyal Yolaklarının Rolü

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

İnsektisitler, insan ve çevre sağlığını olumsuz yönde etkileyen zararlılarla mücadelede kullanılan kimyasal savaş etmenleridir. İnsektisitlere karşı direnç, pestisitlerin etkili dozunun ya da daha yüksek dozlarınının kullanılması sonucu hedef zararlı popülasyonunun genetik değişikliklerle kullanılan insektisite karşı duyarlılığında azalma oluşturarak tarım zararlıları, hastalık vektörleri ve halk sağlığı zararlılarıyla mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Direnç gelişimi, entegre zararlı mücadele yönetimi stratejilerini olumsuz etkileyerek, dirençli böceklerle mücadelede daha fazla miktarlarda pestisit kullanımını gerektirmekte ve bu da su, toprak ve hava kirliliğine neden olmaktadır. Piretroid sınıfı, Deltamethrin ve Neonikotinoid insektisit sınıfından Thiamethoxam, çeşitli ev, çevre ve tarımsal zararlılara karşı yoğun olarak kullanılmakta olan insektisitlerdir. İnsektisit uygulaması yapılan zararlı böcek popülasyonlarının büyük bir kısmı birkaç gün içinde ölürken detoksifikasyon yeteneği geliştirebilen dirençli böcekler hayatta kalabilmektedir. Çalışmalar, zararlı böcek popülasyonlarının güçlü bir ilaç direnç mekanizması geliştirebildiğini göstermiş olmasına rağmen direnç mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, yapılan çalışmalar insektisitlere uzun süreli ve tekrarlayan subletal dozlarda yaşam boyu maruziyetin çoklu ilaç direncinin gelişmesinde hücresel mikro çevrenin, transkripsiyonel düzenlemenin, metabolik aktivite ve bu gibi hücresel değişikliklerin bir cevap oluşturabileceğini göstermiştir. Son çalışmalar, böceklerdeki çoklu ilaç direnç mekanizmalarında Sitokrom P-450 Monooksijenaz, Glutatyon S-Transferaz

enzimleri ve ABC (ATP bağlayıcı kaset) taşıyıcı proteinlerinin önemli bir rol oynadığını göstermiştir.

Bu tezin amacı Deltamethrin ve Thiamethoxam'ın tekli ve kombine olarak uygulamalarının normal ve dirençli *Drosophila melanogaster* bireylerinde çoklu ilaç direncine neden olan moleküler mekanizmaları açıklamak ve pestisit uygulamalarının antioksidan, ısı şok proteinleri ve apoptoz gibi önemli hayati sinyal yolları üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Bu kapsamda, her iki insektisitin dirençli ve normal *Drosophila melanogaster* bireylerinde çoklu ilaç direnci, böcek canlılığı, oksidatif stres, ısı şoku ve apoptozun tepkisini qRT-PCR analiz yöntemi ile, morfolojik analizler ise stereo mikroskop ile görüntülenerek analiz edilmiştir..

Deltamethrin ve Thiamethoxam'ın tekli ve kombine olarak uygulamalarının multijenerasyonel sonucu olarak, *Drosophila melanogaster* dirençli bireylerinde kontrollere kıyasla LD_{50} seviyeleri Deltamethrin'de 1.92 kat, Thiamethoxam'da 9.2 kat ve Deltamethrin+Thiamethoam'da 2.4 kat artış oluştuğu belirlenmiştir. Sonuçlarımız, CYP6A2, GSTE1 ve SUR genlerinin LD_{50} dozlarındaki Deltamethrin ve Thimethoxamın tekli ve kombine olarak uygulamalarında *Drosophila melanogaster* erginlerinde gelişen çoklu ilaç direncinde, sırasıyla P450 detoksifikasyon mekanizması, S-transferaz ve ABC kaset protein pompalarını aktif hale geçirerek önemli bir rol oynadığını göstermiştir. İlave olarak, kontrollere kıyasla dirençli sineklerde güçlü antioksidan savunma sinyalleri, ısı şoku tepkisi ve apoptoz regülasyonu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, tez bulgularımızın *Drosophila melanogaster* sineklerinin çoklu ilaç direnci ve altında yatan moleküler mekanizmalarının daha derinden anlaşılması için temel teşkil edeceğini ve önemli zararlı böceklerde çoklu ilaç direnci konusunda daha ileri araştırmalar yapmak ve yeni ve etkili pestisit geliştirme stratejilerini geliştirmek için kullanılacağını düşündük.

Yıl : 2019
Sayfa Sayısı : 131
Anahtar Kelimeler : Multijenerasyonel maruziyet, Deltamethrin, Thiamethoxam, P450, GST, ABC gen ifadeleri, *Drosophila melanogaster*

Master's Thesis

The Role of P450, GST and ABC Signal Pathways Against to Resistance Deltamethrin and Thiamethoxam in *Drosophila melanogaster*

Trakya University Institute of Natural Sciences

Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

Insecticides are an indispensable pest control agents and well known environmental pollutant which is lethally affect several biological live form as well as human. Resistance to insecticides is a heritable genetic change in the sensitivity of a target insect population that is responses in the repeated failure of effective dose of pesticides, and is main reason in collapse of control strategies for insect pests, plant diseases vector and household insect pests. Resistance development, as it adversely affects the all pest management strategies, pesticides used in large amounts to control resistant widely insects lead to water, soil and air pollution. Deltamethrin is one of used synthetic pyretroid and Thiamethoxam, main member of neonicotinoids are intensively used against various household, environmental and agricultural pests. In this sprayed area, the vast majority of pest population die within a few days, but remain insects with detoxification capable can survive. Studies indicated that these pest populations can develop a strong drug resistance mechanism. And yet, the cause of this resistance-mechanism has not been clearly understood. However, the latest studies showed that as well as exposure to contact with insecticides, long-term treatments, and repetitive subletal doses of pesticide applications during a lifespan may change the conditions of cellular microenvironment, transcriptional regulation, metabolic activity and these alterations might create a cellular condition responsible for the development of multidrug resistance. Recent studies have shown that cytochrome P-450 monooxygenase, glutathione S-transferase enzymes and ABC (ATP

binding cassette) carrier proteins play an important role in multiple drug resistance mechanisms in insects.

The aim of this thesis to explain the possible molecular mechanisms by which single and combined application of Deltamethrin and Thiamethoxam results in multi drug resistance and to investigate the effects of pesticide applications on important vital signalling pathways such as antioxidant, heat shock proteins and apoptosis in both normal and drug resistance *Drosophila melanogaster* populations. We analysed the cellular and molecular effects of both insecticides on multidrug resistance, insect viability, oxidative stress, heat shock response, and induction of apoptosis in resistance and normal *Drosophila melanogaster* population using stereo microscope, morphometric analysis and qRT-PCR assays.

As a result of multigeneration single and combined applications of Deltamethrin and Thiamethoxam, the LD_{50} level increased 1.92 fold for Deltamethrin, 9.2 fold for Thiamethoxam and 2.4 times for Deltamethrin + Thiamethoxam compared to their respective control of Drosophila flies. Our result indicated that the CYP6A2, GSTE1 and SUR genes played major role of multidrug resistance mechanisms to Deltamethrin and Thiamethoxam in *Drosophila melanogaster* flies via activating P450 detoxification pathway, cellular S-transferase and cassette protein pumps. Additionally, the strong antioxidant defence signals, heat shock response and regulation of apoptosis were clearly determined particularly in resistance flies compared to controls.

In conclusion we thought that, our result will form the baseline for a deeper understanding of the multidrug resistance and underlying molecular mechanisms of *Drosophila melanogaster* flies and will be used to further studies on multidrug resistance in important insect pests and improve new and effective pesticide development strategies.

Year : 2019
Number of Pages : 131
Keywords : Multigenerational exposure, Deltamethrin, Thiamethoxam, P450, GST, ABC gen expressions, *Drosophila melanogaster*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kıymetli zamanını ayırıp her sorumla sabırla ilgilenen, danışmanlığını, güler yüzünü ve sempatisini hiçbir zaman esirgemeyen, mesleki hayatımda da edindirdiği bilgilerden faydalanabileceğimi düşündüğüm saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a,

TÜBİTAK projesinde asistan olarak çalışma imkanı veren Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR'a,

Çalışmamın deneylerini gerçekleştirdiğim Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na,

Maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan AİLEME teşekkürü bir borç biliyor şükranlarımı sunuyorum.

Yüksek lisans tezimi 2016 yılında LÖSEMİ hastalığı teşhisi alan ve 2017 yılında hastalığı sebebiyle kaybettiğimiz canım ablam, dostum, yoldaşım Figen YAMAÇ ALTINTOPRAK'a ithaf ediyorum.

Ferah YAMAÇ

EDİRNE/ŞUBAT/2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET……..i

ABSTRACT…….iii

TEŞEKKÜR……..v

İÇİNDEKİLER……vi

SİMGELER DİZİNİ……xii

KISALTMALAR DİZİNİ……..xiii

ÇİZELGELER DİZİNİ……..xvi

ŞEKİLLER DİZİNİ……...xvii

BÖLÜM 1:GİRİŞ……1

BÖLÜM 2: GENEL BİLGİLER……..5

2.1. Model Organizma Olarak *Drosophila melanogaster*…….5

2.1.1. *Drosophila melanogaster* Biyolojisi……...5

2.2. İnsektisitler……7

2.2.1. Deltamethrin……7

2.2.2. Thiamethoxam……...10

2.3. İnsektisit Direnci……...13

2.4. İnsektisitlere Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları……..15

2.4.1 Metabolik Direnç……15

2.4.2 Hedef Bölge Direnci……...16

2.4.3 Davranışsal Direnç……17

2.4.4 Penetrasyon Direnci……17

2.4.5 Çapraz Direnç……18

2.4.6 Çoklu Direnç……...18

2.5 Böceklerde Detoksifikasyon Mekanizmaları……19

2.5.1 Sitokrom P450 Monooksijenazlar……..20

2.5.2 Glutatyon S – Transferazlar……22

2.5.3 ATP Bağlayan Kaset (ABC) Taşıyıcı Protein Ailesi…….24

2.5.3.1 ABCB Ailesi……27

2.5.3.2 ABCC Ailesi……27

2.6. Apoptoz Yolağı Genleri……....29

2.7. Antioksidan Yolak Genleri……...30

2.8. HSP (Isı Şok Proteinleri) Yolağı Genleri……31

BÖLÜM 3: MATERYAL VE YÖNTEM……...33

3.1. *Drosophila melanogaster* Stok Kültürü……...33

MATERYALLER……...34

YÖNTEMLER……35

3.2. *Drosophila melanogaster* Kültürü ve Yetiştirilmesi……35

3.2.1. Besiyeri Hazırlanması……36

3.3. İnsektisit Uygulamaları……37

3.3.1. Deltamethrin Uygulaması……..37

3.3.1.1. Deltamethrin LD_{50} Doz Belirlenmesi……...38

3.3.2. Thiamethoxam Uygulaması……...38

3.3.2.1. Thiamethoxam LD_{50} Doz Belirlenmesi…….38

3.3.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulaması…….....39

3.3.3.1. Deltamethrin+Thiamethoxam LD_{50} Doz Belirlenmesi……39

3.4. Dirençli Nesil Yetiştirilmesi……40

3.4.1. Dirençli Nesillerde LD_{50} Hesaplanması……...41

3.5 Ağız Aspiratörü ile Çekme Yöntemi……42

3.6.Genetik Analizler……...43

3.6.1. Doku Homojenizasyonu……43

3.6.2. RNA İzolasyonu……44

3.6.3. RNA Miktarının Belirlenmesi ve cDNA Eldesi……46

3.6.4. qRT-PCR (Gerçek Zamanlı – Polimeraz Zincir Reaksiyonları)……...48

3.7. Morfolojik Analizler……51

3.7.1. Kontrol ve Dirençli *Drosophila. Melanogaster*'lerde Yüzde Ağırlık Kaybı……51

3.7.2. Kontrol, Duyarlı ve Dirençli Bireylerin Stereo Mikroskop ile Görüntülenmeleri52

3.8. İstatistik Analizler……53

3.8.1. qRT-PCR Analizleri……..53

3.8.2. Yüzde Ağırlık Kaybı Analizleri……53

BÖLÜM 4: SONUÇLAR……55

4.1. Duyarlı Bireylerde İnsektisitlerin LD_{50} Dozlarının Belirlenmesi……55

4.1.1. Deltamethrin……..55

4.1.2. Thiamethoxam……...57

4.1.3. Deltamethrin+Thiamethoxam……58

4.1.3.1. Deltamethrin……...59

4.1.3.2. Thiamethoxam……59

4.2. Dirençli Bireylerde İnsektisitlerin LD_{50} Dozlarının Belirlenmesi……...60

4.2.1. Deltamethrin……..60

4.2.2. Thiamethoxam……...61

4.2.3. Deltamethrin+Thiamethoxam……62

4.2.3.1. Deltamethrin……...63

4.2.3.2. Thiamethoxam……64

4.3. Gen Ekspresyon Analizleri……...65

4.3.1. Sitokrom P-450 Monooksijenaz Enzim Ailesi Gen Ekspresyon Analizleri……..65

4.3.1.1. Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde P-450 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……...65

4.3.1.2. Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde P-450 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……...66

4.3.1.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde P-450 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……67

4.3.2. Glutatyon S-Transferaz (GST) Enzim Ailesi Gen Ekspresyon Analizleri……68

4.3.2.1. Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde GST Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……68

4.3.2.2. Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde GST Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……69

4.3.2.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde GST Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……70

4.3.3. ABC Taşıyıcı Protein Ailesi Gen Ekspresyon Analizleri……..71

4.3.3.1. ABC-B Alt Ailesi Gen Ekspresyon Analizleri……...72

4.3.3.1.1. Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde ABC-B Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……72

4.3.3.1.2. Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde ABC-B Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……73

4.3.3.1.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde ABC-B Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri…..73

4.3.3.2 ABC-C Alt Ailesi Gen Ekspresyon Analizleri……74

4.3.3.2.1 Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde ABC-C Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……74

4.3.3.2.2 Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde ABC-C Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……....75

4.3.3.2.3 Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde ABC-C Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri…….76

4.3.3.3 Çoklu İlaç Aktif Pompa Sistemi Gen Ekspresyon Düzeyleri……..77

4.3.3.3.1 Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde MET Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……77

4.3.3.3.2 Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde MET Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……78

4.3.3.3.3 Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde MET Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri…….79

4.3.4. Apoptoz Yolağı Gen Ekspresyon Analizleri…….80

4.3.4.1. Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde Apoptoz Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……..80

4.3.4.2. Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde Apoptoz Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……..81

4.3.4.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde Apoptoz Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……82

4.3.5. Antioksidan Yolak Genleri Ekspresyon Analizleri……...83

4.3.5.1 Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde Antioksidan Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri…….83

4.3.5.2. Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde Antioksidan Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri…….84

4.3.5.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde Antioksidan Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……..85

4.3.6. HSP Genleri Ekspresyon Analizleri……..86

4.3.6.1 Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde HSP Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……87

4.3.6.2 Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde HSP Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri…….88

4.3.6.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde HSP Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri……..89

4.4. Morfolojik Analizler…….90

4.4.1. Deltamethrin Uygulanmasının Deltamethrin 5. Nesil Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinin Morfolojileri Üzerine Etkisi…….91

4.4.2. Deltamethrin Uygulanmasıın Duyarlı *Drosophila melanogaster* Bireylerinin Morfolojileri Üzerine Etkisi……92

4.4.3. Thiamethoxam Uygulanmasının Thiamethoxam 5. Nesil Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinin Morfolojileri Üzerine Etkisi…….93

4.4.4. Thiamethoxam Uygulanmasıın Duyarlı *Drosophila melanogaster* Bireylerinin Morfolojileri Üzerine Etkisi……94

4.4.5. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Deltamethrin+Thiamethoxam 5. Nesil Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinin Morfolojileri Üzerine Etkisi…..95

4.4.6. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasıın Duyarlı *Drosophila melanogaster* Bireylerinin Morfolojileri Üzerine Etkisi……96

4.5. Yüzde Ağırlık Kaybı Analizleri……...97

BÖLÜM 5: TARTIŞMA……...100

KAYNAK LİSTESİ……..115

EK……..128

ÖZGEÇMİŞ……...130

BİLİMSEL FAALİYETLER ……....131

SİMGELER DİZİNİ

% : Yüzde değer

Ca^{+} : Kalsiyum

CN : Siyano

Cu : Bakır

FeII-CO : Demir (II) karbonil

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

kDa : Kilo dalton

kg : Kilogram

$LOO^{\cdot}$: Lipit peroksil

mg : Miligram

Mn : Mangan

Na^{+} : Sodyum

$O_2^{\cdot}$: Süperoksit radikali

ºC : Santigrat derece

$OH^{\cdot}$: Hidroksil radikali

ppm : Milyonda bir

$RO_2^{\cdot}$: Peroksil

Zn : Çinko

µg : Mikrogram

KISALTMALAR DİZİNİ

ABC : ATP bağlayan kaset proteinleri
ABCB-FT : ABCB tam taşıma
ABCB-HT : ABCB yarı taşıma
ADP : Adenozin Difosfat
APRD : Arthropod Pestisit Direnç Veri Tabanı
ATP : Adenozin tri fosfat
BAX : BCL2 ilişkili X, apoptoz düzenleyicisi
BBB : Kan beyin bariyeri
BCL2 : B-hücre CLL/lemfoma 2
BTF : Bazal Transkripsiyon Faktör
CAS3 : Sistein Aspartik Asit Proteaz 3
CAT : Katalaz
CYP12D1 : Sitokrom P450-12d1
CYP6A2 : Sitokrom P450-6a2
CYP6G1 : Sitokrom P450-6g1
DDE : Dikloro-difenil-dikloroetilen
DDT : Dikloro Difenil Trikloroethan
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
GCL : Glutamin Sistein Ligaz
GCLC : Glutamin Sistein Ligaz Katalitik
GCLM : Glutamin Sistein Ligaz Düzenleyici
GPx : Glutatyon Peroksidaz
GR : Glutatyon Redüktaz
GS- : Glutatyon Sentetaz

GSH : Glutatyon

GSH-Px : Glutatyon Peroksidaz

GSS : Glutatyon Sentetaz

GSSG : Okside Glutatyon

GST : Glutatyon S- Transferaz

GSTD1 : Glutatyon S-transferaz D1

GSTD5 : Glutatyon S-transferaz D5

GSTE1 : Glutatyon S-transferaz E1

HSP : Isı Şok Proteinleri

HSP27 : Isı Şoku Proteini 27

HSP60 : Isı Şoku Proteini 60

HSP70 : Isı Şoku Proteini 70

Inter pro : Bütünleştirici Protein Veri Tabanı

IRAC : İnsektisit Direnç Veri Komitesi

K_{ATP} : ATP bağımlı potasyum kanalları

Kdr : Ani etki direnci

MDR49 : Çoklu İlaç Direnci 49

MDR50 : Çoklu İlaç Direnci 50

MDR65 : Çoklu İlaç Direnci 65

MET : Çoklu İlaç Aktif Pompa Sistemi

MRP1 : Çoklu İlaç Direnci İlişkili Protein 1 (dMRP)

nAChR : Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri

NBD : Nükleotid bağlayan bölge

OATP : Organik Anyon Taşıma Proteini

P-450 : Sitokrom P450 Monooksigenaz

P53 : Tümör protein 53

PBO : Piperonyl butoxide

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA : Ribo Nükleik Asit

RNAi : RNA interferans

RP49 : Ribozomal Protein L32

SOD : Süperoksid dismutaz 1 (Cu-Zn SOD)

SOD2 : Süperoksid dismutaz 2 (Mn-SOD)

SUR : Sulfonilüre Reseptörü

TMD : Transmembran bölge

TRF : Trans Düzenleyici Faktör

VKSK : Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. RNA miktarları ve RNA saflıkları……..47

Çizelge 3.2. qRT-PCR reaksiyonu için kullanılan primerler……...49

Çizelge 4.1. Deltamethrinin duyarlı bireylerde LD_{50} analizi için uygulama dozları ile ölü, canlı ve total birey sayıları……...56

Çizelge 4.2. Thiamethoxam duyarlı bireylerde LD_{50} analizi için uygulama dozları ile ölü, canlı ve total birey sayıları……...57

Çizelge 4.3. Deltamethrin+Thiamethoxamın duyarlı bireylerde LD_{50} analizi için uygulama dozları ile ölü, canlı ve total birey sayıları…….58

Çizelge 4.4. Deltamethrin dirençli bireylerde LD_{50} analizi için uygulama dozları ile ölü, canlı ve total birey sayıları……....60

Çizelge 4.5. Thiamethoxam dirençli bireylerde LD_{50} analizi için uygulama dozları ile ölü, canlı ve total birey sayıları……...61

Çizelge 4.6. Deltamethrin+Thiamethoxam dirençli bireylerde LD_{50} analizi için uygulama dozları ile ölü, canlı ve total birey sayıları…….63

Çizelge 4.7. İnsektisit uygulama gruplarının duyarlı ve dirençli bireylerdeki LD_{50} dozlarının değişimi……..64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü……..6
Şekil 2.2. Deltamethrin'in 2D yapısı……7
Şekil 2.3. *Chrysanthemum cinerariaefolium*……....8
Şekil 2.4. Sentetik piretroidli insektisitlerin hedef aldığı bazı zararlı türleri……9
Şekil 2.5. Thiamethoxam'ın 2D yapısı……10
Şekil 2.6. Önemli neonikotinoid insektisitler ve piyasaya giriş yılları……..……11
Şekil 2.7. Neonikotinoid insektisitlerin hedef aldığı bazı önemli zararlı türleri…….12
Şekil 2.8. Neonikotinoidlerin ekosistem üzerindeki etkileri……...13
Şekil 2.9. İnsektisitlere direnç gelişimi……...14
Şekil 2.10. 1914-2015 yılları arasında arthropodlarda insektisit direncinin evrimi……15
Şekil 2.11. İnsektisit direncinde P-450 geninin düzenlenmesi……21
Şekil 2.12. P450 terminoloji şeması……22
Şekil 2.13. GST'lerin DDT dehidroklorinaz aktivitesinin modeli……...24
Şekil 2.14. ATP aktarım mekanizması……25
Şekil 3.1. *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ Stereo mikroskop görüntüsü……...34
Şekil 3.2. 25±1ºC sıcaklık ve %60±70 oransal nem koşullarına sahip soğutuculu inkübatör……36
Şekil 3.3. *Drosophila melanogaster* stok kültürü……...37
Şekil 3.4. Sineklerin insektisit uygulamaları için boş şişelere aktarılması……..…..39
Şekil 3.5. *Drosophila melanogaster* dirençli nesil yetiştirilmesi……41
Şekil 3.6. 5. Nesil Deltamethrin dirençli *Drosophila melanogaster*'lere LD_{50} uygulamaları……42
Şekil 3.7. Ağız aspiratörü ile çekme yöntemi.....……..……..43
Şekil 3.8. Homojenizatör (A), İnkübatör Blok (B)……44

Şekil 3.9. Santrifüj cihazı (A) ve Vorteks (B)…….45

Şekil 3.10. Nanodrop Cihazı……..……46

Şekil 3.11. cDNA mix protokolü……47

Şekil 3.12. Thermal döngü-PCR Cihazı……..48

Şekil 3.13. Real Time PCR Cihazı……..51

Şekil 3.14. qRT-PCR 5. nesil örneklerin amplifikasyon görüntüsü……....51

Şekil 3.15. Hassas terazi……..52

Şekil 3.16. Stereo mikroskop……..……...53

Şekil 4.1. Deltamethrinin Probit analiz ile LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği……..56

Şekil 4.2. Thiamethoxamın Probit analiz ile duyarlı bireylerde LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği……..57

Şekil 4.3. Deltamethrin+Thiamethoxam için Deltamethrinin Probit analiz ile duyarlı bireylerde LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği……....59

Şekil 4.4. Deltamethrin+Thiamethoxam için Thiamethoxamın Probit analiz ile duyarlı bireylerde LD_{-50} dozunun belirlenmesi grafiği……...59

Şekil 4.5. Deltamethrinin Probit analiz ile dirençli bireylerde LD_{50} dozunun belirlenmesi
grafiği……..…….61

Şekil 4.6. Thiamethoxamın Probit analiz ile dirençli bireylerde LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği…….....62

Şekil 4.7. Deltamethrin+Thiamethoxam için Deltamethrinin Probit analiz ile dirençli bireylerde LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği……....63

Şekil 4.8. Deltamethrin+Thiamethoxam için Thiamethoxamın Probit analiz ile dirençli bireylerde LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği…….64

Şekil 4.9. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra P-450 enzim ailesine ait CYP6A2, CYP12D1 ve CYP6G1 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, $P<0.05$)……66

Şekil 4.10. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra P-450 enzim ailesine ait CYP6A2, CYP12D1 ve CYP6G1 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, $P<0.05$)……...67

Şekil 4.11. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra P-450 enzim ailesine ait CYP6A2, CYP12D1 ve CYP6G1 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, $P<0.05$)…….68

Şekil 4.12. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra GST enzim ailesine ait GSTD1, GSTD5 ve GSTE1 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)……..69

Şekil 4.13. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra GST enzim ailesine ait GSTD1, GSTD5 ve GSTE1 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)……..70

Şekil 4.14. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra GST enzim ailesine ait GSTD1, GSTD5 ve GSTE1 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)……...71

Şekil 4.15. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra ABC-B enzim ailesine ait MDR49, MDR50 ve MDR65 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05)……72

Şekil 4.16. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra ABC-B enzim ailesine ait MDR49, MDR50 ve MDR65 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05)……73

Şekil 4.17. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra ABC-B enzim ailesine ait MDR49, MDR50 ve MDR65 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05) ……...74

Şekil 4.18. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra ABC-C protein ailesine ait MRP1 ve SUR gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)…….75

Şekil 4.19. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra ABC-C protein ailesine ait MRP1 ve SUR gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)……...…..76

Şekil 4.20. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra ABC-C protein ailesine ait MRP1 ve SUR gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)……..77

Şekil 4.21. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulanmasından 24 saat sonra MET geninin ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05)……..….78

Şekil 4.22. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulanmasından 24 saat sonra MET geninin ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05)…….79

Şekil 4.23. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulanmasından 24 saat sonra MET geninin ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05)……80

Şekil 4.24. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra Apoptoz yolağına ait BAX, BCL2, ve CAS3 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)……..81

Şekil 4.25. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra Apoptoz yolağına ait BAX, BCL2, ve CAS3 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05)…….82

Şekil 4.26. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra Apoptoz yolağına ait BAX, BCL2, ve CAS3 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05)……83

Şekil 4.27. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra Antioksidan yolağına ait GS, CAT, SOD ve SOD2 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05)…….84

Şekil 4.28. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra Antioksidan yolağına ait GS, CAT, SOD ve SOD2 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, Ortalama±standart hata *ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)……..……..……..85

Şekil 4.29. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra Antioksidan yolağına ait GS, CAT, SOD ve SOD2 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)……...86

Şekil 4.30. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra HSP yolağına ait HSP27, HSP60 ve HSP70 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize

edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)……..87

Şekil 4.31. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra HSP yolağına ait HSP27, HSP60 ve HSP70 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)……...……..88

Şekil 4.32. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra HSP yolağına ait HSP27, HSP60 ve HSP70 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)……..89

Şekil 4.33. Deltamethrin 5. nesil dirençli bireylerde ortaya çıkan morfolojik anormallikler……91

Şekil 4.34. Deltamethrin uygulaması yapılan duyarlı bireylerde ortaya çıkan morfolojik anormallikler……92

Şekil 4.35. Thiamethoxam 5. nesil dirençli bireylerde ortaya çıkan morfolojik anormallikler……93

Şekil 4.36. Thiamethoxam uygulaması yapılan duyarlı bireylerde ortaya çıkan morfolojik anormallikler……..94

Şekil 4.37. Deltamethrin+Thiamethoxam 5. nesil dirençli bireylerde ortaya çıkan morfolojik anormallikler……..95

Şekil 4.38. Deltamethrin+Thiamethoxam uygulaması yapılan duyarlı bireylerde ortaya çıkan morfolojik anormallikler……96

Şekil 4.39. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ erkek ve dişi ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulanmasından 24 saat sonra vücut ağırlığı değişimleri. Veriler n=10, Ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)……. 98

Şekil 4.40. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ erkek ve dişi ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulanmasından 24 saat sonra vücut ağırlığı değişimleri. Veriler n=10, Ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)……. 98

Şekil 4.41. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ erkek ve dişi ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulanmasından 24 saat sonra vücut ağırlığı değişimleri. Veriler n=10, Ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)…….. 99

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Böcekler birçok farklı ekosistem (ekvator, kutup, deniz, tatlı su kara v.b) koşullarında yaşayabilme özelliğindedirler. Çeşitli antropojenik etkenler ile çevresel koşulların olumsuzluklarına maruz kalmamak veya bu maruziyetleri minimum seviyeye indirmek için, böcekler bir dizi morfolojik, fizyolojik ve davranışsal değişiklik veya adaptasyonlar geliştirmişlerdir. Bu adaptasyonlar genetik özellikler tarafından yönetilir ve genellikle çevresel etkilere bir yanıt olarak geliştirilir. Böceklerin yeryüzünde en baskın organizmalardan biri haline gelmesinde bu adaptasyonlar önemli bir rol oynamıştır (Sheikh, Rehman, & Kumar, 2017).

İnsanların doğaya verdikleri zararlar çevre kirliliği olarak geri dönmektedir. Çevre kirliliği; su, hava, ses ve gürültü kirliliği ile sanayi atıkları, artan nüfus yoğunluğu ve şehirleşmenin getirdiği kirlilikleri kapsamaktadır. Gelişen teknolojilerin oluşturduğu zarar, artan enerji ihtiyacı, sanayileşme, şehirleşme, yapılan yanlış yatırımlar gibi olgular doğayı tahrip ederek ekosistemlerin dengesinin bozulmasına yol açmaktadır. İnsanların doğada oluşturdukları bu tahribatlar bitki, böcek ve hayvanların doğal ekosistemlerini değiştirerek türlerin yeniden dağılımına neden olmaktadır. Antropojenik etkilerden biri pestisit olarak bilinen kimyasalların kullanılmasıdır. Günümüzde halk sağlığı, bitki koruma ve hayvancılıkta yoğun olarak kullanılan pestisitler; insektisitler, fungisitler, akarisitler, nematisitler ve herbisitler gibi pek çok grubu içermektedir. Böcekler, besin temini, konukçu bulma, barınma ve üremenin yanında doğada zararlı

kirleticilerin etkisinden sakınmak için çeşitli uyumlar gösterirler. Böceklerin habitatlarının bozulması türler arasında besin rekabetini oluşturarak türlerin yok olmasına, konukçusu olduğu türlerin azalmasına, doğal düşmanlarının yok olmasına neden olmaktadır. Monokültür tarım yapılan alanlarda tarım ürününde zarar oluşturan böceğin zararını bertaraf etmek için kontrolsüzce ve yoğun miktarda yapılan pestisit uygulamaları o bölgede böceklerin uygulanan pestisit ve onunla aynı sınıfta yer alan bileşiklere karşı "dirençli" hale gelmelerine neden olabilmektedir. Aynı zamanda tarım alanlarına yeni bir tarım ürünün girmesi bu ürünün konukçularının ortama girmesine neden olur ve dolayısıyla doğal düşmanı da bulunmayan bu böcekler "zararlı" türlere dönüşür ve yeni tehditlere yol açarlar (Matsumura, 2012; Horrigan, Lawrence, & Walker, 2002; Kizlinski, Orwig, Cobb, & Foster, 2002; Orwig, 2002). Zararlı böceklerle mücadelede uygulanan türe özgü olmayan, doğada kalıcılığı yüksek olan insektisitler, ekosistemde böceklerin oluşturdukları zarardan daha büyük zararlar doğurmaktadırlar. İnsektisit uygulamaları, böcek habitatlarını değiştirmenin yanı sıra toprak ve yer altı suları kirliliği gibi önemli çevre sorunlarına yol açmaktadırlar (Timothy D Schowalter, 2016).

Böcekler, ekolojik dengenin önemli bir bileşeni olup besin zincirinin ilk halkasında yer alan primer tüketicileri oluşturmaktadırlar. Böceklerin besin zincirindeki rolü doğa ve insanlar için faydalı iken bazı hastalıkların vektörü olmaları, pek çok yeni oluşan ve etkinliğini yitirmiş olarak yeniden ortaya çıkan hastalıkların epidemi yapmalarına neden olurlar. Sivrisinekler; sıtma (Krogstad, 1996), dang humması (Gubler & Clark, 1995), sarıhumma (Sanders vd., 1996), zika virüsü (Campos, Bandeira, & Sardi, 2015) gibi vektör kaynaklı hastalıkların yayılmasına neden olurken, kum sinekleri; leismanya (Meslin, 1997), keneler; lyme hastalığı (Daniels, Falco, Schwartz, Varde, & Robbins, 1997), pire ve bitler; bartonella (Jackson & Spach, 1996), pire, bit ve keneler; riketsia (Azad, Radulovic, Higgins, Noden, & Troyer, 1997) gibi hastalıklara vektörlük yapmaktadırlar.

İnsektisit uygulaması yapılan böceklerin bazıları ölürken, bazı böcekler de çeşitli metabolik ya da metabolizma bağımlı fiziksel yollarla direnç geliştirirler. Genetik özelliklerle kontrol edilen bu mekanizmalar gelecek nesillere aktarılarak pestisitlere dirençli yeni nesillerin insan sağlığını ve tarım ürünlerini tehdit edebilecek düzeye ulaşmasına sebep olabilirler (Hemingway, Field, & Vontas, 2002). Direnç gelişimi,

böceklerle mücadeleyi olumsuz etkilediği gibi dirençli böceklerle mücadele etmek amacıyla fazla miktarda kullanılan pestisitler su kaynakları, toprak ve hava kirliliğine neden olmaktadırlar (Schowalter, 2016). Pestisit kalıntıları insanların vücuduna beslenme, toprak, hava ve su yoluyla alınabilmekte ve çeşitli kanser, üreme ve endokrin sistem bozukluklarına neden olmaktadır (Horrigan vd., 2002; Nauen, 2007).

İnsektisitlerin % 85'i böcek sinir-kas sistemi üzerinde etki göstermektedir (Casida & Durkin, 2013). Büyüme ve gelişmeyi değiştirenler toplam insektisit satışlarının % 9'unu, enerji üretimini engelleyenler (solunum hedefleri) ise % 4' ünü oluşturmaktadır. Sinir-kas sistemine etki eden insektisitler içinde organik fosfatlar, karbamatlar ve sentetik piretroidler % 31 oranında mevcut iken, neonikotinoidler insektisit satış pazarında % 27'lik pay ile en çok kullanılan insektisit grubu olarak yer almaktadır (Sparks & Nauen, 2015).

Sentetik piretroidler küresel insektisit pazarının %16'lık dilimini oluşturmaktadır (Sparks vd., 2015). Deltamethrin ise piretroidler içerisinde en çok kullanılan insektisit olup çeşitli hastalıkların yayılmasına neden olan vektörlerin mücadelesinde sıklıkla kullanılan önemli bir nörotoksik bileşiktir (Gilbert & Gill, 2010). Son yıllarda yapılan çalışmalar, farklı böcek familyalarına giren birçok böcek türünde Deltamethrin'e karşı güçlü bir direnç oluştuğunu göstermektedir (Hargreaves vd., 2000; Picollo vd., 2005; Yaicharoen, Kiatfuengfoo, Chareonviriyaphap & Rongnoparut, 2005).

Thiamethoxam neonikotinoid sınıfından ikinci jenerasyon bir insektisit olup neonikotinoidler arasında %36,7'lik bir kullanıma sahiptir. Neonikotinoidler, nikotinik asetilkolin reseptörüne bağlanarak böceğin ölümüne neden olurlar. Bitki koruma ve veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Organik fosforlu, karbamatlı ve piretroidli bileşiklere karşı direnç gelişmesi nedeniyle kullanılmaya başlanan neonikotinoidlerin de çok sayıda böcek sınıfında direnç gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (Bass, Denholm, Williamson, & Nauen, 2015).

Böceklerle mücadelede yaygın olarak kullanılan insektisitler, böceklerdeki çeşitli enzim ve protein mekanizmalarıyla detoksifiye edilebilir veya etkinliği azaltılabilir. Yapılan araştırmalar böceklerdeki bu detoksifikasyon mekanizmalarında sitokrom P-450 monooksijenaz, glutatyon S- transferaz enzimleri (Hemingway,

Hawkes, McCarroll, & Ranson, 2004) ve ABC (ATP binding cassette) taşıyıcı proteinlerinin rol aldığını göstermiştir (Dermauw & Van Leeuwen, 2014).

Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae) insektisit direncinin moleküler mekanizmalarının araştırılmasında kullanılan bir model organizmadır. Zararlı böcek türleri ve insanlarla gen homolojisine sahip olması, sade bir sisteme sahip olması, yetiştirme şartlarının kolay, kısa süreli ve masrafsız olmasından dolayı araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir. *Drosophila melanogaster* gelişimsel biyoloji, nörobiyoloji, ekolojik genetik, mutajenite ve moleküler genetik gibi alanlarda da önemli bir model haline gelmiştir (Wilson, 1988).

Bu tez çalışmasının amacı; tarım, halk sağlığı alanları, veteriner hekimlik gibi alanlarda sıklıkla kullanılan ve çoklu insektisit direncine neden olduğu düşünülen Sentetik piretroidli (Deltamethrin) ve Neonikotinoidli (Thiamethoxam) insektisitlerin, model organizma olan *Drosophila melanogaster* Oregon R^{+} erginlerine uygulanması sonucunda oluşan moleküler cevaplar kullanılarak, böceklerde gelişen insektisit direncinin hangi moleküler sinyal yolaklarından (P450, GST ve ABC proteinleri) kaynaklandığının analiz edilmesi ve insektisit stresi altında duyarlı ve dirençli türlerin verdiği bazı antioksidan gen ifadeleri (süperoksit dismutaz, süperoksit dismutaz 2, katalaz ve glutatyon sentetaz), apoptotik gen ifadeleri (Bcl-2, Bax ve Cas 3) ile ısı şoku protein ifadeleri (HSP27, HSP60 ve HSP70) yanıtlarının karşılaştırılmasıdır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

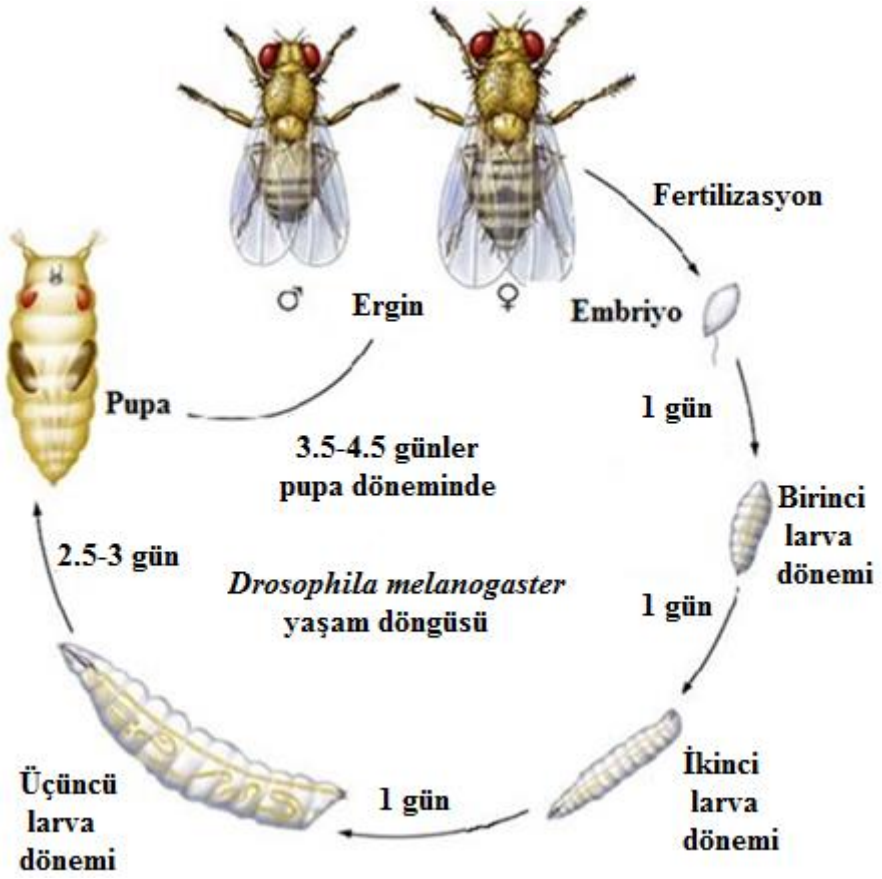
2.1. Model Organizma Olarak *Drosophila melanogaster*

Sirke sineği olarak da bilinen *Drosophila melanogaster* yaşam bilimlerinde en çok kullanılan model organizmalardan biridir. İlk kez Thomas Hunt Morgan *Drosophila melanogaster'*i kullanarak kromozomal kalıtım teorisini beyaz genin X kromozomunda kalıtıldığını gösteren çalışmasıyla 1933 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülü almıştır (Morgan & Bridges, 1916). Bir başka Nobel ödülünü X ışınlarının mutasyon oranlarına etkisini araştırdığı çalışmasıyla 1946 yılında Hermann Müller almıştır (Muller, 1928). Bu keşiflerden DNA inversiyonu yoluyla rekombinasyonu engelleyen dengeleyici kromozomlar ortaya çıkmış, bu gelişmeler tek bir kromozom üzerinde nesiller boyunca korunan mutasyonların olduğunu göstererek *Drosophila melanogaster*'i genetik araştırmalarda kullanılan ilk genetik sistem yapmıştır (Lindsley & Zimm, 2012).

Ard arda yapılan genetik buluşlar daha karmaşık genetik çalışmaların yapılmasını sağlamıştır. Sirke sineğinde bu genetik buluşların yapılması gen biyolojisi, hücre biyolojisi, gelişim biyolojisi, populasyon genetiği, moleküler genetik, toksikoloji ve böceklerde direnç gelişimi dahil olmak üzere birçok tıbbi ve bilimsel araştırmaya önemli katkılarda bulunmuştur (Wilson, 1988).

2.1.1. *Drosophila. melanogaster* Biyolojisi

Drosophila melanogaster 4 çift kromozom bulunduran basit genetik yapısı nedeniyle genetik çalışmalarda kullanılmaktadır. *Drosophila melanogaster* genomunun dizilimi 2000 yılında tamamlanmıştır. Bunun sonucunda 4 çift kromozomdan 3'ünde %95'i kodlanan 13600 gen tanımlanmıştır. Yapılan analizler sonucunda insan hastalıkları ile ilişkili farklı genlerin *Drosophila melanogaster* ile %77 benzerliğe sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte gen ifadesi ve metabolizmanın düzenlenmesinde yer alan proteinlerin insan genleriyle benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Ong, Yung, Cai, Bay, & Baeg, 2015; Rand, 2010).



Şekil 2.1. *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü (Yung vd., 2015)

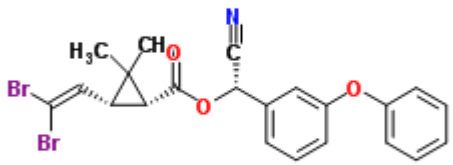
Drosophila melanogaster'in yetiştirilmesi, bakımı ve aktarılması kolaydır. Sirke sineği; mısır unu, şeker, maya, agar, su ve antifungal asit karışımı bulunan besiyerlerinde şişelerde yetiştirilebilmektedir (Rand, 2010). Şekil 2.1'de gösterildiği gibi *Drosophila melanogaster* yaşam döngüsü 25ºC'de 10-12 gün arası sürmektedir.

Tam başkalaşım (holometabol) geçiren böceklerden olan sirke sinekleri döllendikten sonra embriyo, 1. dönem larva, 2. dönem larva, 3. dönem larva prepupa ve pupa evreleri geçirdikten sonra ergin olmaktadırlar. Ergin dişiler pupadan çıktıktan 1 gün sonra fertil hale geçerler ve yumurtalarını besiyeri üzerine bırakırlar yaşam döngüsünü tamamlayan ergin sinekler pupadan çıktıktan sonra yaklaşık 50-60 gün yaşayabilmektedirler (Yung vd., 2015).

2.2. İnsektisitler

2.2.1.Deltamethrin

Deltamethrin; geniş spektrumlu, hızlı etkili, temas, mide zehiri ve sinir sistemi etki mekanizmasına sahip sentetik piretroidli bir insektisittir. Biyolojik aktivitesi çok yüksek olan Deltamethrin uygulandığı yüzeylerde uzun süre kalıntı bırakabilmektedir. Bitkilerde sistemik etkiye sahip değildir. Memelilerde ise orta seviyede toksiktir ancak vücuttan hızla uzaklaştırılabilmektedir. Deltamethrin lipofilik özelliğe sahip bir bileşik olduğundan böcek kütikulalarından kolayca alınarak, yağ doku ve önositler tarafından metabolize edilmektedir (Erdoğan, Ceyhun, Ekinci Aksakal, 2011).



Şekil 2.2. Deltamethrin'in 2D yapısı (Chemspider, 2018)

Moleküler formül: $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$

Moleküler ağırlık: 505.199 Da

IUPAC İsmi: (S)-cyano(3-phenoxyphenyl)methyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromoethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (Chemspider, 2018)

Piretrinler ve piretroidler (sentetik piretrinler), halk sağlığı, hayvan sağlığı, bitki koruma alanlarında ve uçak dezenfeksiyonu da dahil olmak üzere geniş bir uygulama alanında kullanılmaktadırlar (Wei, Mohan, & Weisel, 2012). Piretrinlerin insektisit olarak ilk kullanımlarına antik Çin ve İran medeniyetlerinde rastlanmıştır. *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Şekil 2.3) çiçek tablalarının ekstreleri insektisit olarak geliştirilmiştir.



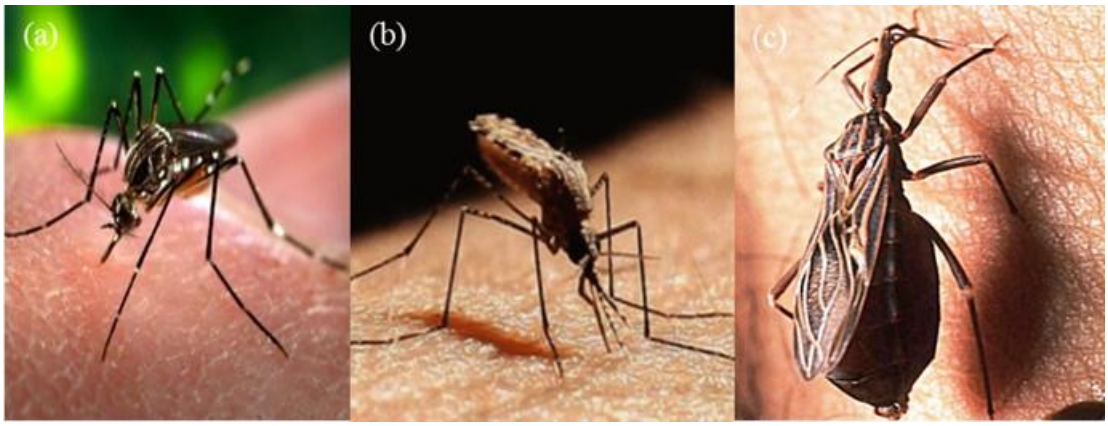
Şekil 2.3. *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Taxonomy, 2018)

Doğal olarak meydana gelen altı tane piretrin vardır (piretrin I ve II, sinerin I ve II ve jasmolin I ve II). Piretrinlerin ışık ve hava ile hızlı ayrışmaları nedeniyle sentetik türevleri olan piretroidler geliştirilerek yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Anadón, Martínez-Larrañaga, & Martínez, 2009). İlk piretroidler; Bioallethrin, Tetramethrin, Resmethrin ve Bioresmethrin 1960'larda geliştirilmiştir. 1974'e gelindiğinde Permethrin, Cypermethrin ve Deltamethrin. de dahil olmak üzere ikinci nesil daha kalıcı bileşikler geliştirilmiştir (Marrs, 2012). Piretrin I böcek öldürücü etkinliği ile Piretrin II ise ani öldürücü etkisi ile bilinmekte olup bu özelliklerini *C.*

cinerariaefolium çiçek tablalarındaki bileşiklerden almaktadırlar. I. nesil Piretrinler yapılarını krizantemik asitten alırken, yapılarında siyano (CN) grubu bulunduranlar Tip II, siyano (CN) grubu bulundurmayanlar ise Tip I sentetik piretroidli bileşikler olarak sınıflandırılmışlardır. Deltametrin Tip II piretroidli bir bileşiktir. (Das & Aksoy, 2016).

Piretroidlerin ana etkileri sodyum kanalları üzerinde olup, sinir ve kas hücrelerinin işlevlerinde düzensizlik yaratma şeklinde toksisite oluştururlar. Piretroidler Voltaj-Kapılı Sodyum Kanalları (VKSK) aktivasyonunu geciktirerek inaktive ederler, böylece daha fazla Na^+ iyonunun hücre zarına girmesine yol açarak ve VKSK deaktivasyonu gerçekleştirirler (Wakeling, Neal, & Atchison, 2012).

Küresel piretroid satışları 2002 yılı verilerine göre piretroidlerin satış rakamlarının 1280 milyon dolar civarında olduğu tahmin edilmektedir. Piretroid satışlarının %95' ini 12 piretroidli aktif bileşen oluşturmakta ve bu bileşiklerden %16' lık pay ile Deltametrin küresel piretroid satış pazarının lideri olma konumunu devam ettirmektedir (Khambay & Jewess, 2005).



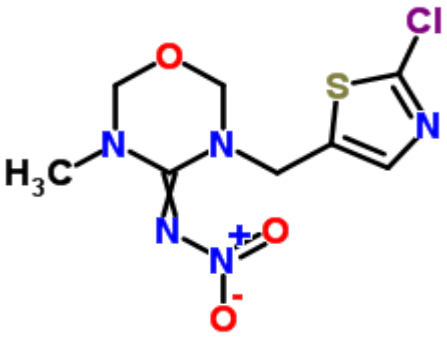
Şekil 2.4. Sentetik piretroidli insektisitlerin hedef aldığı bazı zararlı türleri. (a) *Aedes spp* (b) *Anopheles spp* (c) *Triatoma spp* ("IRAC,")

Günümüzde vektör kontrol programlarının dünya çapındaki başarısını Deltamethrin ve onun muadillerine karşı gelişen direnç tehdit etmektedir. Şekil 2.4'de sentetik piretroidli insektisitlerin hedef aldığı bazı zararlı türleri verilmiştir. Sarı humma vektörü olarak da bilinen *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ve Güney Afrika' da sıtma salgınlarına yol açan vektörlerden biri olan *Anophelus funestus* (Diptera: Culicidae)

sineklerinin DDT, organik fosforlu ve karbamatlı insektisit sınıflarından sonra piretroidlere karşı da direnç kazanmasıyla çoklu ilaç direnci kazandığı bildirilmiştir (Christophers, 1960; Hargreaves vd., 2000). Yapılmış çalışmalarda, Batı Afrika'da malarya vektörü *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) sineklerinde ve (Chandre vd., 1999) Kuzey Arjantin'de Chagas hastalığı (öpücük hastalığı) vektörü *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) böceklerinde yüksek seviyelerde Deltamethrin direnci geliştiği belgelenmiştir (Picollo vd., 2005).

2.2.2. Thiamethoxam

Thiamethoxam temas, mide zehiri ve sistemik özelliklere sahip geniş spektrumlu bir insektisittir. Pek çok ülkede sebze, süs bitkisi, tarla bitkileri, tahıllar ve meyvelerde bulunan sokucu emici ağız yapısına sahip Hemiptera takımından yaprak bitleri, beyaz sinek ve çiğneyici ağız yapısına sahip çekirgelere, Coleoptera takımlarından böceklere karşı etkili olup emici ağız yapısına sahip Lepidoptera türlerinin ergin öncesi dönemlerine karşı da kullanılmak üzere ruhsatlandırılmıştır (Elbert, Nauen, Leicht, 1998; Motohiro, 2000).



Şekil 2.5. Thiamethoxam'ın 2D yapısı (Chemspider, 2018)

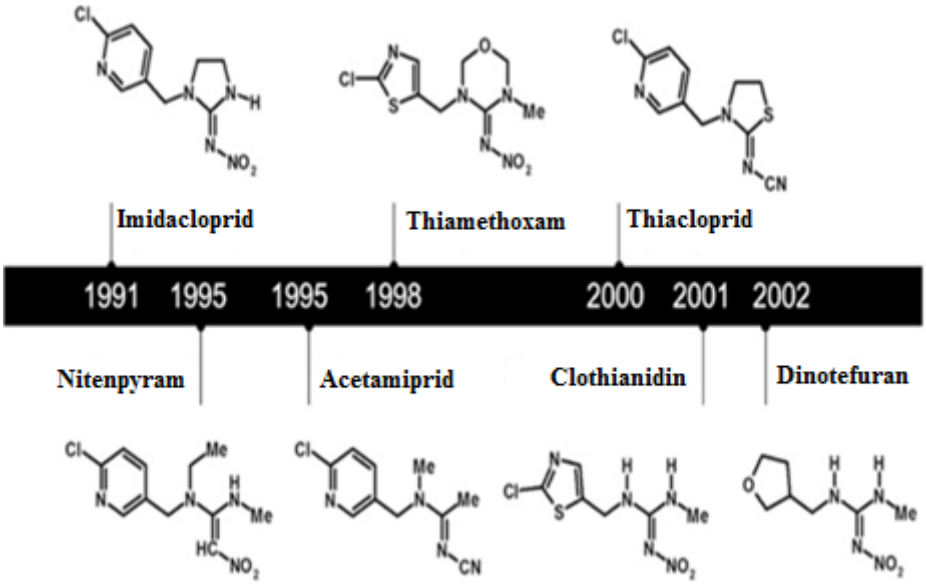
Moleküler formülü: $C_8H_{10}ClN_5O_3S$

Moleküler ağırlık: 291.715 Da

IUPAC İsmi: 3-[(2-Chloro-1,3-thiazol-5-yl)methyl]-5-methyl-N-nitro-1,3,5-oxadiazinan-4-imine (Chemspider, 2018)

Thiamethoxam neonikotinoid sınıfından bir insektisit olup, tarımda yaygın olarak kullanılan yeni bir insektisit sınıfıdır (Ensley, 2012). Neonikotinoidler, postsinaptik nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR'ler) üzerinde etki gösterir. Böceklerde, bu reseptörler merkezi sinir sisteminde bulunur. Düşük konsantrasyonlarda sinir uyarımına neden olurken, yüksek konsantrasyonlarda reseptör blokajı, felç ve ölüme yol açar. Neonikotinoidler nAChR'lere omurgalılara göre daha güçlü bir şekilde bağlanırlar, bu yüzden seçici olarak böceklere daha toksik olurlar (Tomizawa & Casida, 2005).

Günümüzde neonikotinoidler toplam küresel insektisit satışlarının % 25'inden fazla pazar payına sahip olup, Thiamethoxam bu bileşikler içerisinde %36.7' lik bir kullanıma sahiptir. (Bass vd., 2015). Önemli neonikotinoid insektisitler ve piyasaya giriş yılları Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Önemli neonikotinoid insektisitler ve piyasaya giriş yılları (Bass vd., 2015)

Neonikotinoid insektisitlerin hedef aldığı bazı önemli zararlı türleri Şekil 2.7'de verilmiştir. Neonikotinoidlere karşı gelişmiş ilk direnç vakası İspanya'da *Bemisia tabaci*'de (Hemiptera: Aleyrodidae) imidaclopride karşı belgelenmiştir. Arthropod Pestisit Direnç Veri Tabanı (APRD) 330'dan fazla imidacloprid direncini ve bunu takiben 130 Thiamethoxam ve 50 acetamiprid direnci olgusunu belgelemiştir. Son yıllarda artropodlarda neonikotinoidlere karşı gelişen direnç vaka sayısı artmıştır(Bass vd., 2015). *Bemisia tabaci* (Horowitz, Kontsedalov, & Ishaaya, 2004), *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) (Gao, Ma, Shan, & Wu, 2014), *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) (Kristensen & Jespersen, 2008), *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Mota-Sanchez, Hollingworth, Grafius, & Moyer, 2006) ve *Myzus persicae*'de (Hemiptera: Aphididae) Thiamethoxam direnci ve diğer neonikotinoidlere karşı çapraz direnç bildirilmiştir. Buna göre, Thiamethoxam direncinin bazı böceklerde sitokrom P-450 monooksijenaz ve karboksilesteraz enzim mekanizmalarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (Feng vd., 2010; Gao vd., 2014).



Şekil 2.7. Neonikotinoid insektisitlerin hedef aldığı bazı önemli zararlı türleri (a) *Bemisia tabaci*, (b) *Leptinotarsa decemlineata* (c) *Myzus persicae* (Jeschke & Nauen, 2005).

Neonikotinoidlerin zamanla toprakta birikerek kalıcılıkları artmıştır. Suda çözünebilen bu bileşikler yeraltı sularına sızabilmektedirler (Goulson, 2013). Neonikotinoidler seçici olarak böceklere toksik olmaları nedeniyle kullanılmaya başlanmalarına rağmen son yıllarda yapılan çalışmalar ekosisteme ciddi olumsuz etkileri olduklarını göstermiştir (Şekil 2.8). Bu çalışmalarda neonikotinoidlerin toprak (Robinson, 2001), su kaynakları (Thuyet, Jorgenson, Wissel-Tyson, Watanabe, &

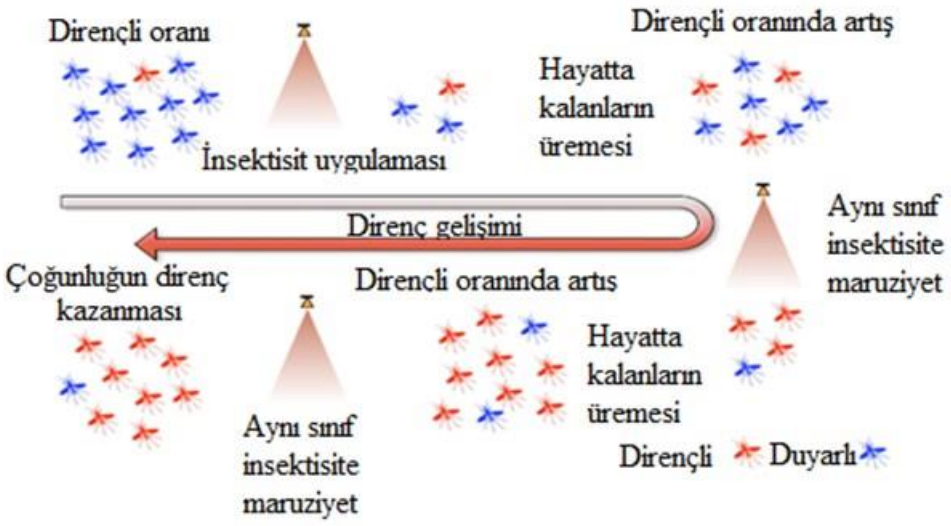
Young, 2012) ve kullanıldıkları bitkiler üzerinde, hedef olmayan organizmalara toksik düzeyde bir kalıntı oluşturdukları belirlenmiştir (Byrne & Toscano, 2006). Bitkilerdeki kullanımları polen, nektar ve dokuları aracılığıyla alınması bal arılarında toksik etkilere neden olarak arılarda yön bulma ve hafızalarına ciddi zararlar vermiştir (Whitehorn, O'connor, Wackers, & Goulson, 2012).



Şekil 2.8. Neonikotinoidlerin ekosistem üzerindeki etkileri (Kimantas, 2013)

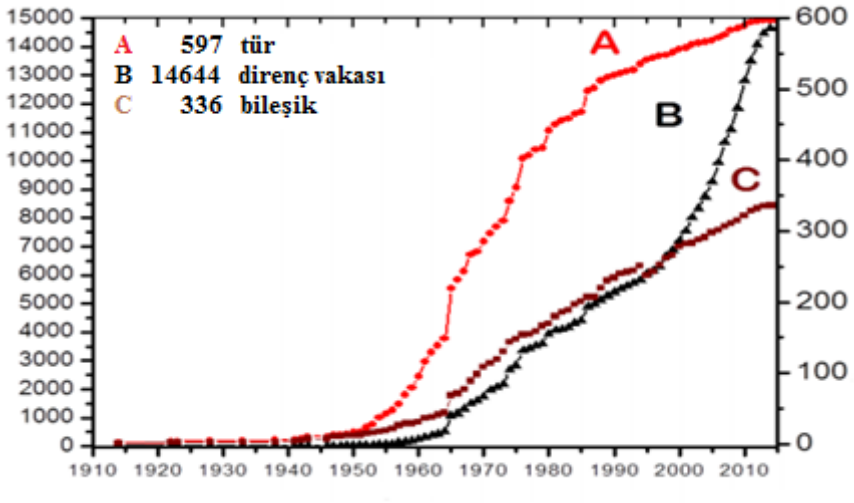
2.3. İnsektisit Direnci

İnsektisit Direnci; Böceklerde insektisitlerin ilk uygulandıkları dozlardan daha az etkilenen genetik ırkların ortaya çıkması olarak tanımlanmaktadır. Aynı insektisitlerin uzun süreli kullanımları sonucunda insektisit baskısı altında yetişen jenerasyonlarda çeşitli adaptasyonlar, duyarlı bireylerin popülasyondan elenmesine ve dirençli bireylerin seleksiyonuna neden olmaktadır (Şekil 2.9). Böcek popülasyonları insektisitlerin bağlandıkları hedef bölgede değişiklik oluşturarak direnç geliştirebilmektedirler. Metabolik olarak yapılan bu değişiklikler, genetik mekanizmalarla yeni nesillere aktarılarak dirençli nesillerin üremesine yol açmaktadır. Direnç derecesi nesilden nesile değişebileceği gibi sabit popülasyonlarda da görülebilir (Karataş & Bahçeci, 2009)



Şekil 2.9.İnsektisitlere direnç gelişimi (IRAC,2018)

İnsektisit direnci, yüzyıla yakın süredir böcek kontrolü ve yönetimini etkileyen önemli bir faktör olmuştur. İnsektisit direncini belgeleyen ilk makale San Jose kabuklu biti *Quadraspidiotus perniciosus*'da (Hemiptera: Diaspididae) kireçli kükürte karşı Melander (1923) tarafından yayınlanmıştır (Schowalter, 2016). Daha sonra 1940'larda DDT, siklodien ve organofosfor insektisitlerinin piyasaya çıkmasıyla direnç vakalarında artış meydana gelmiştir. 1940'ların sonlarından beri insektisit direncine yol açan bileşikler, vaka sayıları ve dayanıklı türlerin sayıları her geçen gün artmaktadır. 1960 ve 1970'lerde insektisitlere ek olarak herbisitler ve fungisitlere de direnç geliştiği görülmüştür (Sparks & Nauen, 2015) (Şekil 2.10). İnsektisit direnci birtakım genetik veya adaptif değişikliklerden dolayı ortaya çıkan bir olgu olup dirence neden olan genlerin kökeni ve yayılımı hala tam olarak anlaşılamamıştır (Perry, Batterham, & Daborn, 2011).



Şekil 2.10. 1914-2015 yılları arasında arthropodlarda insektisit direncinin evrimi (IRAC, 2018)

A-) Tür sayısını, B-)Direnç vakası sayısını, C-) Bileşik sayısını göstermektedir. Grafiğin sol tarafı kümülatif direnç vakası sayısını, sağ tarafı ise tür ve bileşik sayısını göstermektedir.

Athropodlarda 1914'den 2015'e kadar insektisit uygulanması sonucu dirençli tür sayısı 597, direnç vakası sayısı 14644 ve direnç gelişen bileşik sayısı 336 olarak tespit edilmiştir (IRAC, 2018). Veriler organik sentetik kimyasalların kullanım tarihleri çok eski olmamasına rağmen, insektisit kullanımı hakkında olumlu bir izlenim vermemektedir. Ayrıca çok sayıda bileşiğe karşı direnç gelişmiş olması insektisit direncinin ulaştığı boyutu gözler önüne sermektedir.

2.4. İnsektisitlere Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

2.4.1 Metabolik Direnç

Metabolik direnç; dirençli böceklerin metabolik faaliyetlerle enzim seviyelerini arttırarak, insektisit moleküllerini ortadan kaldıran biyokimyasal veya fizyolojik bir savunma mekanizmasıdır. Enzimler, ksenobiyotikleri hızlı bir şekilde detoksifiye ederek toksik olmayan bir bileşiğe çevirebilirler. Dirençli böceklerde direnç gelişimi

enzim yapılarının daha yüksek bir katalitik aktiviteye sahip olması, gen ekspresyon seviyelerindeki artış ve gen ekspresyonları sonucu ortaya çıkmaktadır. Detoksifikasyon, hidroliz veya oksidasyon süreçlerinden oluşan faz I tepkimeleri ile glutatyon gibi endojen bileşiklerin konjugasyonu sonucu oluşan faz II tepkimeleri süreçleriyle gerçekleştirilir (Panini, Manicardi, Moores, & Mazzoni, 2016). Metabolik direnç mekanizmaları; P-450 monooksijenazlar, hidrolazlar ve glutatyon-S-transferaz enzimleridir. İnsektisitlere karşı metabolik direnç; Lepidoptera, Coleoptera ve Diptera takımlarının türlerinden çeşitli böceklerin direnç geliştirdiği yaygın bir mekanizmadır. Bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğu, P450'ler, GST'ler ve esterazların rolünü açıklığa kavuşturmuştur (Pittendrigh vd., 2014).

2.4.2 Hedef Bölge Direnci

Hedef bölge direnci birçok böcek türünde insektisit direncine yol açan nokta mutasyonların oluşmasıyla gerçekleşen bir savunma mekanizmasıdır. Herhangi bir etki mekanizması sınıfından bileşiklerin tümü genellikle belirli bir hedef bölge direnci ile değişen derecelerde etkilenirler (Panini vd., 2016). Toksinin hedef bölgesindeki konformasyonel değişiklikler nedeniyle, insektisit böcek için daha az toksik hale gelir. Hedef bölgedeki bu tür değişiklikler, toksinin hedef bölgeye bağlanma yeteneğini azaltarak veya hedef bölgenin toksine yanıtını değiştirerek oluşabilmektedir (Pittendrigh vd., 2014).

Hedef bölge proteinlerindeki mutasyonlar, böceklerde bulunan en iyi bilinen piretroid direnç mekanizmasıdır (Nkya, Akhouayri, Kisinza, & David, 2013). DDT ve piretroidler gibi nörotoksik bileşiklerin hedefleri olan voltaj kapılı sodyum kanalları sivrisinekte ilaç direncinin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. (Catterall vd., 2007; Narahashi, 1996),

Hedef bölge direnci çalışmalarının çoğu ilk olarak *M. domestica*'da gözlenen kdr (knockdown resistance) mutasyonundan kaynaklandığını göstermektedir. En çok belgelenen kdr mutasyonu ise sodyum kanalının 2. domaininin 4. ve 6. segmentlerinde ve genel mutasyonların çoğu 1014 pozisyonundaki fenilalanin ile lösin aminoasitlerinin yer değiştirmesi şeklinde oluşmaktadır (Williamson, Martinez-Torres, Hick, & Devonshire, 1996).

Kdr direnci terimi, DDT veya piretroidli insektisitlerin böceklerin sinir sisteminde etki ettikleri hedef bölgelerin değiştirilmesiyle oluşan direnci tanımlamak için kullanılmaktadır (Soderlund & Knipple, 2003). Piretroidlere karşı oluşan kdr direnci, uzun zamandır bu insektisitlerin hedefi olan sodyum-kanal genindeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir. Bugüne kadar 50'den fazla sodyum kanal mutasyonu teşhis edilmiş ve bu mutasyonun kdr direnci ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Xu, W., Liu, S., Zhang, Y., Gao, J., Yang, M., Liu, X., Tao, L., 2017).

2.4.3 Davranışsal Direnç

Bir böcek veya onun yavruları için hayatta kalma şansının artmasına yol açan herhangi bir kaçınma davranışı davranışsal direnç olarak tanımlanmaktadır. Böcekler insektisit uygulamasını fark ederek uygulama yapılmış alandan uzaklaşabilir ya da beslenmelerini kesebilirler. Davranışlarını değiştirerek toksin moleküllerinden kaçınan dirençli böcekler kalıtsal bir mekanizma veya mekanizmalar geliştirebilirler. Örneğin, ovipozisyondaki davranış değişiklikleri, lahana yaprak güvesi *Plutella xylostella*'da insektisitlere karşı bir kaçınma davranışı olarak gözlenmiştir (Pittendrigh vd., 2014). Laboratuvarda yetiştirilen *P. xylostella*' nın insektisit uygulanmış konukçı bitkilere yumurta bırakma deneyinde, güvelerin sap ve yaprak yerine toprağa daha fazla yumurta bırakmayı tercih ettikleri gözlemlenmiştir (Sarfraz, Dosdall, & Keddie, 2005).

2.4.4 Penetrasyon Direnci

Bu mekanizma, dirençli böceklerin duyarlı böceklere göre kutikulalarının insektisitin vücuda alınmasını yavaşlatacak şekilde değişiklik oluşturmasıyla karekterize edilmektedir. Penetrasyon direnci dirençli böceklerde metabolik direnç gibi mekanizmaların varlığında eksprese olduğu zaman dirence güçlü bir katkıda bulunan bir faktör ya da düzenleyici olarak görev almaktadır. Son zamanlarda yapılmış çalışmalarda *Myzus persicae*'nin neonikotinoid dirençli populasyonlarında proteinlerin farklı şekilde ifade edildiği ve *Tribolium castaneum*, *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera) ve *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) ve *Anopheles gambiae*'nin de dahil olduğu bazı böcek türlerinde kutikula penetrasyonunda azalma yolu ile insektisit direnci gösterilmiştir. (Puinean vd., 2010). Penetrasyon direnci piretroid dirençli *Musca*

*domestica'*da kdr direncine, hedef bölge direncine, sitokrom P450 Cyp6d1'in aşırı ekspresyonuna (metabolik direnç) ve düşük penetrasyona bağlıdır (Seifert & Scott, 2002).

2.4.5 Çapraz Direnç

Bir insektiside karşı duyarlılığını kaybetmiş böcek ya da böcek topluluğunun o insektiside yakın kimyasal yapıya veya benzer etki mekanizmasına sahip diğer insektisitlere karşı da dirençli olması durumuna çapraz direnç adı verilmektedir (Chapman & Penman, 1979). Çapraz direnç, birçok farklı böcek türünde ve çoklu insektisit direnci tiplerinde belgelenmiştir. Malathiona dirençli *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) populasyonlarının, bazı organofosfat, karbamat, piretroid ve bir benzoil üre sınıfı insektiside karşı farklı çapraz direnç seviyelerine sahip olduğu gözlenmiştir (Couso-Ferrer vd., 2011).

DDT ve piretroidli insektisitler kimyasal olarak farklı olmalarına rağmen voltaj kapılı sodyum kanallarına etki etmektedirler. DDT'nin geçmişte kullanımı, hedef bölgedeki kdr mutasyonu nedeniyle DDT' ye karşı pek çok böcek türünde direnç gelişimiyle sonuçlanmıştır. Populasyondaki bu mutasyonlar DDT'ye ek olarak tüm piretroidler için de dirence neden olmuştur (Brengues vd., 2003; IRAC, 2018). Beyaz sinek *Bemisia tabaci* Pyripyroxyfen (juvenil hormon analoğu) dirençli ve hassas ırkları üzerinde yapılan çalışmalarda neonikotinoid ailesinden Acetamiprid, Imidacloprid ve Thiamethoxama karşı çapraz direnç geliştirdiği görülmüştür (Ishaaya, Kontsedalov, & Horowitz, 2005).

2.4.6 Çoklu Direnç

Çoklu direnç başta membran ana pompa mekanizmaları olmak üzere, birçok farklı direnç mekanizmasının dirençli böceklerde aynı anda mevcut olmasıyla gerçekleşir. Farklı direnç mekanizmaları birden fazla kimyasal sınıfa karşı direnç sağlamak için bir araya gelebilmektedir. Yapılan çalışmalara göre *Tetranychus urticae* (iki noktalı kırmızı örümcek) ve *Helicoverpa armigera*'da (pamuk yeşil kurdu) çoklu ilaç direnci tespit edilmiştir (Dermauw & Van Leeuwen, 2014). Batı Afrika, Benin'de

Anopheles gambiae ve *Culex quinquefasciatus*'da hedef bölge modifikasyonu ve metabolik detoksifikasyon direnç tipleri sıtma ile mücadele programları ile kapalı alan ilaçlamalarında kullanılan birçok farklı insektisit grubuna karşı çoklu ilaç direnç mekanizmaları geliştirdikleri belgelenmiştir (Corbel vd., 2007).

Çoklu insektisit direnç lokusları arasındaki etkileşimleri inceleyen çalışmaların çoğu, *Musca domestica* kullanılarak yapılmıştır. *M. domestica*, küresel vektör mücadele programlarında kimyasal mücadelesi yapılan vektör kaynaklı insan ve hayvan hastalıklarının önemli bir vektörüdür (Hardstone & Scott, 2010). Şeftali-yaprak biti *Myzus persicae*'nin hassas ırklarında Pirimicarb ve Triazamate insektisitlerine karşı insektisit direnci kazandırıldıktan sonra DDT ve piretroid uygulamasıyla da çoklu ilaç direnci kazandığı görülmüştür (Field vd., 1997).

2.5 Böceklerde Detoksifikasyon Mekanizmaları

Böcekler yaşamları süresince çeşitli bitkisel veya antropojenik toksinlere maruz kalmaktadır. Bu toksinlerin vücuttan atılımı faz I, faz II ve faz III detoksifikasyon mekanizmalarıyla gerçekleştirilmektedir.

Faz I enzimleri kutupsuz yapıdaki insektisitleri oksidasyon, hidroliz veya indirgenme yoluyla reaktif ve kutuplu ara maddelere dönüştürmektedirler. Faz I detoksifikasyon enzimlerinden böceklerdeki rolleri iyi bilinenler sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemleridir. P-450 enzimleri, insektisitlere elektrofilik veya nükleofilik maddeler ekleyerek daha az zehirli ara maddelere dönüştürmektedirler. (Rene Feyereisen, 1999).

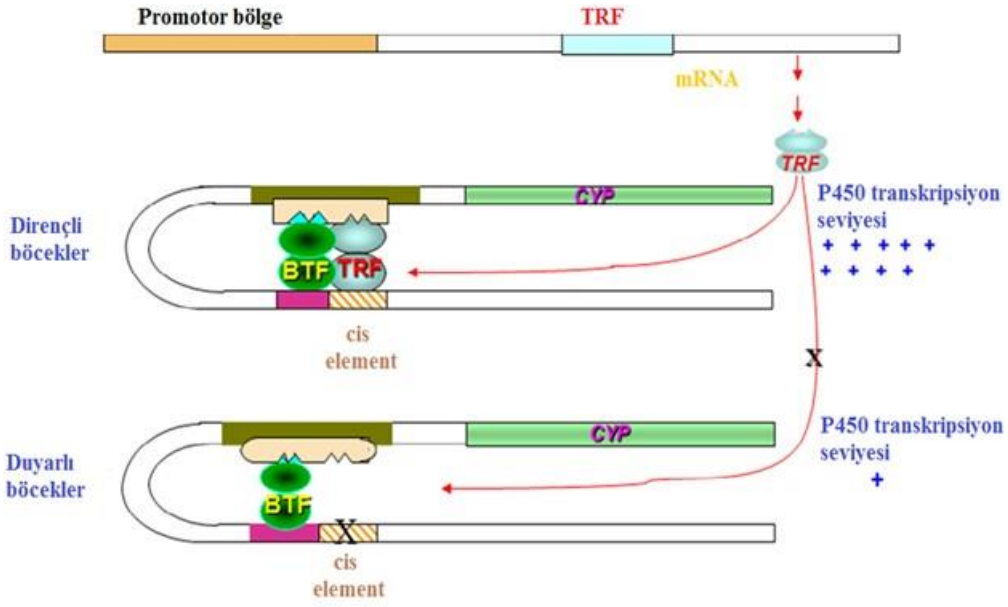
Faz II detoksifikasyon mekanizmalarında GST (Glutatyon S- Transferazlar) enzimleri rol almaktadır. Faz II detoksifikasyon mekanizmalarında, faz I enzimleri tarafından kutuplu yapı kazandırılan ara maddeler hidrofilik maddelere dönüştürülmektedir. Faz I reaksiyonları sonucunda insektisitlere hidroksil, karboksil ve epoksidaz gibi fonksiyonel gruplar eklenmektedir. Bu grupların eklenmesi sonucunda glutatyon, fosfat, sülfat, aminoasit gibi büyük moleküller oluşmaktadır. Faz II reaksiyonları sonucunda daha az zehirli polar yapıda maddeler oluşturularak vücuttan atılmaktadır. (Ranson & Hemingway, 2005).

Faz III taşıyıcıları P-glikoproteinleri (MDR), çoklu ilaç direnci ilişkili proteinleri (MRP) ve organik anyon taşınmasında rol alan polipeptidleri kapsamaktadır. Faz III taşıyıcıları içerisinde en iyi bilinen taşıyıcı ailesi ABC (ATP bağlayan kaset) proteinleridir. Faz I ve faz II reaksiyonları sonucunda oluşan aminoasit, lipit, şeker gibi büyük yapılı maddelerin, ksenobiyotikler ve ilaçların substratlar boyunca taşınmasını ATP hidrolizleyerek sağlamaktadırlar (Chahine & O'Donnell, 2011; Xu, & Kong, 2005).

2.5.1 Sitokrom P450 Monooksijenazlar

Sitokrom P450 veya CYP genleri, böceklerde hormon, asit, steroit veya vücuda alınan insektisitlerin yapımlarını ve yıkımlarını düzenleyen bir enzim sistemidir. Böcek, bitki, bakteri, protista, mantar ve memeli gibi birçok farklı organizmada bulunmaktadır. (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). P-450 enzim sisteminde faz I reaksiyonları gerçekleştirilmektedir. P-450 enzimleri ökaryotlarda mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunmaktadırlar. Her bir P450 proteini, ayrı bir CYP geninin ürünüdür. P450 proteinleri 45 ile 55-kDa ağırlığındaki hem-tiolat enzimleridir. Bu enzimlerin ortak özellikleri, adlandırıldıkları FeII-CO kompleksinin 450 nm'de absorbans vermesidir (Omura & Sato, 1964).

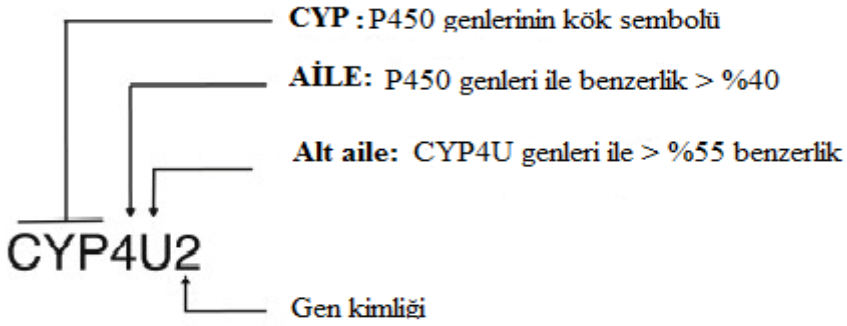
İlaç ve pestisitler gibi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve / veya aktivasyonu için P450'ler kritik öneme sahiptir. Böceklerde P450'ler insektisitler ve bitki toksinleri gibi ekzojen bileşiklerin detoksifiye edilmesinde önemli bir rol oynar ve bunların aşırı ekspresyonu, P450 proteinlerinin ve aktivitelerinin artmasına neden olabilir. İnsektisitlerin metabolik detoksifikasyonunun arttırılması böceklerde insektisit direncinin gelişmesinde rol oynamaktadır. (N. Liu, Li, Gong, Liu, & Li, 2015).



Şekil 2.11. İnsektisit direncinde P-450 geninin düzenlenmesi (N. Liu vd., 2015)

Böceklerde insektisit direncinin P450 genleri tarafından düzenlenme mekanizması Şekil 2.11'de gösterilmiştir. Bu model detoksifikasyon mekanizması ve evriminin P-450 gen ifadelerinin trans veya cis düzenleyici elementlerle düzenlenerek, dirençli böceklerde P-450 geninin artış göstermesinin bazal transkripsiyon faktörleri (BTF) ve trans düzenleyici faktörler (TRF) ile etkileşim içinde olduğunu göstermektedir (N. Liu vd., 2015).

İlk böcek P450'lerinin klonlanması ve dizilenmesi 1989'da *Musca domestica*'dan Cyp6a1 geni (René Feyereisen, Koener, Farnsworth, & Nebert, 1989) ve 1992'de *Drosophila melanogaster*'den Cyp4d1 ve Cyp6a2 genleri ile yapılmıştır (Waters, Zelhof, Shaw, & Ch'ang, 1992). *Drosophila melanogaster* ile 2000 yılında başlayan böcek genom dizileme projeleri böceklerde P450 enzimlerinin dizisini ortaya çıkarmıştır (Tijet, Helvig, & Feyereisen, 2001).



Şekil 2.12. P450 terminoloji şeması (Feyereisen, 2012)

CYP terminolojisi (Şekil 2.12) kodladıkları proteininin benzerlik derecesini ve genler arasındaki evrimsel ilişkileri yansıtacak biçimde şekillendirilmiştir. P450 proteinleri, bazı yazarlar ve InterPro tarafından, aktif bölgeye elektron aktarımını yansıtan sınıflara ve gruplara (B, E, I, II, III, vb.) göre kategorilere ayrılmıştır (Hannemann, Bichet, Ewen, & Bernhardt, 2007).

İnsektisit bileşiklerinin insektisidal etkisini detoksifiye eden Cyp6g1, Cyp12d1 ve Cyp6a2 genleri birbirleriyle gen homolojisine sahip olup bu genlerin direnç verileri son zamanlarda DDT, Neonikotinoidler, Piretroidler ve Organofosfatlarda belgelenmiştir. Cyp6g1, Cyp12d1 ve Cyp6a2 ve dört P450 geninin insektisit direncindeki rollerinin transpozon çeşitlilikleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Chen & Li, 2007; Jones vd., 2010). Cyp6g1, Cyp12d1 ve Cyp6a2 geni *Drosophila melanogaster*'de 2. Kromozomda yer alan P450 genleridir. Bu genler, heme enzimlerini bağlama, demir iyonlarını bağlama, moleküler oksijenin azaltılması veya arttırılması ile oksidoredüktaz aktivitesine sahip genlerdir (NCBI, 2018).

2.5.2 Glutatyon S – Transferazlar

Glutatyon S-transferazlar (GST'ler) hemen hemen tüm organizmalarda detoksifikasyon mekanizmasının önemli bir bileşeni ve metabolizma veya ksenobiyotik ürünlerine Glutatyon bağlayarak çözünürlüklerini arttıran ve hücreden atılımını sağlayan faz II detoksifiye edici enzimlerdir. Doğal koruyucu sistemlerden biri olarak

kabul edilen GST enzimleri pestisitler, antikanser ilaçlar kimyasal kanserojenler ve çevresel kirlilikler gibi elektrofilik etkenlerin detoksifikasyonunda önemli role sahiptir

Hücre içinde bulundukları yere göre sınıflandırılmış üç GST grubu vardır. Bunlar; mikrozomal ve sitosolik GST'ler ile memeli mitokondri ve peroksizomlarında bulunan Kappa sınıfıdır (Morel vd., 2004). Genel olarak sınıflandırılmış olan ise altı sitozolik GST protein sınıfı vardır. Bunlar; Delta, Epsilon, Omega, Teta, Sigma ve Zeta'dır. Sadece böceklerde sınıflandırılmış olanlar Delta ve Epsilon sınıflarıdır (Enayati, Ranson, & Hemingway, 2005).

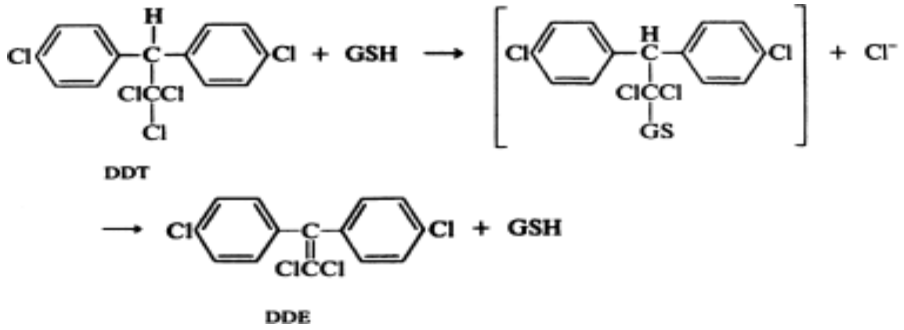
Drosophila melanogaster'de Delta ve Epsilon sınıflarından GSTD1, GSTD2, GSTD3, GSTD4, GSTD5, GSTD6, GSTD7, GSTD8, GSTD9, GSTD10 ve GSTE1, GSTE2, GSTE3, GSTE4, GSTE5, GSTE6, GSTE7, GSTE8, GSTE9 ve GSTE10 genleri tanımlanmıştır. Yapılmış bir çalışmada reaktif oksijen türlerinden Araşidonik asitin türevi olan 4-HNA(4 hydroxynonenal)'nın *Drosophila melanogaster* bireylerine uygulanması sonucu GSTD1'in 4-HNA'yı metabolize ettiği görülmüştür (Sawicki, Singh, Mondal, BENEŠ, & Zimniak, 2003) .

GST aracılı insektisit direncinin detoksifikasyon mekanizmaları doğrudan faz I mekanizmasıyla olabileceği gibi faz II P450 ve karboksilesteraz enzimlerinin detoksifikasyon mekanizmalarının ürünlerinin metabolize edilmesi şeklinde gelişebilmektedir. GST reaksiyonlarında en iyi bilinen glutatyonun (GSH) birleşme reaksiyonudur. GSH'lar kimyasalların elektrofilik merkezindeki indirgenmiş glutatyonun tiyol grubunun (GS-) nükleofilik saldırılarını katalize ederler (Mannervik, 1985). GSH'lar kimyasal ve/ veya kimyasalların suda çözülerek hücreden atılımını sağlayan yüksek duyarlılığa sahip nükleofil bölgeleri etkisizleştirirler (Habig, Pabst, & Jakoby, 1974).

Bugüne kadar, Glutatyon birleşmesi yoluyla gelişen direnç, organik fosforlular (Enayati vd., 2005; Yamamoto & Yamada, 2016) , piretroidler (Vontas, Graham, & Hemingway, 2001) ve spesifik akarisitler (Pavlidi vd., 2017) dahil olmak üzere farklı insektisit sınıflarında gösterilmiştir.

GST kaynaklı detoksifikasyon, dehidroklorinasyon reaksiyonu yoluyla da meydana gelebilir, burada GS- klorun ayrışmasına yol açan substrattan bir hidrojen atomunu uzaklaştıran bir kofaktör olarak kullanılır. Şekil 2.13'de klorlandırılmış

hidrokarbonlardan DDT için GST'nin aktif bölgesinde üretilen tiyolat anyonu (GS-), genel bir baz olarak hareket ederek DDT'den bir klor atomu uzaklaştırılması, hidrojen atomunun ayrılmasına yol açarak zararsız DDE' yi meydana getirmesi gösterilmiştir. Diğer klorlandırılmış hidrokarbonlu insektisitler, örn. Lindan, glutatyona konjugasyon yoluyla detoksifiye edilir (Enayati vd., 2005).



Şekil 2.13. GST'lerin DDT dehidroklorinaz aktivitesinin modeli (Enayati vd., 2005)

Son yıllardaki çalışmalar temel olarak böceklerin direnç kazanımı konusundaki mekanizmalarını değerlendirmek için iki genel yaklaşımı içermektedir: (1) Toplam GST aktivitesi düzeylerinin ölçülmesi ve (2) GST inhibitörlerinin kullanımı ile sinerjizm analizleridir.

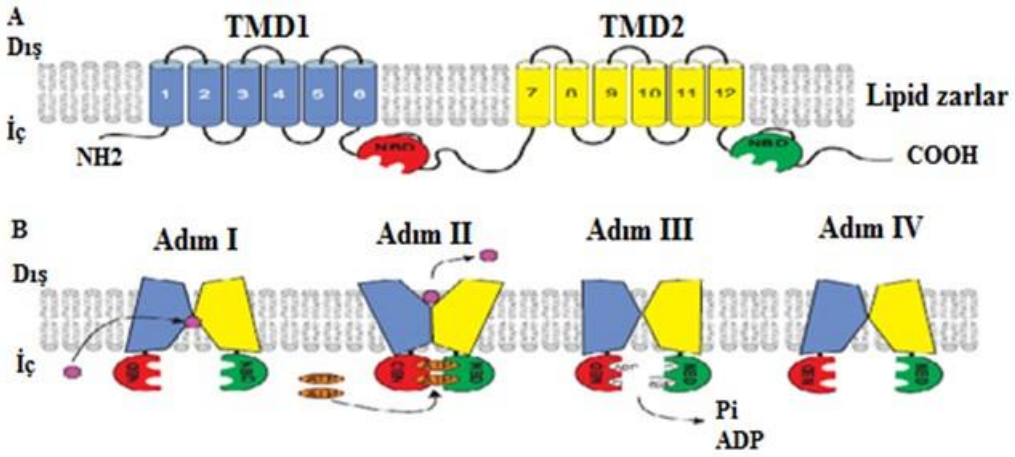
Genom dizileme teknolojilerindeki ilerlemeler, genom çapında mikrodiziler ve mRNA dizilemesi gibi kantitatif gen ifadeleri yeni yüksek verimli teknolojilere yol açmıştır. Bu, GST'lerin, toksik maddelere kısa süre maruz kalması üzerine oluşturdukları aşırı ekspresyonları direnç veya detoksifikasyondaki rollerini belirlemiştir. Modern biyokimyasal ve genetik teknikler, bireysel GST'lerin in vitro ve in vivo işlevlerinin ortaya çıkarılmasını kolaylaştırmıştır. (Pavlidi, Vontas, & Van Leeuwen, 2018).

2.5.3 ATP Bağlayan Kaset (ABC) Taşıyıcı Protein Ailesi

Drosophila melanogaster'da beyaz göz mutasyonunun keşfedilmesiyle *Drosophila melanogaster* genetiği ortaya çıkmış ve beyaz göz mutasyonu arthropodlarda ABC taşıyıcı proteinlerinin göstergesi olmuştur. ABC ailesi yaşamın

tüm alemlerinin en büyük taşıyıcı ailesi olarak kabul edilen faz III taşıyıcılarıdır. ABC-taşıyıcıları, aminoasit, şeker, lipit, inorganik iyon, polisakkarit, metal, peptid, toksik metabolit ve ilaçları da kapsayan bir dizi substratın taşınmasına aracılık eder. ABC ailesine ait proteinler sitoplazma ile dış çevre arasında oluşturdukları lipid zarlarından oluşan kanal yapısı ile ATP'nin bağlanması ve hidrolizi sonucu açığa çıkan enerjiyi kullanarak konsantrasyon farkına karşı maddelerin çift yönlü taşınmasına aracılık ederler.(Dermauw vd., 2014; Licht & Schneider, 2011)

Tüm hücreler ve organeller dış ortamdan lipid membranlarla ayrılır ve bu membranlar boyunca geniş çeşitlilikteki bileşikleri dolaşıma katmak için taşıyıcılara ihtiyaç duyarlar. ABC taşıyıcı proteinleri yapısal olarak ATP'yi bağlayan ve hidrolize eden iki sitosolik "nükleotid binding domain" (NBD) ve iki adet "transmembran domain'den (TMD) oluşur (Şekil 2.14) (Higgins & Linton, 2004; Rees, Johnson, & Lewinson, 2009).



Şekil 2.14. ATP aktarım mekanizması (Dermauw vd., 2014)

ATP-aktarım mekanizması, ABC taşıyıcılarının taşıma döngüsünün anlaşılması için kullanılan modeldir. Bu modelde taşıma döngüsü, substratların TMD'lere bağlanmasıyla başlatılmaktadır. Daha sonra, ATP bağlanması ve NBD-dimer oluşumunun kapanmasını kolaylaştıran NBD'lerde şekilsel bir değişiklik oluşmaktadır. Kapalı NBD dimeri, TMD'lerin dışa doğru dönmesi ve açılmasıyla, substrat translokasyonunu başlatarak TMD'lerde büyük bir şekilsel değişikliği oluşturur. Son

adımda, ATP, kapalı NBD dimerinin açılarak temel konumuna dönmesi için hidrolizlenir. (George & Jones, 2012)

ABC protein ailesi, NBD'lerin sekans benzerliğine dayanarak, A-H harfleriyle gösterilen sekiz alt aileye bölünmüştür.

-ABCA alt familyası: ABCA taşıyıcılarının arthropod taşıyıcıları tam olarak bilinmemektedir. Ancak lipid taşınmasında rol alıyor olabileceği düşünülmektedir.

-ABCB alt familyası: ABCB taşıyıcıları yarım ve tam taşımayı içerir. ABCB-FT tam taşınmayı içerir ve MDR49, MDR50 ve MDR65 insektisitlerin taşınmasında rol alırlar. ABCB-HT yarım taşıma ise ağır metallerin taşınmasında rol alırlar.

-ABCC alt familyası: Hücre yüzeyi reseptör aktivitesi, iyon taşımacılığı gibi işlevsel olarak farklı özelliklere sahiptir. Geniş çapta ilaçları geçirme kabiliyetleri nedeniyle birçok ABCC çoklu ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir.

-ABCD alt familyası: dimerizasyon için gerekli olan yarı taşımadaki işlevsel taşıyıcıları oluştururlar.

-ABCE ve ABCF alt familyası: diğer ailelerden 2 NBD (nükleotid bağlayan bölge)'ye sahip olan ancak TMD (transmembran bağlayan bölge)'ye sahip olmayan taşımadan başka biyolojik süreçlerde yer alan ailelerdir.

-ABCG alt familyası: *Drosophila melanogaster*'de göz rengi fenotipinin belirlendiği taşıma ailesidir ve insektisitlerin taşınmasında rol alırlar.

-ABCH alt familyası: fonksiyonları tam olarak anlaşılmamış olmasına karşın ABCG ailesine benzerdirler (Dermauw vd., 2014).

Bakteri, nematod ve insan ABC taşıyıcılarına kıyasla, artropod ABC taşıyıcıları hakkındaki bilgiler oldukça azdır. Şimdiye kadar 400 artropod ABC proteininden 7 arthropod türünün ABC familyaları detaylı olarak incelenmiştir. Bunlar; Dipterlerden *Drosophila melanogaster* ve *Anopheles gambiae*, bal arısı *Aphis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), ipek böceği *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), un biti *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), iki noktalı kırmızı örümcek *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) ve su piresi *Daphnia pulex*'dir (Diplostraca: Dapniidae) (Broehan, Kroeger, Lorenzen, & Merzendorfer, 2013; Dermauw vd., 2013;

Xie vd., 2012; S. Liu vd., 2011; Sturm, Cunningham, & Dean, 2009; Roth vd., 2003; Dean, Rzhetsky, & Allikmets, 2001).

2.5.3.1 ABCB Ailesi

ABCB alt ailesi, yarım (HT) ve tam taşıyıcılardan (FT) oluşmaktadır. Bu alt aile soya özgü kopyalarıyla kendini çeşitlendirmiştir. *Drosophila melanogaster*'deki ABCB FT'lerden, MDR65 geni kan-beyin bariyeri (BBB)'deki kimyasal etkileşimler ve MDR49 geni üreme hücrelerinin göçünde önemli bir rol oynadığı için kapsamlı bir şekilde çalışılmışlardır. *D.melanogaster*'deki homoloji araştırması, kromozomal konumlarına göre adlandırılan MDR49, MDR50 ve MDR65 genlerinin tanımlanmasına yol açmıştır. *Drosophila melanogaster* MDR homologları, memeli homologlarına yaklaşık % 50 oranında özdeş ve nükleotid seviyesinde kendi aralarında % 53 oranında homolojiye sahiptirler.(Gerrard, Stewart, & Dean, 1993; Wu, Budding, Griffin, & Croop, 1991). Bu ABC taşıyıcılarının insektisitlerin vücuttaki dağılımı üzerinde bir engel oluşturması veya değiştirmesi olasılığı az sayıda araştırılmıştır. *Drosophila melanogaster*'in DDT dirençli ırkları üzerinde yapılan bir çalışmada, RNAi baskılanmasının DDT'nin LD_{50} dozunda MDR50 ve MDR65 genlerinde küçük ama anlamlı bir azalmaya yol açtığı ancak MDR49 geninde hiçbir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Gellatly vd., 2015). *Bombyx mori*'deki MDR49 ve MDR50 genleri çoklu ilaç ve insektisit direncine verdikleri yanıtlar insan ABCB1 genleri ile benzerlik göstermektedir (Schinkel vd., 1995).

2.5.3.2 ABCC Ailesi

Geniş özgüllüğe sahip ilaçları üretme yeteneklerinden dolayı, birçok ABCC, çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinler (MRP'ler) olarak isimlendirilmişlerdir. "uzun" MRP'ler "kısa" MRP'lere kıyasla. ekstra N-terminal transmembran bağlayan bölge (TMD0) içermektedirler (Deeley, Westlake, & Cole, 2006). MRP'ler, geniş bir glukuronat, sülfat ve glutatyon (GSH) organik anyonlarını aktif olarak taşıma kabiliyeti ile P-gp (ABCB FT)'lerden farklıdır. Bazı MRP'lerin elektrofilik ilaçlara ve karsinojenlere direnç kazandırmak için GST enzimleri ile sinerji içinde hareket ettiği gösterilmiştir (Leslie, 2012; Liu vd., 2012; Sau, Pellizzari Tregno, Valentino, Federici,

& Caccuri, 2010). İnsan ABCC proteinleri, iyon transportu, hücre yüzeyi reseptör aktivitesi ve çok çeşitli substratların translokasyonu, ilaçlar, siklik nükleotidler, endojen ve eksojen bileşikler ve bunların glutatyon konjugatları gibi fonksiyonel olarak çeşitli işlevlere sahip tam taşıyıcılardır (Keppler, 2011; Leslie, Deeley, & Cole, 2005; Schinkel & Jonker, 2003; Dean vd., 2001).

ABC-C proteinlerinin arthropodlarda birebir ortologlarının bulunması insan ve arthropodlarda bu proteinin korunduğunu göstermektedir. İnsan sulfonil üre reseptör (insan ABCC8 / SUR1 ve insan ABCC9 / SUR2) genleri *Drosophila melanogaster*'de SUR, *A. gambiae* AGAP009799, *B. mori* BGIBMGA006882, *A. mellifera* AmABCC2, *D. pulex* Dappudraft_442500 ve *T. Urticae*'de tetur11g05990 isimleriyle bir araya getirilmiştir. Sülfonilüre reseptörleri (Figueira-Mansur vd.), ATP bağımlı potasyum kanallarını (K_{ATP}) oluşturmak için içsel potasyum alt birimlerinin düzeltilmesi ile bir araya getirilir. ATP' ye duyarlı potasyum (K_{ATP}) kanalı, çoğunlukla uyarılabilir dokularda eksprese edilir ve hücre içi enerjileri elektriksel aktiviteye bağlayarak çeşitli fizyolojik süreçlerde kritik bir rol oynar. Bu kanallar, glikoz homeostazisi, iskemik koruma ve doğuştan gelen bağışıklıktaki rolleri olan çoklu fizyolojik süreçlerde yer alırlar (Eleftherianos vd., 2011; Alejandro, S Eliza, Colin, & Monica, 2009).

ABC taşıyıcıları, karbamatlar, makrosiklik laktonlar, neonikotinoitler, organofosfatlar, piretroidler, siklodienler, benzoilüreler, fenilpirazoller, DDT ve çeşitli etki gruplarına ait 27 farklı insektisit ve akarisitin taşınması ve direnci ile ilişkilendirilmiştir. ABCB FT (P-gp), ABCC'ler ve ABCG alt aileleri insektisit taşınması ve dirençle ilgili en çok bildirilen ABC alt aileleridir (Dermauw vd., 2014).

Toksinlerin büyük bir kısmı, organik anyonlar ve katyonlar böceklerde renal sistemin bir parçası olan malpigi tüplerinden atılmaktadır. Multi drug efflux transporter (MET) geni tam olarak hangi aileye dahil olduğu belirlenememiş olan ancak ilaç detoksifikasyonunda rol aldığı düşünülen bir proteindir. *Drosophila melanogaster* ergin ve larvalarının besiyerlerine uygulanan methotrexate bileşiğinin toksik etkisi ve malpigi tüplerinden detoksifiye edilme oranlarında P450 ve GST enzim sistemlerinin yanında MRP1 ve MET proteinlerinin toksik bileşiğin atılımında birlikte aktif rol aldıkları gösterilmiştir (Chahine, Seabrooke, & O'Donnell, 2012).

2.6. Apoptoz Yolağı Genleri

Apoptoz genel olarak hücrelerin programlı bir şekilde kendi kendilerini yok ettikleri enerji gereksinimi (ATP) duyan, genlerle düzenlenen, protein sentezine gereksinim duyan moleküler bir olaydır. Apoptoz uyarısı alan hücreler, komşu hücrelerle ayrılır veya bağlantı noktaları ortadan kalkar, büzüşür, kromatin yapısı yoğunlaşarak piknotik bir görünüme kavuşur. Hücre organelleri bütünlüklerini korurken hücre zarı yapısında bulunan fosfotidil serin hücre zarının iç yüzeyinden dış yüzeyine taşınır. Çekirdek küçülerek parçalara ayrılır Hücre zarla çevrili tomurcuklar halinde kopar ve apoptotik cisimciklere ayrılır. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınarak yok edilirler. Apoptozun genel olarak düzenlenmesinde Bcl-2, kalsiyum gibi moleküller ile p53, sitokrom-c ve kaspazlar gibi proteinler ve mitokondriyonlar rol alırlar (Bellamy, Malcolmson, Harrison, & Wyllie, 1995; Ellis, Yuan, & Horvitz, 1991).

Bir hücrenin apoptoza eğilimli olup olmadığı Bcl-2 ailesi genlerinin homodimer veya heterodimer yapısına bağlıdır. Bcl-2 ailesi birbirine zıt 2 gruptan oluşmaktadır. Bunlar;

- Proapoptotik üyeler: Bad, Bak, Bcl-xs, Bid, Bim, Bax, Puma ve Noxa
- Antiapoptotik üyeler: Bcl-2, Bcl-xl ve Mcl1'dir.

Proapoptotik proteinler sitozol ve mitokondride yer alırken, antiapoptotik proteinler; endoplazmik retikulum, çekirdek zarı ve mitokondriyon dış membranında yer alırlar.

Kaspazlar sistein proteazlar olup aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar. Hücrede inaktif durumdadırlar ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Hedef proteinleri keserek apoptoza neden olurlar.

I- Başlatıcı kaspazlar; (Kaspaz 2,8,9,10),

II- Efektör (Sonlandırıcı) kaspazlar (Kaspaz 3,6,7),

III- İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14)

Kaspazlar, DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler. Hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olurlar. Apoptoz aktive edildikten sonra hücrede geri dönüşümsüz bir programlanmış ölüm başlar (Adams & Cory, 2001; Adrain & Martin, 2001)

2.7. Antioksidan Yolak Genleri

Canlı metabolizmaları sağlıklı iken antioksidan genler ile serbest radikaller denge halindedir. Serbest radikaller oksijen veya nitrojen kaynaklı olabilmektedir. Reaktif oksijen türleri süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($RO_2^{\cdot}$) ve lipit peroksil ($LOO^{\cdot}$) radikalleri sayılabilir. Bu oksijen türleri canlılar tarafından üretilmekte ve canlı organizmada kolayca serbest radikal durumuna geçebilmektedirler. Abiyotik ve biyotik stres etmenleri reaktif oksijen türleri kaynaklarının artışı vücutta karbonhidrat, protein, yağlar ve DNA'nın hasar görmesine yol açarak oksidatif strese neden olmaktadırlar. Serbest radikallerin meydana getirdiği hasarları ortadan kaldırmak üzere antioksidan sistemler savunma görevi üstlenirler. Bu sistemler; endojen ve eksojen antioksidanlar olmak üzere 2'ye ayrılırlar. Antioksidanlar serbest radikallerin yarattığı olumsuz koşulları ortadan kaldırmak için süpürücü olarak hareket ederler (Shinde, Ganu, & Naik, 2012; Valko vd., 2007).

Süperoksit dismutaz; Reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunmayı oluşturan enzimlerdir. Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizleyen enzimatik bir antioksidandır. Hidrojen peroksit daha sonra, Katalaz tarafından ortamdan uzaklaştırılır. Oksijen radikallerine karşı en önemli savunucular arasında süperoksit dismutaz enzimleri bulunmaktadır. SOD enzimleri aktif bölgelerinde bulunan geçiş metallerine göre isimlendirilmişlerdir.

SOD1 Sitoplazmada; Bakır/Çinko Süperoksit dismutaz Cu/Zn SOD

SOD2 Mitokondride; Mangan Süperoksit dismutaz Mn SOD Mitokondrideki serbest radikaller, enerji üreten oksidatif fosforilasyonun yan ürünleridir.

SOD3 Hücre dışında; Bakır/Çinko Süperoksit dismutaz Cu/Zn SOD (Aldred, Buck, & Vall, 2009)

Katalaz; Hidrojen peroksitin, H_2O ve O_2'ye dönüşümünü katalize eder. Peroksizomlar gibi hücre içi organellerde daha çok olmak üzere mitokondri ve endoplazmik retikulumda daha az bulunur. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot}$) SOD enzimi aracılığıyla Hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüştürülür. Hidrojen peroksit bir radikal olmamasına ve biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile reaksiyona girmemesine rağmen, Cu ve Fe iyonlarının katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile en reaktif oksijen türü olan hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır.

Katalaz H_2O_2'i su ve oksijene dönüştürerek zararsız forma getirir (Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009).

Glutatyon (GSH); hücrenin redoks durumunu korumada, detoksifikasyon sisteminin çalışmasında, eikosonoidlerin sentezlenmesinde, hücre sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde, gen ekspresyonunda ve apoptozisde de antioksidan olarak hareket eder. Glutatyonun önemli bir kısmı sitoplazmada bulunurken, küçük bir kısmı sitoplazmada sentezlendikten sonra mitokondri, çekirdek, endoplazmik retikulum ve peroksizomlar da bulunabilir. Glutatyonun sentezlenmesi iki önemli aşamada olur. İlk olarak glutamin-sistein ligaz (GCL), glutamin ve sisteini bağlayarak ɣ-glutamilsisteini oluşturur. İkinci olarak glutatyon sentetaz (GSS), ɣ-glutamilsisteine glisini bağlayarak GSH molekülünü meydana getirir. Glutamin-sistein ligaz, katalitik (GCLC) ve düzenleyici (GCLM) alt birimlerden oluşmaktadır. Glutamin-sistein ligazın katalitik alt birimi, katalitik aktivite için sistein ve glutaminin bağlanmasından sorumludur. Glutamin-sistein ligazın düzenleyici alt birimi ise GCLC'nin etkisini artırır Glutatyon, GPx'in katalitik etkisiyle lipit peroksitleri ve H_2O_2'yi detoksifiye eder ya da singlet oksijen ($^1O_2$) ve $OH^{\cdot}$'ti temizler. Ayrıca GSH plazma membranından aminoasit transportunu sağlayarak bazı önemli antioksidanları yeniden oluşturur (Kalinina, Chernov, & Novichkova, 2014).

2.8. HSP (Isı Şok Proteinleri) Yolağı Genleri

Fizyolojik koşullarda HSP'ler proteinlerin doğru katlanmasından ve katlanmayan proteinlerin degredasyonundan sorumlu proteinlerdir. Hücrede yeni üretilen proteinlerin doğru katlanmasını sağlayan maddelere "moleküler şaperonlar" denilmektedir. Ökaryotlarda protein katlanmaları translasyon aşamasında oluşmaktadır. Yeni sentezlenen proteinlerin yanlış katlanmaları hücrede çökmelerine sebep olur. Bu aşamada moleküler şaperonlar devreye girerek yanlış katlanmaları düzeltirler ve proteinlerin çökmelerini engellerler. Isı artışı ile protein katlanma hataları fazlalaştığından şaperonların çoğu HSP'lerdir. (Öztürk, Kahveci, Özlük, & Yılmazlar, 2009).

HSP'ler ilk kez Ferruccio Ritossa (1962) tarafından *Drosophila melanogaster* kromozom bölümlerinde özel bir sınıf olarak tanımlanmıştır. HSP'ler ısı şokunun yanı

sıra pek çok uyaran tarafından uyarılır. Bunlardan bazıları; UV radyasyon, alkol, ağır metal iyonları, virüs enfeksiyonu, bakteriyal ürünler, hücre farklılaşması, hormonal etkiler, zihinsel stres, çok fazla ya da çok az egzersiz, çok fazla oksidasyon vb. etkiler stres proteinlerinin üretilmesini etkilerler. Şaperonların çoğu yanlış katlanmış bölgelere yapışarak proteinlerin kümelenmelerini önlerler. Hedeflerine bağlanan şaperonlar hasarlı proteinlerin toplayıcıları olarak hareket ederler. HSP'lerin şaperon aktivitesi olanlar iki gruba ayrılmışlardır. 90 kDa ağırlığındaki HSP90 ailesi (HSP104, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40) ve küçük (HSP27) HSP'lerdir (Csermely & Yahara, 2003).

Şaperon monomer proteinleri yalnız çalışmazlar. Şaperonların çoğu oligomerlerle ve/veya ko-şaperonların yardımıyla çalışırlar. Proteinlerin yeniden katlanabilmesi için enerjiye gereksinim duyarlar. Bunun için ATP'yi bağlayarak hidrolize ederler. ATP ayrılması katlanan parçaya yardımcı olan şaperonlarda yapısal bir değişikliği indükler. Şaperonlarda ATPaz miktarı azdır. ATP'nin hidrolizi, yanlış katlanmış hedef proteine yeterli zaman imkanı verecek düzeyde yavaş ve verimsizdir. ATP hidroliz ürünü olan ADP'nin başka bir ATP'ye değişimi birkaç ko-şaperon tarafından düzenlenir. Ko-şaperonlar hedef moleküllerin bağlanması ve ayrışmasını etkileyebileceği gibi hedefleri veya tüm şaperon kompleksini hücrenin içindeki çeşitli hedeflere yönlendirebilir (Csermely & Yahara, 2003).

Hücrede bazı HSP'lerin yerleşim yerleri ve işlevleri:

HSP27: Sitoplazmada, protein kümelenmesinin engellenmesi, hücre büyümesi, farklılaşması

HSP60: Mitokondride, protein kümelenmesinin engellenmesi ve protein katlanması

HSP70: Sitoplazmada, stres spesifik olarak protein kümelenmesinin engellenmesi ve protein katlanması (Csermely & Yahara, 2003).

HSP'ler proteinlerin katlanmasında, stres durumlarında veya proteinlerin çözülmesi sırasında kümeleşmelerini engeller. Birçok HSP stres durumlarında sentezlenip sitozole salınır. Bu HSP'ler substratlardaki hidrofobik artıkları ve yapısı bozulmuş bölgeleri tanır ve normal katlanma prosedürünün tamamlanması için bunların üzerlerini örter. Böylece hidrofobik etkileşimden ortaya çıkabilecek kümelenmeler engellenmiş olur (Fan, Lee, & Cyr, 2003).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *Drosophila melanogaster* Stok Kültürü

Bu tez çalışmasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Görüntüleme Laboratuvarı ve Moleküler Genetik laboratuvarları ile Stereo Mikroskop kullanımı için Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Elektron Mikroskop Laboratuvarı kullanılmıştır.



Şekil 3.1. *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ Stereo mikroskop görüntüsü (20X)

Drosophila melanogaster Oregon R^+ ırkı (Şekil 3.1) model organizma olarak kullanılmıştır. Sirke sineği olarak da bilinen *Drosophila melanogaster* moleküler genetik, toksikoloji, gen biyolojisi, hücre biyolojisi, populasyon genetiği ve böceklerde ilaç direnci gelişimi gibi alanlarda model organizma olarak kullanılmaktadır (Wilson, 1988).

MATERYALLER

Kullanılan Cihazlar

Cihaz	**Markası Modeli ve Ülkesi**
Soğutuculu İnkübatör	FOC Cooled Incubator-VELP Scientifica, İtalya
Analitik Terazi	UniBloc-AND-HR 250 AZ, Japonya
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	VWR, ABD
Distile su cihazı	ELGA-Purelab Option-Q, Almanya
Homojenizatör	DAIHAN Scientific – HG-15D, Kore
Karıştırıcı blok inkübatör	BİOER Technology, Çin
Santrifüj	Hettich Micro 200R, Almanya
Vorteks karıştırıcı	VELP Scientifica, İtalya
Nanodrop	Optizen- NanoQ, Kore
Derin Dondurucu (-20 ºC)	Vestel, Türkiye
Derin dondurucu (-80 ºC)	NUAIRE-Ultralow Freezer, ABD
Thermal döngü cihazı-PCR	Applied Biosystems- ProFlex, ABD
Gerçek zamanlı PCR Cihazı	Applied Biosystems-QuantStudio, ABD
Otomatik pipet seti	RAININ, ABD
Dijital pipetör	Thermo Fisher Scientific, ABD
Stereo Mikroskop	OLYMPUS-SZX7 -TH4–200, İngiltere

Kimyasal sarf ve diğer malzemeler *Ek* bölümünde verilmiştir.

YÖNTEMLER

3.2. *Drosophila melanogaster* Kültürü ve Yetiştirilmesi

Drosophila melanogaster stok kültürleri 200 ml'lik steril cam şişelerde standart besiyeri ortamında, 25±1ºC sıcaklık ve %60±70 oransal nem koşullarına sahip soğutuculu inkübatörde (VELP Scientifica-FOC Cooled Incubator, İtalya) (Şekil 3.2) karanlık koşullarda yetiştirilmiştir. Stok kültürlerin ve tez çalışmasında kullanılan sinek kültürlerinin devamlılığı aynı koşullarda sağlanmıştır.



Şekil 3.2. 25±1ºC sıcaklık ve %60±70 oransal nem koşullarına sahip soğutuculu inkübatör

3.2.1. Besiyeri Hazırlanması

Stok kültürlerin devamlılığı ve tez çalışmasında kullanılacak olan bireyler steril cam şişelerde, besiyeri ortamında, şişelerin ağızları gazlı bez ve hidrofob pamuktan oluşan tampon ile kapatılarak sağlanmıştır. Besiyeri hazırlanmasında kullanılan malzemeler ve miktarları aşağıda verilen oranlarda kullanılmıştır

Besiyerinin içeriği;

Mısır unu;52 gr

Şeker; 47 gr

Maya; 9,5 gr

Agar agar;3 gr

Distile su; 510 ml

Asit karışımı; 3 ml (83 ml Ortofosforik asit + 386 ml Propiyonik asit + 1081 ml distile su)

Asit karışımı hariç tüm malzemeler pişirme kabına alınarak ısıtıcıda 300 ºC sıcaklıkta 30-40 dk süreyle pişirilmiş ve pişirme kabı ısıtıcıdan alındıktan sonra asit karışımı ilave edilerek tüm besiyeri cam behere ardından cam şişelere aktarılmıştır. Sıcak olan besiyerinin soğuması için cam şişeler kurumaya bırakılmıştır. Steril ortamda kurumaları sağlanan besiyeri şişelerinin iç duvarında oluşan buharlanmalar yok olduktan sonra Şişelerin ağızları tampon ile kapatılarak serin ve kuru ortamda bekletilmiştir. Besiyerleri daima taze olarak hazırlanmış ve bekletilmeden kullanılmıştır. Sinekler UV ile sterilize edilmiş ortamda taze besiyeri şişelerine aktarılarak şişe ağızları tampon ile kapatılmış ve Şekil 3.3'de gösterildiği gibi kontrollü koşullardaki inkübatöre alınmıştır.



Şekil 3.3. *Drosophila melanogaster* stok kültürü

3.3. İnsektisit Uygulamaları

Drosophila melanogaster'de insektisit direnci geliştirmek için kullanılan Deltamethrin aktif maddeli K-othrine SC 50 (Bayer) ve Thiamethoxam aktif maddeli Agita 10 WG (Novartis) insektisitleri Edirne ilinde bulunan zirai ilaç bayilerinden temin edilmiştir. Çalışmadan homojen sonuç alabilmek için aynı yaşta çok sayıda sinek üretilerek. pupadan çıkmış ve cinsel erginliğe ulaşmış 1 günlük sinekler uygulamalarda kullanılmıştır. Çalışmada; Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit uygulama grupları kullanılmıştır. Kontrol bireylerine distile su püskürtülmüştür. Toksikoloji çalışmalarında kullanılacak olan maddenin doz-cevap ilişkilerinin bilinmesi ve minimum etkili dozun bulunması gereklidir. Bu kapsamda populasyonun yarısını öldüren dozun (LD_{50}) bilinmesi için her insektisit uygulama grubunda LD_{50} dozu belirlenmiştir.

3.3.1. Deltamethrin Uygulaması

Deltamethrin denemesinde aktif maddesi Deltamethrin olan Bayer K-othrine SC 50 kullanılmıştır. Doz belirlenmesinde halk sağlığı ve bitki koruma alanlarındaki kullanımları göz önünde bulundurularak yüzey ilaçlama için önerilen doza göre hesaplamalar yapılmıştır.

3.3.1.1. Deltamethrin LD_{50} Doz Belirlenmesi

Deltamethrin aktif madde oranı 50gr/lt sudur. Yüzey ilaçlaması için tavsiye edilen doz $1m^2$ alan için 0.5ml/50 ml kullanım dozu ise 10000 ppm olarak belirlenmiştir. *Drosophila melanogaster* bireylerinde LD_{50} dozunun belirlenebilmesi için 10000 ppm, 5000 ppm, 2500 ppm, 1250 ppm, 625 ppm ve 313 ppm dozları 50 ml'lik falkon tüplerde hazırlanmıştır. Aynı yaşta elde edilen sinekler boş steril cam şişelere alınarak buzdolabının -20ºC'lik bölümünde 7-8 dk sürede bayıltılmışlardır. Dozlar 50 ml'lik sprey şişesiyle baygın sineklere püskürtülerek uygulanmıştır. Her Deltamethrin dozundan 1 grup ve 3 tekrarlı olmak üzere toplam 18 şişe hazırlanmıştır. Doz uygulamarından 24 saat sonra canlı ve ölü sineklerin sayımları yapılmıştır.

3.3.2. Thiamethoxam Uygulaması

Thiamethoxam denemesinde aktif maddesi Thiamethoxam olan Novartis Agita 10 WG kullanılmıştır. Doz belirlenmesinde halk sağlığı ve bitki koruma alanlarındaki kullanımları göz önünde bulundurularak yüzey ilaçlaması ile önerilen doza göre hesaplamalar yapılmıştır.

3.3.2.1. Thiamethoxam LD_{50} Doz Belirlenmesi

Thiamethoxam'ın aktif madde oranı %10'dur. Yüzey ilaçlama yönteminde tavsiye edilen doz $1m^2$ alan için 5gr/40 ml ve kullanım dozu ise 125000 ppm olarak hesaplanmıştır. *Drosophila melanogaster* erginlerinde LD_{50} doz belirleme deneyi için 125000 ppm'den başlayarak 62500 ppm, 31250 ppm, 15625 ppm, 7813 ppm ve 3907 ppm dozları 50 ml'lik falkon tüplerde hazırlanmıştır. Sinekler, Şekil 3.4'de gösterildiği şekilde boş ve steril olan cam şişelerine aktarılarak buzdolabının -20ºC'lik bölmesinde 7-8 dk bekletilmiştir. Baygın sineklere doz uygulamaları 50 ml'lik sprey şişesiyle püskürtülerek uygulanmış ve taze besiyeri içeren cam şişelere insektisite maruz bırakılan bireyler hızlıca aktarılarak şişelerin ağızları tamponlarla kapatılmıştır.



Şekil 3.4. Sineklerin insektisit uygulamaları için boş şişelere aktarılması

Thiamethoxam dozlarının belirlenmesinde 6 grup ve 3 tekrardan oluşan toplam 18 şişe kullanılmıştır. Şişeler kontrollü koşullardaki inkübatöre alınmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra sineklerin canlı ve ölü sayımları yapılmıştır.

3.3.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulaması

Deltamethrin+Thiamethoxam grubu uygulamaları için iki insektisit grubunun önerilen dozlarının yarısı referans alınmıştır. Deltamethrin için 5000 ppm ve Thiamethoxam için 62500 ppm'den 50 ml'lik falkon tüpte karışım hazırlanmış ve seri seyreltmelerle 6 farklı doz uygulamalarda kullanılmıştır.

3.3.3.1. Deltamethrin+Thiamethoxam LD_{50} Doz Belirlenmesi

Deltamethrin ve Thiamethoxam insektisitlerinin önerilen uygulama dozlarının yarısından başlanarak 50 ml'lik karışımdan 6 seri seyreltme ile uygulama dozları elde edilmiştir. Aynı yaştaki *Drosophila melanogaster* erginleri boş, steril cam şişelere aktarılarak buzdolabının -20ºC'lik bölümünde 7-8 dk süre tutularak bayıltılmışlardır. Belirlenen dozlar baygın sineklere 50ml'lik sprey şişesiyle püskürtülerek uygulanmış ve hızlıca taze besiyeri ortamına alınarak şişelerin ağızları tamponlarla kapatılmıştır. 6 doz

grubu ve 3 tekrardan oluşan denemede 18 adet cam şişe kullanılmıştır. 24 saat süreyle inkübatörde kontrollü şartlarda tutulan sineklerin canlı ve ölü sayımları yapılmıştır.

3.4. Dirençli Nesil Yetiştirilmesi

LD_{50} dozları belirlenen insektisit grupları aynı yaştaki ergin *Drosophila melanogaster* bireylerine uygulanmıştır. 12 günde yaşam döngüsünü tamamlayarak ergin ve fertil hale gelen sineklere uygulamalar 13. günde 1 günlük olan sinekler kullanılarak yapılmıştır. Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit gruplarının LD_{50} dozları günlük olarak hazırlanmıştır. 50 ml'lik sprey şişesine aktarılan insektisit dozları buzdolabının -20ºC bölmesinde 7-8 dk tutularak bayıltıldıktan sonra insektisitler sprey ile püskürtülerek uygulanmış ve hızlıca taze besiyeri içeren şişelere yumuşak uçlu suluboya fırçası kullanılarak aktarılmıştır. Her insektisit grubu için 3 tekrarlı şişeler kullanılmıştır. Kontrol grubu bireyleri için de aynı yaştaki bireyler kullanılarak dirençli nesiller ile birlikte kültür devamlılığı sağlanmıştır.



Şekil 3.5. *Drosophila melanogaster* dirençli nesil yetiştirilmesi

Deneyde ki gruplar; kontrol grubu (hiçbir uygulama yapılmamış olanlar) ve dirençli gruplar; Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam grupları olarak ayrı uygulamalar yapılmıştır. Örnekler 24 saat sonra sayılarak yaklaşık eşit miktarda sinek çekme yöntemiyle ağız aspiratörü aracılığıyla toplanmıştır. Şişelerde hiç sinek bırakılmayarak sonraki jenerasyon için bırakılmış olan yumurtaların yaşam

döngülerini tamamlamaları beklenmiştir. Her nesilde tüm işlemler aynı şartlarda tekrarlanarak bir sonraki nesil için uygun koşullar oluşturulmuştur. Deneme 5 nesil süresince tekrarlanarak 5. nesil dirençli bireyler elde edilmiştir. Moleküler testlerde kullanılmak üzere %70 alkol ortamına alınan örnekler 15 ml'lik falkonlarda -20 ºC soğutucuda, morfolojik analizlerde kullanılacak örnekler ise -80 ºC'deki soğutucuda kuru örnek olarak saklanmıştır.

3.4.1. Dirençli Nesillerde LD_{50} Hesaplanması

İnsektisit uygulama gruplarında duyarlı bireylerde belirlenmiş olan LD_{50} dozlarının 5 nesil boyunca uygulanması sonucu toksik etkinin sonraki nesillerde de aynı dozlarda devam edip etmediğini tespit etmek amacıyla 5. nesil dirençli bireyler kullanılmıştır. 5. nesil dirençli bireylerden fazla sayıda üretilerek her insektisit grubundan Şekil 20'de gösterildiği gibi 3 tekrar ve 5 farklı doz uygulaması için 15 şişe kullanılmıştır.



Şekil 3.6. 5. nesil Deltamethrin dirençli *Drosophila melanogaster*'lere LD_{50} uygulamaları

Deltamethrin için; 5. nesil Deltamethrin dirençli bireylere; 506 ppm, 1012 ppm 2023 ppm 4046 ppm 8092 ppm (1/4 LD_{50}, 1/2 LD_{50}, LD_{50}, 2x $LD_{50,}$ 4x LD_{50}) dozlarının uygulanmıştır. Thiamethoxam için; 5. nesil Thiamethoxam dirençli bireylere; 4630 ppm, 9260 ppm 18518 ppm 37036 ppm 74072 ppm (1/4 LD_{50}, 1/2 LD_{50}, LD_{50}, 2x $LD_{50,}$

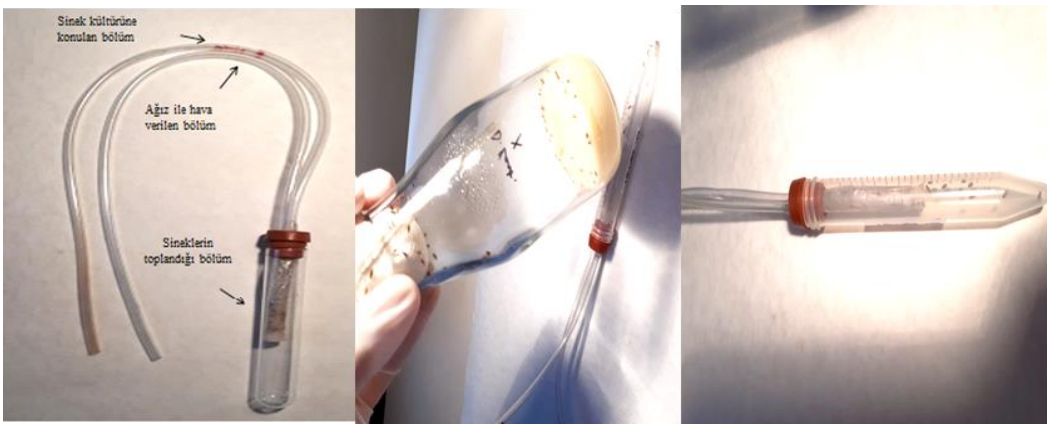
4x LD_{50}) olarak belirlenen dozlara maruz bırakılmıştır. Deltamethrin+Thiamethoxam birleşimi için;

Deltamethrin için uygulanmış LD_{50} dozu 347 ppm'in 8 katı 25 ml olarak hazırlanıp,

Thiamethoxam için uygulanmış LD_{50} dozu 4325 ppm'in 8 katı 25 ml olarak hazırlanıp birleştirilmiş ve (1/4 LD_{50}, 1/2 LD_{50}, LD_{50}, 2x LD_{50}, 4x LD_{50}) seri seyreltmeler yapılarak belirlenmiş dozlar 1 günlük ergin sineklere uygulanmıştır.

3.5 Ağız Aspiratörü ile Çekme Yöntemi

Yaşları eşitlenerek kültüre alınmış olan sineklere Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam LD_{50} dozları 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Deneme 9 adet besiyeri içeren şişe ile kurulmuştur. İnsektisit maruziyetinden 24 saat sonra sayımları yapılan *Drosophila melanogaster*' ler ortama yumurtalarını bırakmışlardır. Ergin sinekler (Şekil 3.7) 15 ml'lik falkonlara ağız aspiratörü ile çekilerek besiyeri ortamından uzaklaştırılmışlardır.



Şekil 3.7. Ağız aspiratörü ile çekme yöntemi

Dirençli sinekler ve kontrol grubu sineklerinden alınan örnekler moleküler testlerde kullanılmak üzere 15 ml'lik falkon tüplerde %70'lik alkol içerisine alınarak buzdolabının (Vestel) -20ºC'lik soğutucu bölmesinde saklamıştır. Morfolojik analizlerde kullanılacak örnekler ise kuru olarak -80ºC'lik soğutucuda (Ultralow

Freezer- NUAIRE) saklanmıştır. Kültürün devamlılığı ve örneklerin toplanması 5 nesil boyunca aynı koşullarda tekrarlanarak devam ettirilmiştir.

3.6.Genetik Analizler

Çalışmamızda dirençli; Deltamethrin, Thiamethoxam, Deltamethrin+Thiamethoxam uygulaması yapılmış olan *Drosophila melanogaster* ergin bireyleri ile kontrol grubu bireylerinin genetik analizlerinin yapılabilmesi amacıyla qRT- PCR (gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile gen ifadelerinin belirlenmesi deneyi yapılmıştır. Kontrol ve dirençli bireylerin ABC taşıyıcı proteinleri, sitokrom P-450 monooksijenaz ve GST (Glutatyon S-Transferaz) detoksifikasyon mekanizması gen ailelerinin genleri ile Apoptoz yolağı, Antioksidan gen yolağı ile HSP (Isı Şoku proteinleri) yolağı genlerinin gen ifadelerinin belirlenmesi amacıyla bireylerin RNA'ları kullanılmıştır. RNA izolasyonu öncesinde doku homojenizasyonu işlemi yapılmıştır.

3.6.1. Doku Homojenizasyonu

Doku homojenizasyonu için; 2 ml'lik laboratuvar tüplerine kontrol grubu, 5. nesil dirençli Deltamethrin grubu, 5. nesil dirençli Thiamethoxam grubu ve 5. nesil dirençli Deltamethrin+Thiamethoxam grubundan 4'er tekrarlı olmak üzere her tüpe 5'er adet birey konulmuştur.

Grup isimleri:

Kontrol grubu: K1, K2, K3, K4

Deltamethrin grubu: 5DR1, 5DR2, 5DR3, 5DR4

Thiamethoxam grubu: 5TR1, 5TR2, 5TR3, 5TR4

Deltamethrin+Thiamethoxam grubu: 5DTR1, 5DTR2, 5DTR3, 5DTR4

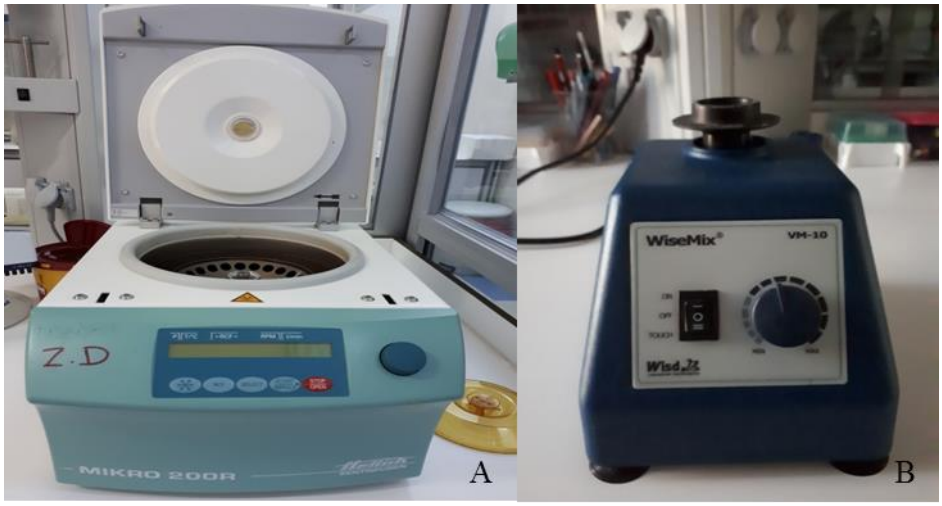


Şekil 3.8. Homojenizatör (A), İnkübatör Blok (B)

Tüplerin üzerine % 2'lik β- merkaptoetanollü liziz bufferdan 350 µl eklenmiş ve doku parçalama cihazında Şekil 22. (A) (Homogenizer-DAIHAN Scientific) 1500 rpm'de 5-10 sn süreyle parçalanmıştır. Dokular parçalandıktan sonra çalkalayıcı inkübatör blok Şekil 3.8 (B) (Bioer Mixing Block Mb-102) cihazında 24 ºC, 300 devir hızda çalkalanarak 3 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası RNA (Ribo nükleik asit) protokolüne göre homojenattan RNA izolasyonu işlemleri yapılmıştır.

3.6.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Purelink RNA Mini Kit (invitrogen) kiti ile kit protokolü takip edilerek yapılmıştır.



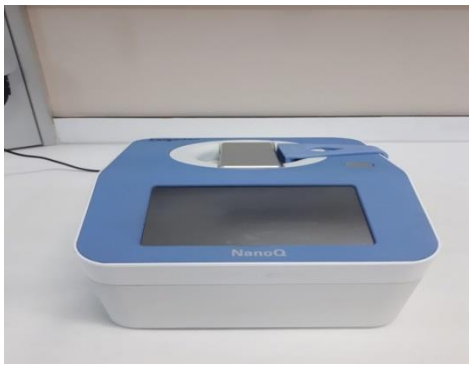
Şekil 3.9. Santrifüj cihazı (A) ve Vorteks (B)

1. Homojenat 12000×g'de 25 ºC sıcaklıkta 2 dk santrifüj (Şekil 3.9 (A)) edilmiştir.
2. Süpernatant (350 µl) 1.5 ml'lik ependorf tüpe alınarak üzerine 1:1 oranında %70'lik etanol konularak vorteks (Şekil 3.9 (B)) ile karıştırılmıştır.
3. Örneklerden 350 µl alınarak RNA izolasyon kiti içinde bulunan spin kolona aktarılarak 12000×g'de 15 sn santrifüj edilmiştir.
4. Örnekten kalan miktar için işlem tekrarlanmıştır.
5. Spin kolonda altta biriken sıvı dökülerek 700 µl wash buffer I eklenmiştir.
6. 12000×g'de 15 sn santrifüj edilerek altta biriken sıvı dökülmüştür.
7. 500 µl wash buffer II eklenerek aynı işlem 2 defa tekrarlanmıştır.
8. 12000×g'de 15 sn santrifüj edilerek altta biriken sıvı dökülmüştür.
9. 12000×g'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
10. Alttaki tüp atılarak spin kolon 1.5 ml'lik eppendof tüpe alınmıştır.
11. 50 µl RNase- DNase free su membranın ortasına konularak 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

12000×g'de 25 ºC sıcaklıkta 2 dk santrifüj edildikten sonra RNA'lar yeni 1.5 ml'lik ependorf tüpte birikmiştir.

3.6.3. RNA Miktarının Belirlenmesi ve cDNA Eldesi

RNA izolasyonu sonrasında örneklerdeki RNA miktar ve saflıklarının belirlenmesinde Nanodrop cihazı (Nano Optizen Q, Kore) (Şekil 3.10) kullanılmıştır. RNA'dan 2 µl alınarak her örnek için RNA miktar ve saflık tayini yapılmış ve Tablo 1'deki sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.10. Nanodrop Cihazı

Çizelge 3.1. RNA miktarları ve RNA saflıkları

GRUP	RNA MİKTARI	RNA A260/A280	GRUP	RNA MİKTARI	RNA A260/A280
1K1	271,9 ng/µl	2,33	**5K1**	54,6 ng/µl	2,08
1K2	188,5 ng/µl	2,37	**5K2**	177,6 ng/µl	2,27
1K3	271,2 ng/µl	2,05	**5K3**	203,6 ng/µl	2,34
1K4	314,4 ng/µl	2,37	**5K4**	170,4 ng/µl	2,29
1DR1	268,6 ng/µl	2,31	**5DR1**	226,1 ng/µl	2,37
1DR2	275,7 ng/µl	2,34	**5DR2**	296,7 ng/µl	2,34
1DR3	397,6 ng/µl	2,37	**5DR3**	298,6 ng/µl	2,35
1DR4	418,7 ng/µl	2,37	**5DR4**	220,8 ng/µl	2,33
1TR1	250,3 ng/µl	2,17	**5TR1**	77,8 ng/µl	2,39
1TR2	349,2 ng/µl	2,37	**5TR2**	166,4 ng/µl	2,35
1TR3	373,8 ng/µl	2,37	**5TR3**	128,2 ng/µl	2,35
1TR4	487 ng/µl	2,39	**5TR4**	90,6 ng/µl	2,3
1DTR1	341,5 ng/µl	2,52	**5DTR1**	59,7 ng/µl	2,36
1DTR2	408,9 ng/µl	2,32	**5DTR2**	219,6 ng/µl	2,32
1DTR3	381 ng/µl	2,36	**5DTR3**	226,6 ng/µl	2,34
1DTR4	337,3 ng/µl	2,37	**5DTR4**	81,5 ng/µl	2,35

RNA izolasyonu sonrası tüm RNA miktarları ölçülmüş ve RNA miktarları dH_2O (nükleaz free su)(İnvitrogen) ile eşitlenerek koplementer DNA (cDNA) sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi kit protokolü High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen) (Şekil 3.11) uygulanarak gerçekleştirilmiştir.



cDNA PCR MİX:	1 örnek için
10 x RT Buffer	2 µl
25 x dNTP Mix(100mM)	0,8 µl
10 x RT Random Primer	2 µl
Reverse Transkritaz	1 µl
dH_2O (Nükleaz free su)	4,2 µl

Şekil 3.11. cDNA mix protokolü

PCR striplerine ilk olarak sulandırılmaları yapılmış RNA'lardan 10 µl konulmuştur. RNA'ların üzerine kit prokolüne uygun olarak hazırlanmış cDNA mixinden 10 µl reaksiyon mixi eklenmiştir. Toplam reaksiyon miktarı 20 µl olacak şekilde Applied Biosystems- ProFlex marka Thermal döngü PCR cihazında (Şekil 3.12) 25 ºC de 10 dk; 37 ºC de 120 dk ve 85 ºC de 5 dk süreyle tutularak cDNA elde edilmiştir.



Şekil 3.12. Thermal döngü-PCR Cihazı

3.6.4. qRT-PCR (Gerçek zamanlı – Polimeraz Zincir Reaksiyonları)

ABC, P-450, GST, Apoptoz, Antioksidan genler ile Isı Şoku proteinleri (HSP) genlerinin gen ifadelerinin belirlenmesi için (Çizelge 3.2)'de verilmiş olan 18-24 bazlık toplam 22 adet primerin F ve R primerlerinden mix hazırlanmıştır.

Çalışmada kontrol ve dirençli gruplarda ABC yolağı ABC-B alt ailesi genleri MDR 49 (Multi Drug Resistance 49), MDR50 (Multi Drug Resistance 50), MDR65 (Multi Drug Resistance 65), ABC-C alt ailesi genleri MRP1 (Multidrug-Resistance like Protein 1 (dMRP)), SUR (Sulfonylurea Receptor), karakterize edilmemiş proteinlerden MET (Multidrug Efflux Transporter), P-450 yolağı CYP6A2 (Cytochrome P450-6a2), CYP12D1 (Cytochrome P450-12d1), CYP6G1 (Cytochrome P450-6g1), GST yolağı GSTD1 (Glutathione S transferase D1), GSTD5 (Glutathione S transferase D5), GSTE1 (Glutathione S transferase E1), Apoptoz yolağı BAX (BCL2 associated X, apoptosis regülatör), BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2), CAS3 (Cysteine-Aspartic Acid Protease 3), Antioksidan yolağı GS- (Glutathione Synthetase), CAT (Catalase), SOD (Superoxide dismutase 1 (Cu-Zn SOD)), SOD2 (Superoxide dismutase 2 (Mn-SOD)), HSP yolağı HSP27 (Heat shock protein 27), HSP60 (Heat shock protein 60), HSP70 (Heat shock protein 70) genlerinin ekspresyonu kontrol ve dirençli gruplarda qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Endojen kontrol geni olarak RP49 (Ribosomal protein L32) geni kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. qRT-PCR reaksiyonu için kullanılan primerler

Gen Ailesi	Gen Adı		Baz Dizisi
ABC (ATP Bağlayan Kaset) Taşıyıcı Protein Ailesi	MDR49	Forward	F- TCCCGCAGAGAATACGGGT
		Reverse	R- GAGCCATGCACAGGTAGATGA
	MDR50	Forward	F- AGAAGTCCAAGCATGACGAGT
		Reverse	R- CGCTCGATCCTTTTTGGTGG
	MDR65	Forward	F- AGAGCCTATTGCATTCCTGAAAC
		Reverse	R- GCAGCACATTATGAAGCCGAA
	MRP1	Forward	F- AATCGAAAGTATGGCGTGCAG
		Reverse	R- GGGGAATCGACAGCACAGT
	SUR	Forward	F- AGTGTCCTCCGTCATGTGGT
		Reverse	R- CGGATGAGAAACAGAAAAACG

	MET	Forward	F- CCTGCTGACAACTTTTACGG
		Reverse	R- GTAATCAAGGCGCAAGTTCC
Sitokrom P-450 Monooksijenaz Enzim Ailesi	CYP6A2	Forward	F-CCACACGATGCTCCTCACC
		Reverse	R- CGCTCTTCCGGTACTTGTTG
	CYP12D1	Forward	F- ATTTACGTGGGTCCCGTTC
		Reverse	R- GCGGAATCTCATCGTAGGTC
	CYP6G1	Forward	F- GGTTCCACAACCGATACGC
		Reverse	R- TCCCTGACGAAGAACAGGTTAT
GST Glutatyon-S transferaz Enzim Ailesi	GSTD1	Forward	F- TCCTGAACACCTTCCTGGAG
		Reverse	R- CTTGCTGATCTCGAATTTGG
	GSTD5	Forward	F- TATTACTCGCCCCGTGGAAG
		Reverse	R-TGGTGTGCTATGGATTGAGC
	GSTE1	Forward	F- GAGGACCGTCAAACTTACCC
		Reverse	R-GTACCGTGTGTTGGGGATTC
Apoptoz Yolağı Genleri	BAX	Forward	F- ATGGACGGGTCCGGGGAG
		Reverse	R- TCAGCCCATCTTCTTCCA
	BCL-2	Forward	F- ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA
		Reverse	R- ACAGTTCCACAAAGGCATCC
	CAS-3	Forward	F- GTGGAATTGATGCGTGATGT
		Reverse	R- ACAGGTCCATTTGTTCCAAAA
Antioksidan Genler	GS-	Forward	F- TGGGACCAGCAAGTAAAACC
		Reverse	R- TCGCGAATGTAGAACTCGTG
	CAT	Forward	F- TACGAGCAGGCCAAGAAGTT
		Reverse	R- ACCTTGTACGGGCAGTTCAC
	SOD	Forward	F- GTTCGGTGACAACACCAATG
		Reverse	R- GGAGTCGGTGATGTTGACCT
	SOD-2	Forward	F- TCTGAAGAAGGCCATCGAGT
		Reverse	R- GCAGATAGTAGGCGTGCTCC
HSP (Isı Şoku Proteinleri) Genleri	HSP 27	Forward	F- GCCCCGCAGCCCCATCTACGAG
		Reverse	R- GAGCACGCCATCCGACGACAGC
	HSP 60	Forward	F- GTCGCGCCCCGTTAGCAC
		Reverse	R- CATCGCGTCCCACCTTCTTCAT
	HSP 70	Forward	F- CGAGETCGACGCATTGTTTG
		Reverse	R- GAGTGGATCCGCCGACGAGTA
Endojen Kontrol Geni	Rp-49	Forward	F- GCTAAGCTGTCGCACAAATG
		Reverse	R- TGTGCACCAGGAACTTCTTG

384 kuyucuklu PCR plak kuyularına Primer mix ve SYBR® Select Master Mix (Life Technologies, ABD) SYBR mix reaksiyon bileşenlerinden eklenmiştir.

- Primer Mix: 8 µl dağıtılmıştır.
- SYBR Mix: 8 µl dağıtılmıştır.

SYBR Green PCR Master Mix: 220 µl

dH_2O (nükleaz free su): 50 µl

cDNA: 4 µl

Reaksiyon bileşenleri eklenen PCR plağı Şekil 3.13'deki QuantStudio- Applied Biosystems marka gerçek zamanlı PCR cihazına yüklenmiştir.



Şekil 3.13. Real Time PCR Cihazı

qRT-PCR döngüsü:

Enzimlerin tutunması ve Denatürasyon: 1 döngü 50 ºC 2 dk ve 95 ºC 10 dk

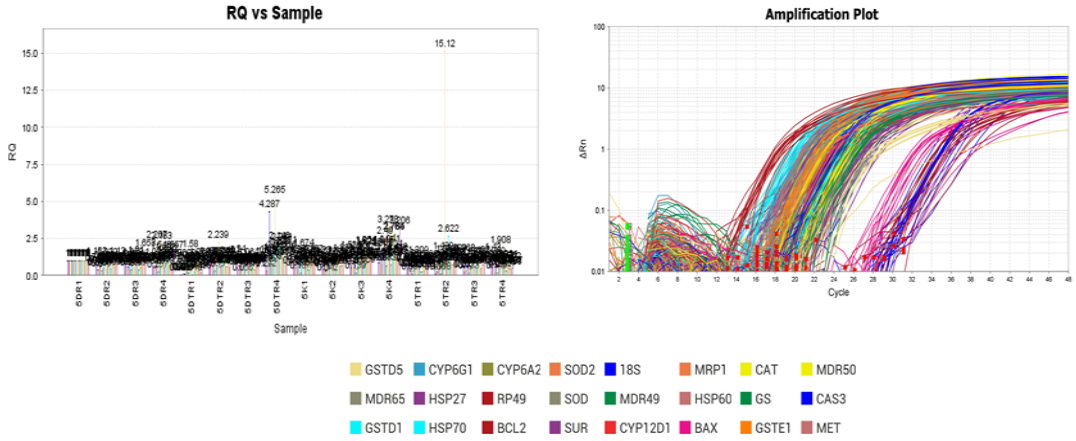
Denatürasyon: 95 ºC 10 sn

Annealing(Primer eşleşmesi):

Elongasyon(Primer uzaması): 60 ºC 1 dk

} x48 döngü

aşamaları ile DNA'lar çoğaltılmış ve (Şekil 3.14)'deki gibi bir amplifikasyon eğrisi elde edilmiştir.



Şekil 3.14. qRT-PCR 5. nesil örneklerin amplifikasyon görüntüsü

qRT-PCR sonucu elde edilen veriler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak RP49 endojen kontrole göre normalize edilip kontrol ile kıyaslanarak oransal ifade edilmiştir.

3.7. Morfolojik Analizler

3.7.1. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster*'lerde Yüzde Ağırlık Kaybı

Kontrol ve 5. nesil dirençli *Drosophila melanogaster* erginlerinden alınan örneklerin bir kısmı kuru olarak -80ºC'lik soğutucuda saklanmıştır. Kontrol grubu, 5. nesil dirençli Deltamethrin grubu, 5. nesil dirençli Thiamethoxam grubu ve 5. nesil dirençli Deltamethrin+Thiamethoxam gruplarından 10'ar adet dişi ve erkek bireylerin tartımları hassas terazide (UniBloc-AND) (Şekil 3.15) yapılmıştır.



Şekil 3.15. Hassas terazi

3.7.2. Kontrol, Duyarlı ve Dirençli bireylerin Stereo Mikroskop ile Görüntülenmeleri

Drosophila melanogaster Oregon R^+ ergin bireylerine Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit gruplarının sprey yöntemi ile uygulamaları yapılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra her gruptan duyarlı ve 5. nesil dirençli bireyler ağız aspiratörü ile besiyeri şişelerinden 15 ml'lik falkon tüplere alınmış ve morfolojik analizlerde kullanılmak üzere kuru olarak -80 ºC'deki derin dondurucuda saklanmıştır

İnsektisit uygulamaları yapılan duyarlı ve dirençli bireylerde insektisitlerin toksik etkilerinden kaynaklanan morfolojik değişiklikler;

Kontrol grubu,

5. nesil dirençli Deltamethrin grubu,

5. nesil dirençli Thiamethoxam grubu

5. nesil dirençli Deltamethrin+Thiamethoxam

5. nesil duyarlı Deltamethrin grubu

5. nesil duyarlı Thiamethoxam grubu

5. nesil duyarlı Deltamethrin+Thiamethoxam

gruplarında stereo mikroskop (OLYMPUS SZX7 -TH4–200) (Şekil 3.16) ile 20X büyütmede görüntülenmiştir.



Şekil 3.16. Stereo mikroskop

3.8. İstatistik Analizler

3.8.1. qRT-PCR Analizleri

Drosophila melanogaster ergin bireylerinin Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit gruplarına maruz bırakılması sonucunda kontrol genlerine kıyasla çoklu ilaç direnci genlerinin gen ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi amacıyla ΔΔCT metodu kullanılarak endojen kontrol geni olan RP49 genine göre veriler normalize edilmiştir. ΔΔCT metodundan elde edilen veriler SPSS20, Trakya üniversitesi lisanslı (IBM, ABD) İstatistik analiz programı kullanılarak analiz edilmiştir. Kontrol grubu ile dirençli grupların karşılaştırılması için Bağımsız örnek t-test testi yapılarak ortalamalarının girdiği gruplar ($P<0.05$) ile belirlenmiş ve grafiksel olarak ifade edilmiştir.

3.8.2. Yüzde Ağırlık Kaybı Analizleri

Drosophila melanogaster ergin bireylerinin kontrol grubu ile Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisitlerine 5 nesil boyunca maruz bırakılan dirençli grupların (10 dişi, 10 erkek) hassas terazide (Şekil 29) tartımları yapılmıştır. Kontrol grubu ile dirençli gruplar arasındaki yüzde ağırlık kaybının karşılaştırılabilmesi amacıyla tartım verileri SPSS20, Trakya üniversitesi lisanslı (IBM, ABD) İstatistik analiz programı ile bağımsız örnek t-test metodu kullanılarak verilerin girdiği gruplar ($P<0.05$) ile belirlenmiş ve grafiksel olarak ifade edilmiştir.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

4.1. Duyarlı Bireylerde İnsektisitlerin LD_{50} Dozlarının Belirlenmesi

Tez çalışmasında, daha önce yapılmış olan çalışmalarda böceklerde çoklu ilaç direncinin gelişmesine neden olduğu bilinen sentetik piretroidli Deltamethrin ve neonikotinoidli Thiamethoxam insektisitleri kullanılmıştır. İnsanlar ve zararlı böcek türleriyle gen homolojisine sahip olan ve genetik toksikoloji dahil olmak üzere pek çok alanda model organizma olarak kullanılan *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ırkı 1 günlük ergin meyve sinekleri Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam birleşiminden oluşan 3 farklı uygulama grubuna maruz bırakılmış ve 24 saat sonra örnekler alınmıştır. Yapılan denemede cam şişelerde materyal ve yöntem bölümünde belirtilen şekilde yetiştirilen *Drosophila melanogaster* erginlerine üreticilerin yüzey ilaçlama yöntemi için önerdikleri dozlar 6 farklı konsantrasyonda 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Her insektisit deneme grubunun sayım sonuçları ile probit analiz yapılarak duyarlı bireylerdeki LD_{50} dozları probit analiz ile hesaplanarak bulunmuştur.

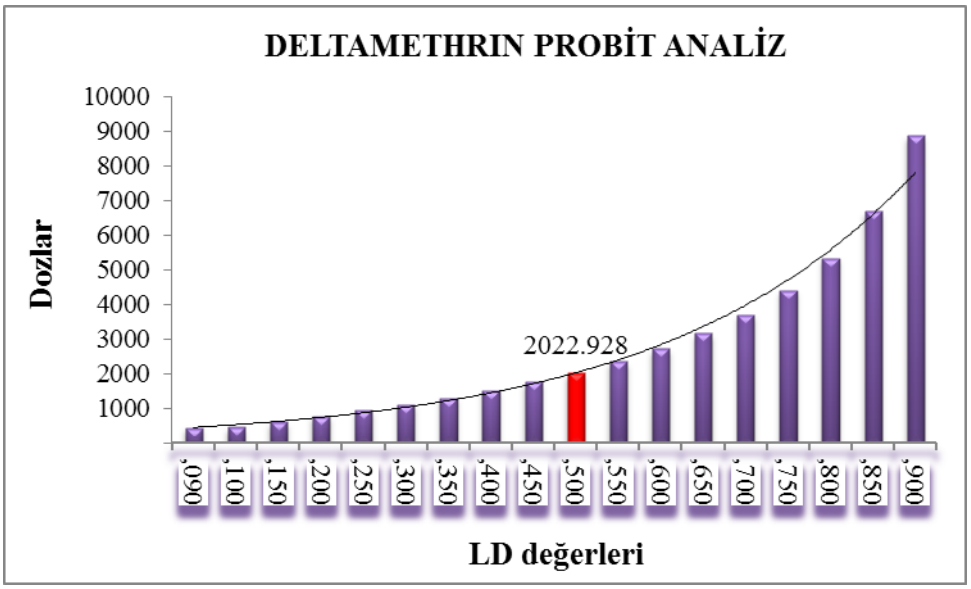
4.1.1. Deltamethrin

Çalışmada Deltamethrinin yüzey ilaçlama için önerilen 10000 ppm kullanım dozu 6 farklı seyreltme konsantrasyonunda hazırlanarak *Drosophila melanogaster* erginlerine uygulanmıştır. Uygulamada kullanılan dozlar ile 24 saat sonra yapılan sayımlar Çizelge

4.1'de, Probit analiz ile belirlenen LD_{50} dozunu gösteren grafik ise Şekil 31'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Deltamethrinin duyarlı bireylerde LD_{50} analizi için uygulama dozları ile ölü, canlı ve total birey sayıları

Deltamethrin	Ölü	Canlı	Total
10000 ppm	117	0	117
5000 ppm	27	19	46
2500 ppm	50	53	103
1250 ppm	31	68	99
625 ppm	23	67	90
313 ppm	3	71	74
0 ppm	0	84	84



Şekil 4.1. Deltamethrinin Probit analiz ile LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği.

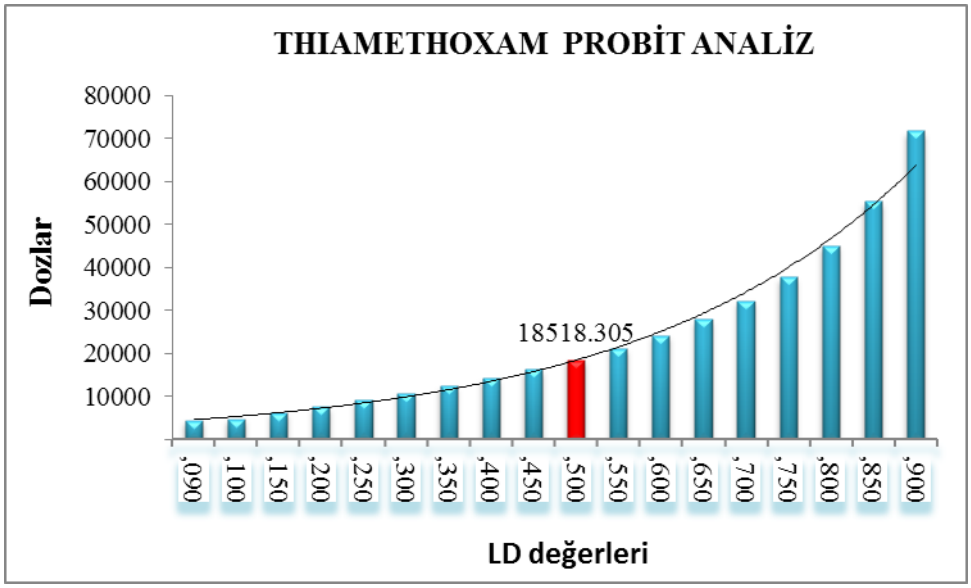
Drosophila melanogaster Oregon R^+ erginlerine 313-625-1250-2500-5000-10000 ppm dozlarında Deltamethrin uygulanmasından 24 saat sonra bireylerin yüzde canlılığına etkisini gösteren LD_{50} değeri Probit analizi yapılarak 2023 ppm olarak (x^2= 31.884, df= 4, min±max= 1026.954±4437.621, p<0.000) %95 güven aralığında bulunmuştur.

4.1.2. Thiamethoxam

Thiamethoxamın yüzey ilaçlama için önerilen 120000 ppm uygulama dozu 6 farklı seyreltme konsantrasyonunda hazırlanarak *Drosophila melanogaster* erginlerine uygulanmıştır. Uygulamada kullanılan dozlar ile 24 saat sonra yapılan sayımlar Çizelge 4.2'de, Probit analiz ile belirlenen LD_{50} dozunu gösteren grafik ise Şekil 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Thiamethoxam duyarlı bireylerde LD_{50} analizi için uygulama dozları ile ölü, canlı ve total birey sayıları

Thiamethoxam	Ölü	Canlı	Total
120000 ppm	117	0	117
60000 ppm	27	19	46
30000 ppm	50	53	103
15000 ppm	31	68	99
7500 ppm	23	67	90
3750 ppm	3	71	74
0 ppm	0	96	96



Şekil 4.2. Thiamethoxamın Probit analiz ile duyarlı bireylerde LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği

Drosophila melanogaster Oregon R^+ erginlerine 3750-7500-15000-30000-60000-120000 ppm dozlarında Deltamethrin uygulanmasından 24 saat sonra bireylerin yüzde canlılığına etkisini gösteren LD_{50} değeri Probit analizi yapılarak 18518 ppm olarak (x^2= 18.366, df= 4, min±max= 11266.524±29464.544, p<0.001) %95 güven aralığında bulunmuştur.

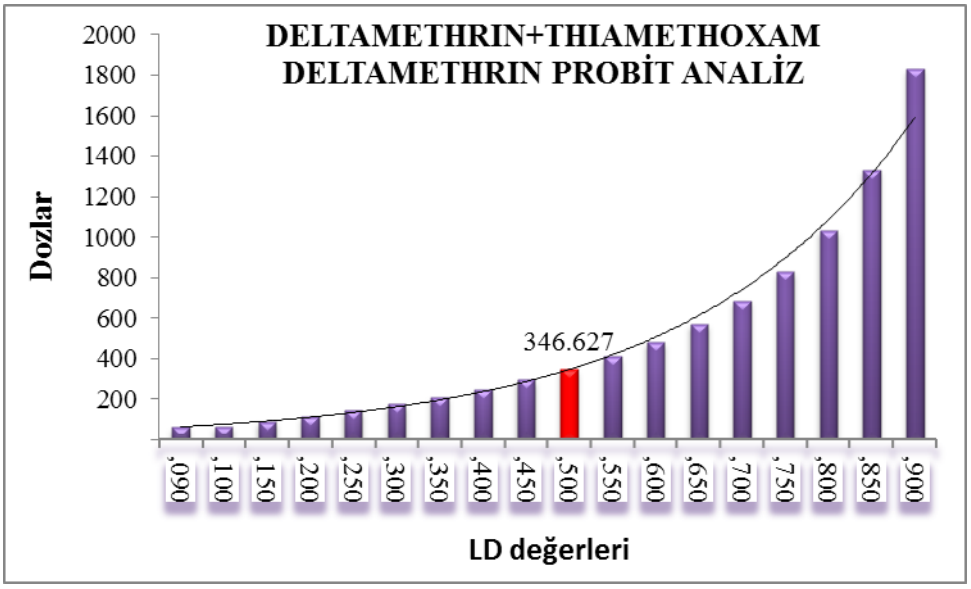
4.1.3. Deltamethrin+Thiamethoxam

Çalışmada Sıvı (SC) formülasyonundaki Deltamethrin ile suda çözünebilen granül (WG) formülasyonundaki Thiamethoxam insektisitleri ayrı ayrı hazırlanarak birleştirilmiş ve seri seyreltmeler yapılarak 6 farklı konsantrasyonda, 3 tekrarlı olarak, yüzey ilaçlama yöntemiyle uygulamalar yapılmıştır. Uygulamada kullanılan dozlar ile 24 saat sonra yapılan sayımlar Çizelge 4.3'te, LD_{50} dozlarını gösteren grafikler ise Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Deltamethrin+Thiamethoxamın duyarlı bireylerde LD_{50} analizi için uygulama dozları ile ölü, canlı ve total birey sayıları

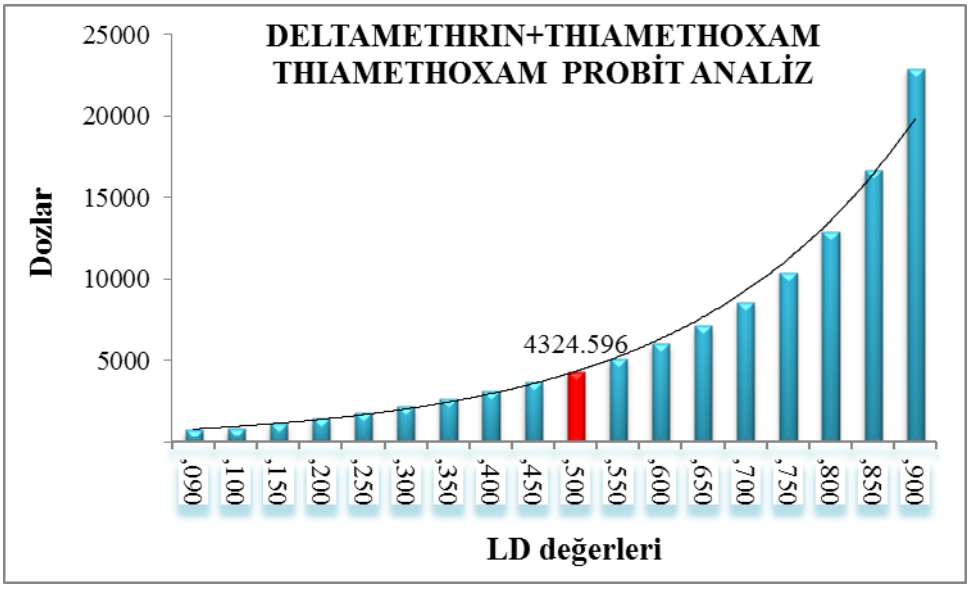
Deltamethrin	Thiamethoxam	Ölü	Canlı	Total
5000 ppm	60000 ppm	59	0	59
2500 ppm	30000 ppm	25	3	28
1250 ppm	15000 ppm	59	14	73
625 ppm	7500 ppm	44	20	64
313 ppm	3750 ppm	47	47	94
157 ppm	1875 ppm	11	35	46
0 ppm	0 ppm	0	92	92

4.1.3.1. Deltamethrin



Şekil 4.3. Deltamethrin+Thiamethoxam için Deltamethrinin Probit analiz ile duyarlı bireylerde LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği

4.1.3.2. Thiamethoxam



Şekil 4.4. Deltamethrin+Thiamethoxam için Thiamethoxamın Probit analiz ile duyarlı bireylerde LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği

Drosophila melanogaster erginlerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan Deltamethrin+Thiamethoxam birleşiminin sineklere sprey yöntemi ile uygulanmasından

24 saat sonra canlı ve ölü sayımları yapılmıştır. Canlı sayımları her konsantrasyon için kontrol grubu ile kıyaslanarak Probit analizi yapılmış ve Deltamethrin LD_{50} dozu 347 ppm, (x^2= 3.200, df= 4, min±max= 271.220±423.901, p<0.525) %95 güven aralığında belirlenmiştir. Thiamethoxam LD_{50} dozu 4325 ppm (x^2= 3.188, df= 4, min±max= 3382.520±5290.325, p<0.527) %95 güven aralığında belirlenmiştir.

4.2. Dirençli Bireylerde İnsektisitlerin LD_{50} Dozlarının Belirlenmesi

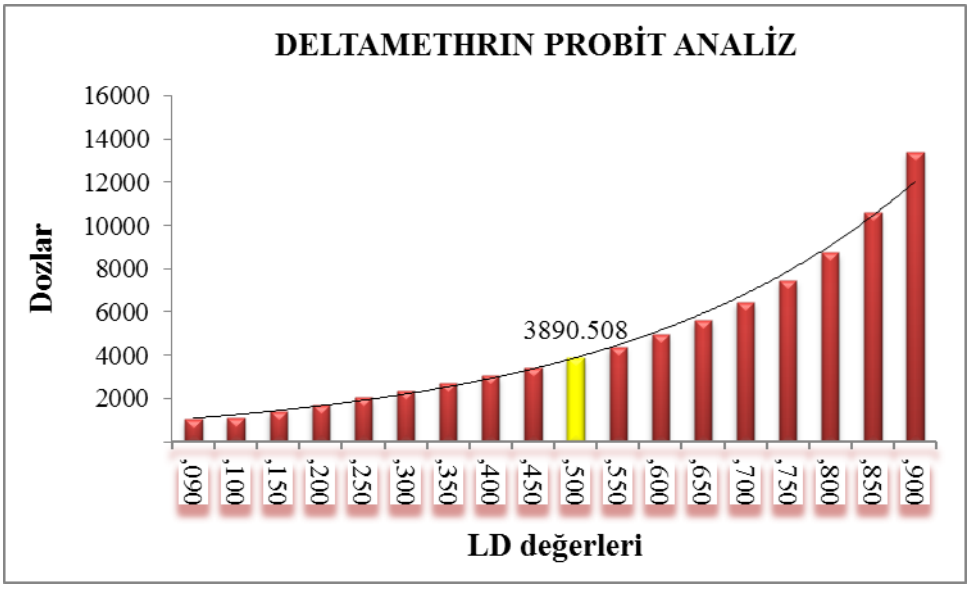
Duyarlı bireylerde bulunan LD_{50} dozlarına kıyasla 5 nesil süresince insektisit uygulama gruplarına maruz bırakılan dirençli *Drosophila melanogaster* bireylerindeki LD_{50} doz artışını tespit etmek amacıyla LD_{50} dozu ve katları şeklinde 5 farklı konsantrasyon ve 3 tekrarlı olmak üzere her uygulama grubu için 15 şişe kullanılmıştır. 24 saat sonra yapılan sayım sonuçları tablo olarak ve Probit analizi yapılan dirençli bireylerdeki LD_{50} dozu ise grafik olarak gösterilmiştir.

4.2.1. Deltamethrin

5. nesil Deltamethrin dirençli bireylere; 506 ppm, 1012 ppm 2023 ppm 4046 ppm 8092 ppm (1/4 LD_{50}, 1/2 LD_{50}, LD_{50}, 2x LD_{50}, 4x LD_{50}) konsantrasyonları uygulanmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra elde edilen sayım sonuçları Çizelge 4.4'de, Probit analiz ile belirlenen LD_{50} dozu ise grafik olarak Şekil 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Deltamethrin dirençli bireylerde LD_{50} analizi için uygulama dozları ile ölü, canlı ve total birey sayıları

Deltamethrin	Ölü	Canlı	Total
8092 ppm	164	46	210
4046 ppm	79	49	128
2023 ppm	35	167	202
1012 ppm	4	149	153
506 ppm	11	154	165
0 ppm	0	85	85



Şekil 4.5. Deltamethrinin Probit analiz ile dirençli bireylerde LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği

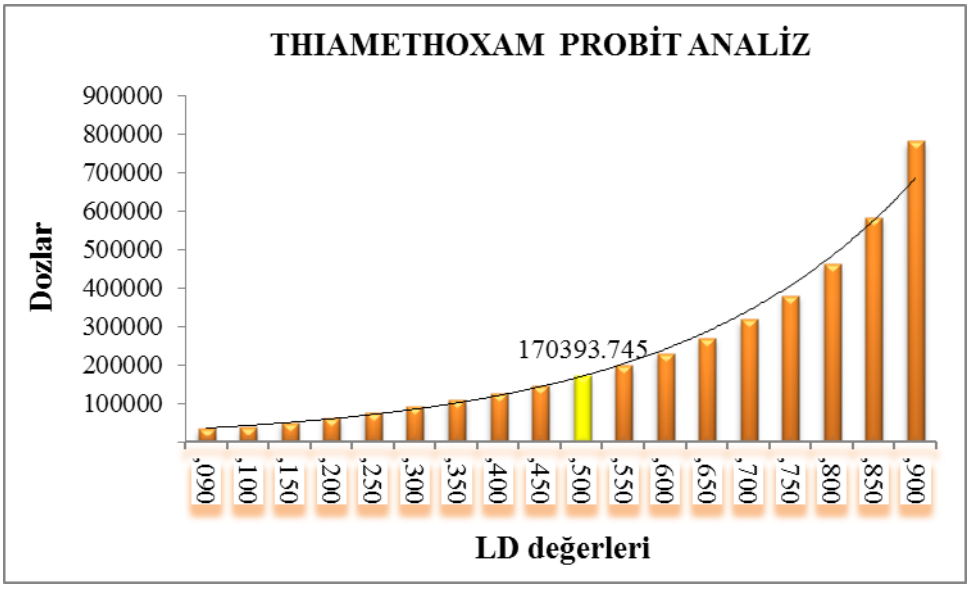
Belirlenen dozların *Drosophila melanogaster* erginlerine uygulanması sonucunda dirençli bireylerde LD_{50} dozu 3891 ppm olarak (x^2= 131.928, df= 13, min±max= 2733.852±6156.331, p<0.000) %95 güven aralığında belirlenmiştir.

4.2.2. Thiamethoxam

5. nesil Thiamethoxam dirençli bireyler; 4630 ppm, 9260 ppm 18518 ppm 37036 ppm 74072 ppm (1/4 LD_{50}, 1/2 LD_{50}, LD_{50}, 2x LD_{50}, 4x LD_{50}) konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra yapılan sayım sonuçları Çizelge 4.5'te, Probit analiz ile belirlenen LD-$_{50}$ dozu ise grafik olarak Şekil 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Thiamethoxam dirençli bireylerde LD_{50} analizi için uygulama dozları ile ölü, canlı ve total birey sayıları

Thiamethoxam	Ölü	Canlı	Total
74072 ppm	40	69	109
37036 ppm	1	133	134
18518 ppm	0	173	173
9259 ppm	3	216	219
4630 ppm	3	182	185
0 ppm	0	138	138



Şekil 4.6. Thiamethoxamın Probit analiz ile dirençli bireylerde LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği

Thiamethoxam dozlarının uygulanmasıyla yapılan canlı+ölü sayımlarının Probit analizleri sonucunda dirençli bireylerde LD_{50}: 170394 ppm olarak (x^2= 136.059, df= 13, min±max= 69439.676±20615.10, p<0.000) %95 güven aralığında belirlenmiştir.

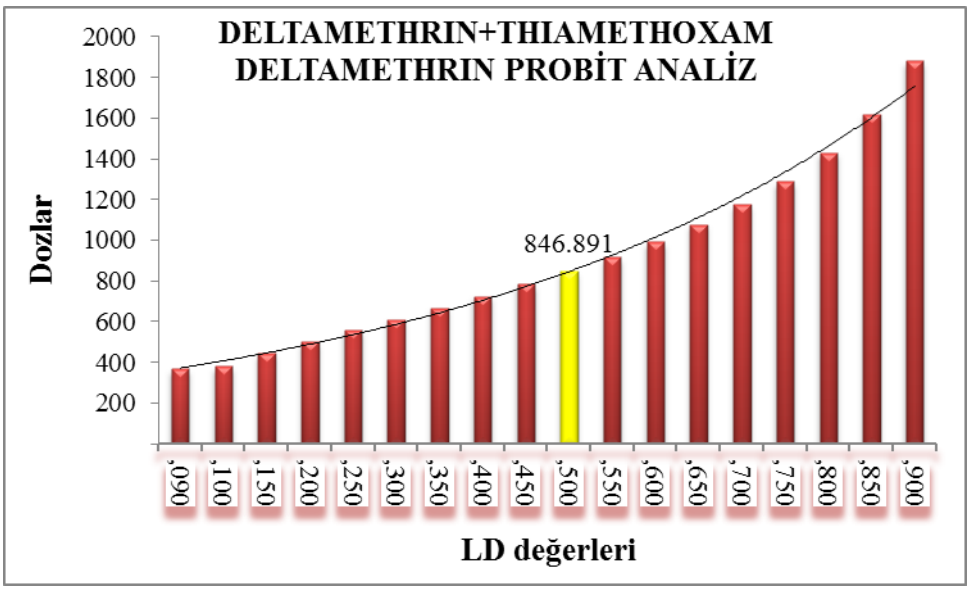
4.2.3. Deltamethrin+Thiamethoxam

Deltamethrin+Thiamethoxam uygulama grubundaki 5. nesil dirençli bireylere Deltamethrin; 87 ppm, 174 ppm 347 ppm 694 ppm 1388 ppm (1/4 LD_{50}, 1/2 LD_{50}, LD_{50}, 2x $LD_{50,}$ 4x LD_{50}) konsantrasyonları ile, Thiamethoxam; 1081 ppm, 2163 ppm 4325 ppm 8650 ppm 17300 ppm (1/4 LD_{50}, 1/2 LD_{50}, LD_{50}, 2x $LD_{50,}$ 4x LD_{50}) konsantrasyonları hazırlanıp birleştirilerek 1 günlük ergin sineklere uygulanmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra yapılan sayımlarda ölü, canlı ve total sayımlar yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.6'da, Probit analiz ile belirlenen LD_{50} dozları ise grafik olarak Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Deltamethrin+Thiamethoxam dirençli bireylerde LD_{50} analizi için uygulama dozları ile ölü, canlı ve total birey sayıları

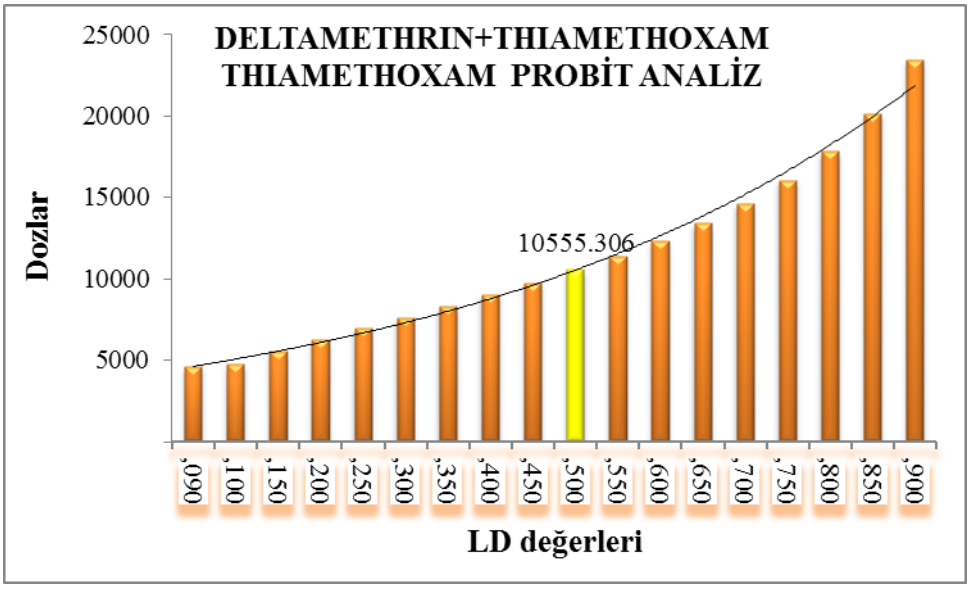
Deltamethrin	Thiamethoxam	Ölü	Canlı	Total
1388 ppm	17300 ppm	161	43	204
694 ppm	8650 ppm	81	142	223
347 ppm	4325 ppm	12	114	126
174 ppm	2163 ppm	0	115	115
87 ppm	1081 ppm	0	167	167
0 ppm	0 ppm	0	128	128

4.2.3.1. Deltamethrin



Şekil 4.7. Deltamethrin+Thiamethoxam için Deltamethrinin Probit analiz ile dirençli bireylerde LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği

4.2.3.2. Thiamethoxam



Şekil 4.8. Deltamethrin+Thiamethoxam için Thiamethoxamın Probit analiz ile dirençli bireylerde LD_{50} dozunun belirlenmesi grafiği

Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamalarından 24 saat sonra yapılan sayımlar probit analiz ile hesaplanarak dirençli bireylerde Deltamethrin LD_{50} dozu 847 ppm, (x^2= 4.821, df= 13, min±max= 787.545±913.206, p<0.979) %95 güven aralığında belirlenmiştir. Thiamethoxam LD_{50} dozu ise 10555 ppm olarak (x^2= 4.810, df= 13, min±max= 9815.430±11382.007, p<0.000) %95 güven aralığında belirlenmiştir.

Çalışmamızın LD_{50} dozu belirleme aşamasında duyarlı ve dirençli bireylerin insektisit uygulama gruplarına maruz bırakılması sonucunda elde edilen LD_{50} dozları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. İnsektisit uygulama gruplarının duyarlı ve dirençli bireylerdeki LD_{50} dozlarının değişimi

İnsektisit Uygulama Grupları	Duyarlı LD_{50}	Dirençli LD_{50}	Dirençli LD_{50} / Duyarlı LD_{50}
Deltamethrin	2023 ppm	3890 ppm	1.92 kat ↑
Thiamethoxam	18518 ppm	170394 ppm	9.2 kat ↑
Deltamethrin+Thiamethoxam	D= 347 ppm	D= 847 ppm	2.4 kat ↑
	T= 4325 ppm	T= 10555 ppm	2.4 kat ↑

4.3. Gen Ekspresyon Analizleri

Drosophila melanogaster Oregon R^+ 1 günlük meyve sineği erginlerine, bir önceki bölümde yapılan probit analizlerinde belirlenmiş olan Deltamethrin LD_{50}, Thiamethoxam LD_{50} ve Deltamethrin+Thiamethoxam LD_{50} dozlarının uygulamasından 24 saat sonra örnekler alınmıştır. Birinci nesil bireylere kıyasla istatistik olarak daha yüksek LD_{50} dozlarına dayanım gösteren bireylerde, oluşturulan bu direncin moleküler temelleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Bu kapsamda yapılan literatür çalışması ile artropodlar üzerinde, çoklu ilaç direnci gelişmesine neden olan P-450(Sitokrom P-450 monooksijenaz) ve GST(Glutatyon S-Transferaz) enzimleri ile ABC(ATP bağlayan kaset) proteinlerini içeren detoksifikasyon mekanizmaları ile Apoptoz, Antioksidan ve HSP(Isı Şok Proteini) yolağı genleri birlikte araştırılmıştır. Yapılan çalışmada *Drosophila melanogaster*'den Materyal ve Yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde cDNA kütüphanesi oluşturulmuş ve bu kütüphane yardımıyla bahsedilen mekanizmalardan sorumlu olan genlere ait mRNA ekspresyonları belirlenmiştir.

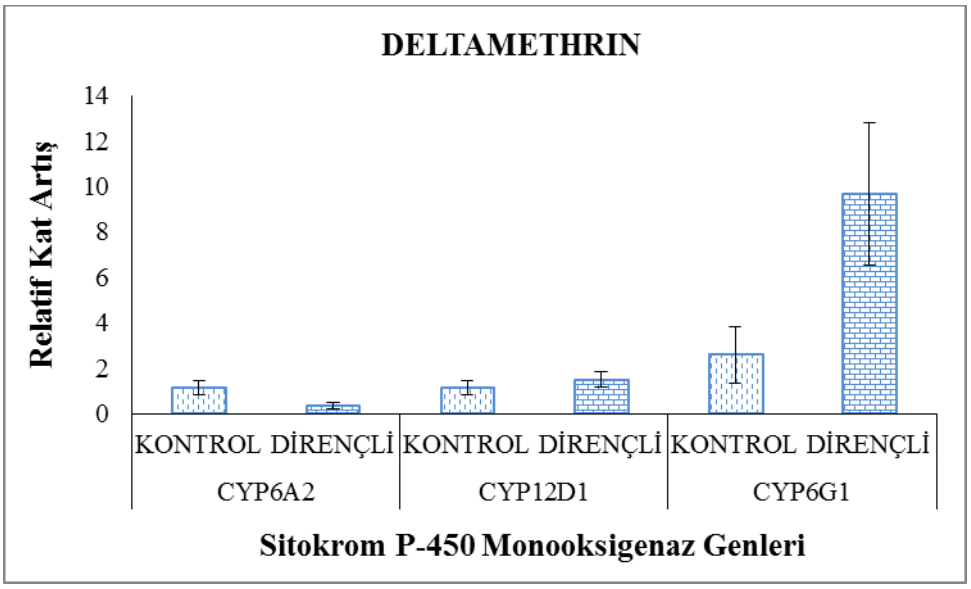
4.3.1. Sitokrom P-450 Monooksijenaz Enzim Ailesi Gen Ekspresyon Analizleri

Uygulama süresi sonunda 5 nesil boyunca Deltamethrin LD_{50}, Thiamethoxam LD_{50} ve Deltamethrin+Thiamethoxam LD_{50} dozlarına dayanım gösteren dirençli bireyler ile herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol bireylerinin RNA'ları kullanılarak qRT-PCR yapılmıştır. insektisit gruplarında faz I detoksifikasyon mekanizması P-450 genlerinden insektisit bileşiklerinin insektisidal etkisini detoksifiye eden ve birbirleriyle gen homolojisine sahip olan CYP6A2, CYP12D1 ve CYP6G1 genlerinin ekspresyonları Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

4.3.1.1. Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde P-450 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Yapılan çalışmada Deltamethrin uygulaması yapılan bireylerin P-450 gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik Şekil 4.9'da verilmiştir. Deltamethrin uygulama

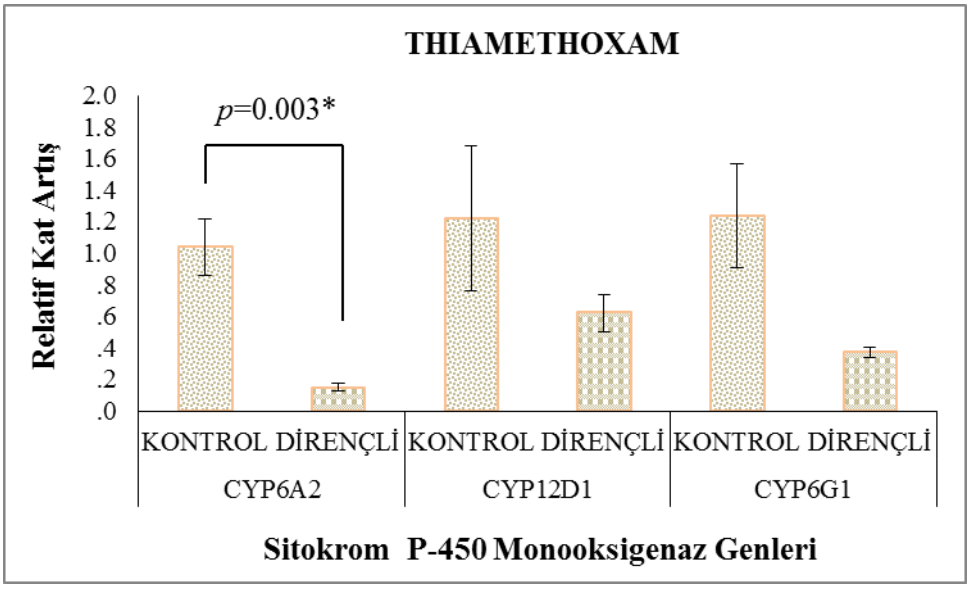
grubunda dirençli bireylerde kontrole kıyasla CYP6A2 3.7 kat, CYP12D1 1.2 kat ve CYP6G1 3.8 kat gen ekspresyonu artışı göstermesine rağmen kontrol ile Deltamethrin dirençli gruplar aynı istatistik grupta yer almıştır.(P_{CYP6A2}= 0.052, t= 2.417,df= 6; $P_{CYP12D1}$= 0.486, t= -0.742,df= 6; P_{CYP6G1}= 0.079, t= -2.111,df= 6)



Şekil 4.9. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra P-450 enzim ailesine ait CYP6A2, CYP12D1 ve CYP6G1 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05)

4.3.1.2. Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde P-450 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

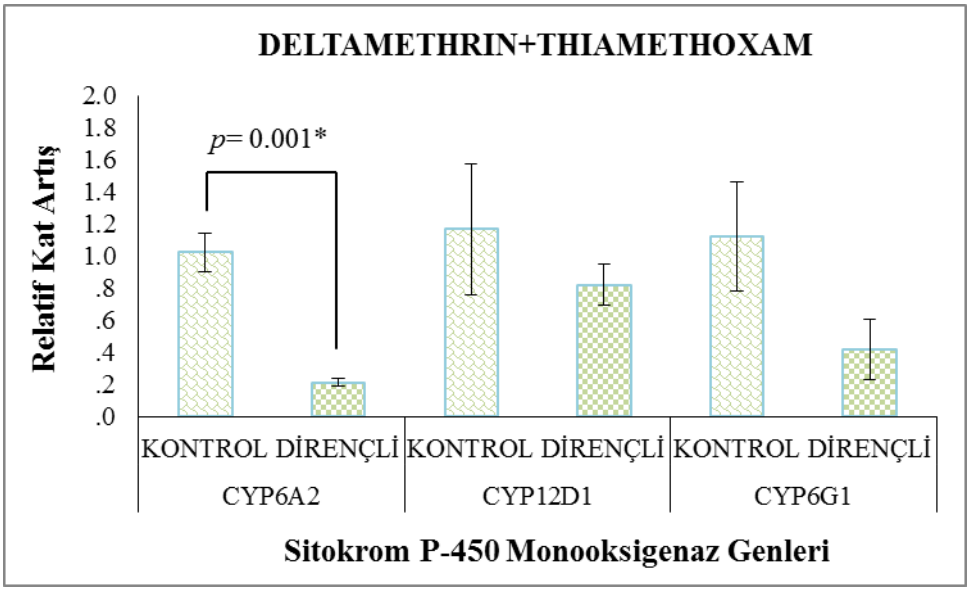
Çalışmada qRT-PCR ile Thiamethoxam grubunda belirlenen P-450 gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik Şekil 4.10'da verilmiştir. Thiamethoxam uygulama grubunda dirençli gruplarda kontrol grubuna kıyasla CYP6A2 10 kat, CYP12D1 ve CYP6G1 genlerinde 2 kat ve 3.3 kat gen ekspresyonu farklılığı oluşturmuştur. Yapılan analiz sonuçlarına göre, CYP6A2 geni istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark göstermiştir (P_{CYP6A2}= 0.003, t= 4.967, df= 6; $P_{CYP12D1}$= 0.253, t= 1.263, df= 6; P_{CYP6G1}= 0.078, t= 2.617, df= 3.060)



Şekil 4.10. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra P-450 enzim ailesine ait CYP6A2, CYP12D1 ve CYP6G1 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, $P<0.05$)

4.3.1.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde P-450 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Uygulamadan sonra yapılan qRT-PCR ile Deltamethrin+Thiamethoxam grubunda belirlenen P-450 gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik Şekil 4.11'de verilmiştir. Dirençli grupta kontrol grubuna kıyasla CYP6A2 4.9 kat CYP12D1 1.4 kat ve CYP6G1 2.7 kat fark bulunmuştur. Analiz sonuçlarına göre sadece CYP6A2 geninde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (P_{CYP6A2}= 0.001, t= 6.551, df= 6; $P_{CYP12D1}$= 0.446, t= 0.815, df= 6; P_{CYP6G1}= 0.121, t= 1.805, df= 6)



Şekil 4.11. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra P-450 enzim ailesine ait CYP6A2, CYP12D1 ve CYP6G1 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)

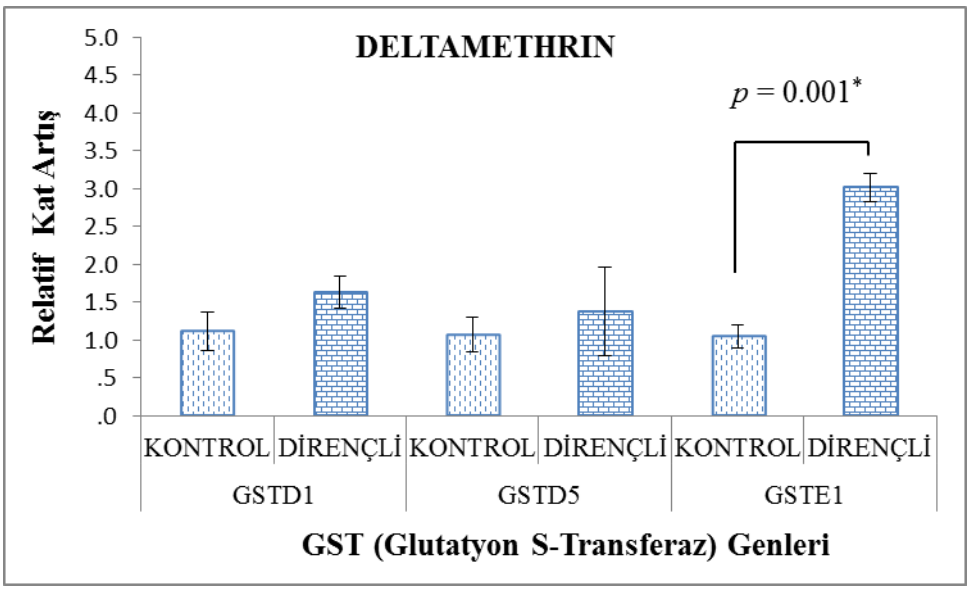
4.3.2. Glutatyon S-Transferaz (GST) Enzim Ailesi Gen Ekspresyon Analizleri

Çalışmada *Drosophila melanogaster* erginlerine 5 nesil boyunca Deltamethrin LD_{50}, Thiamethoxam LD_{50} ve Deltamethrin+Thiamethoxam LD_{50} dozlarına karşı dayanım gösteren dirençli bireyler ile herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol bireylerinin qRT-PCR analizleri sonucunda mRNA seviyelerindeki ekspresyon farklılık düzeyleri kullanılmıştır. İnsektisitlerin detoksifiye edilmelerinde rol alan faz II detoksifikasyon mekanizması Glutatyon S-Transferaz enzimlerinden GSTD1, GSTD5 ve GSTE1 genleri kullanılarak gen ekpreyon düzeylerinde oluşan farklılıklar Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de gösterilmiştir.

4.3.2.1. Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde GST Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Deltamethrin uygulamasının GST genlerindeki gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Deltamethrin dirençli bireylerde kontrol grubuna kıyasla GSTD1 1.5 kat, GSTD5 1.3 kat ve GSTE1

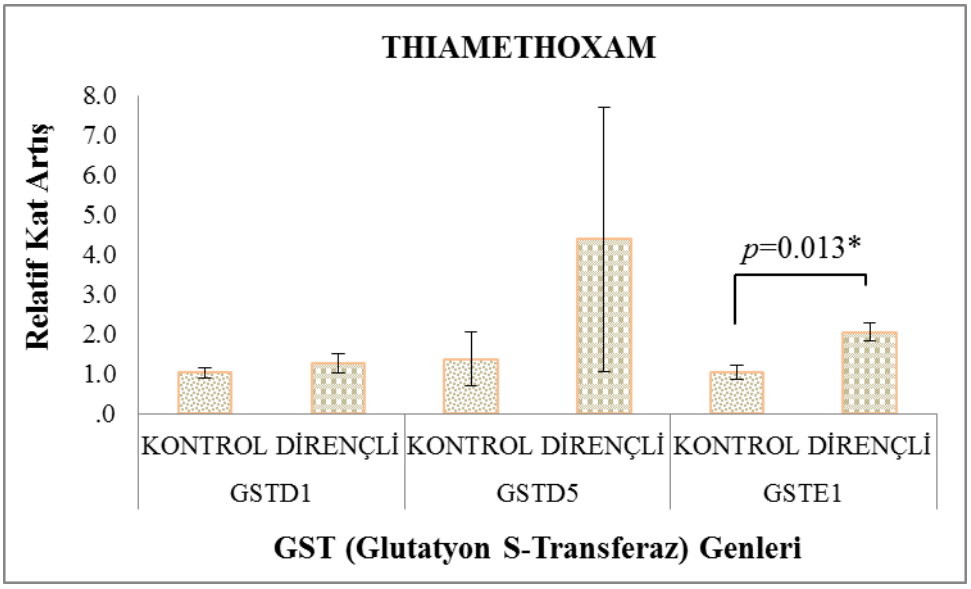
2.9 kat farklılık oluşturmuş Yapılan analiz sonucunda GSTE1 gen ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. (P_{GSTD1}= 0.167, t= -1.574, df= 6; P_{GSTD5}= 0.647, t= -0.482, df= 6; P_{GSTE1}= 0.000, t= -8.043, df= 6)



Şekil 4.12. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra GST enzim ailesine ait GSTD1, GSTD5 ve GSTE1 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)

4.3.2.2. Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde GST Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

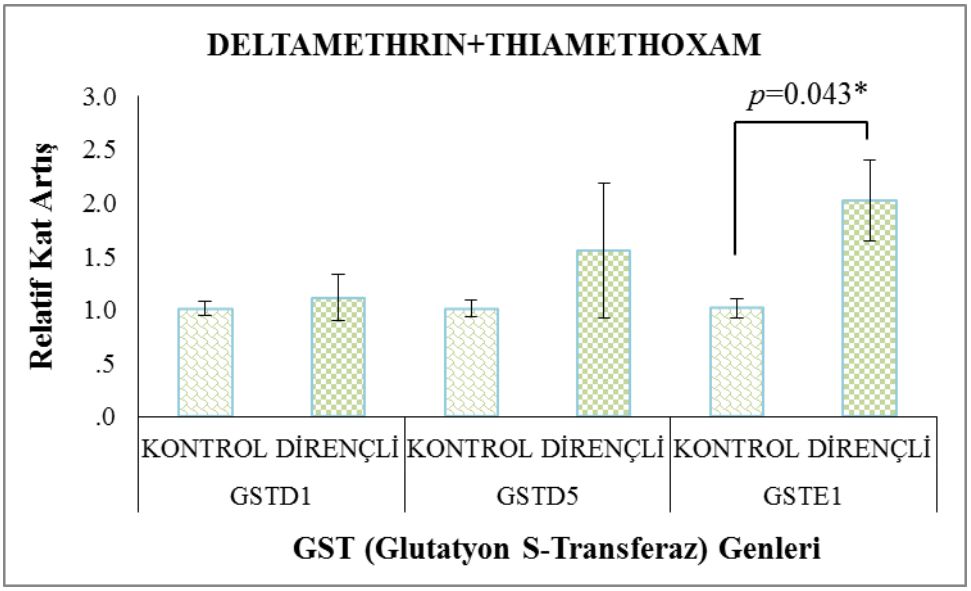
Thiamethoxam uygulamasının GST enzim ailesinde gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik Şekil 4.13'de verilmiştir. Thiamethoxam dirençli bireylerde kontrol bireylerine kıyasla GSTD1 1.2 kat, GSTD5 3.2 kat ve GSTE1 2 kat artış göstermiştir. Analiz sonucuna göre GSTE1 geninin ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmuştur (P_{GSTD1}= 0.435, t= -0.836, df= 6; P_{GSTD5}= 0.410, t= -0.885, df= 6; P_{GSTE1}= 0.013, t= -3.504, df= 6).



Şekil 4.13. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra GST enzim ailesine ait GSTD1, GSTD5 ve GSTE1 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)

4.3.2.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde GST Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Deltamethrin+Thiamethoxam uygulama grubunun GST enzim ailesine ait gen ekspresyonunu gösteren grafik Şekil 4.14'te verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Deltamethrin+Thiamethoxam dirençli grubunun gen ekspresyonları GSTD1 1.1 kat, GSTD5 1.5 kat ve GSTE1 2 kat artış göstermiştir. İstatistiksel olarak sadece dirençli ve kontrol bireylerin GSTE1 geni anlamlı bir fark oluşturmuştur (P_{GSTD1}= 0.669, t= -0.450, df= 6; P_{GSTD5}= 0.425, t= -0.806, df= 6; P_{GSTE1}= 0.043, t= -2.562, df= 6).



Şekil 4.14. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra GST enzim ailesine ait GSTD1, GSTD5 ve GSTE1 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, $P<0.05$)

4.3.3. ABC Taşıyıcı Protein Ailesi Gen Ekspresyon Analizleri

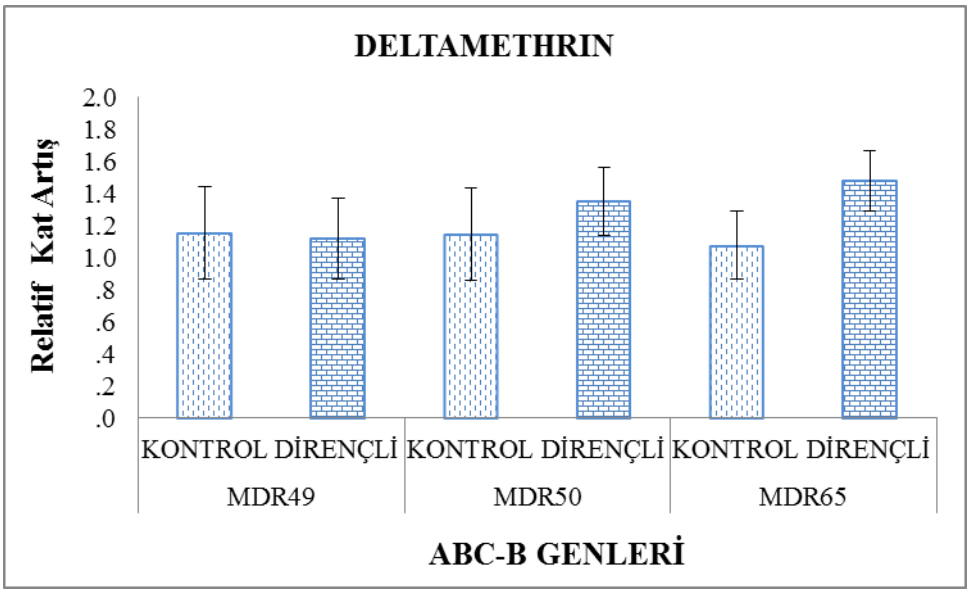
Yapılan çalışmada *Drosophila melanogaster* 1 günlük ergin bireylerine 5 nesil süresince Deltamethrin LD_{50}, Thiamethoxam LD_{50} ve Deltamethrin+Thiamethoxam LD_{50} dozlarına dayanım gösteren dirençli bireyler ile herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol bireylerinden materyal ve yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde cDNA kütüphanesi oluşturulmuş daha sonra qRT-PCR yapılarak analiz sonuçlarına göre mRNA seviyelerindeki ekspresyon farklılıkları kullanılmıştır. İnsektisitlerin detoksifiye edilmelerinde rol alan faz III detoksifikasyon mekanizmalarından ABC taşıyıcı protein ailesi gen ekspresyonu analizlerinde ABC-B alt ailesi (MDR49, MDR50 ve MDR65), ABC-C alt ailesi (MRP1(dMRP) ve SUR) ve karekterize edilmemiş proteinlerden çoklu ilaç aktif pompa sistemi (MET) (Multidrug Efflux Transporter) genleri kullanılarak gen ekspresyon düzeylerindeki farklılıklar karşılaştırılmıştır.

4.3.3.1. ABC-B Alt Ailesi Gen Ekspresyon Analizleri

Çalışmada ABC-B alt ailesi genlerinden MDR49, MDR50 ve MDR65 genlerinin Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit gruplarının uygulanması sonucu kontrol ve dirençli gruplarının gen ekpresyon düzeylerindeki değişimler qRT-PCR analizleri kullanılarak belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de verilmiştir.

4.3.3.1.1. Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde ABC-B Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

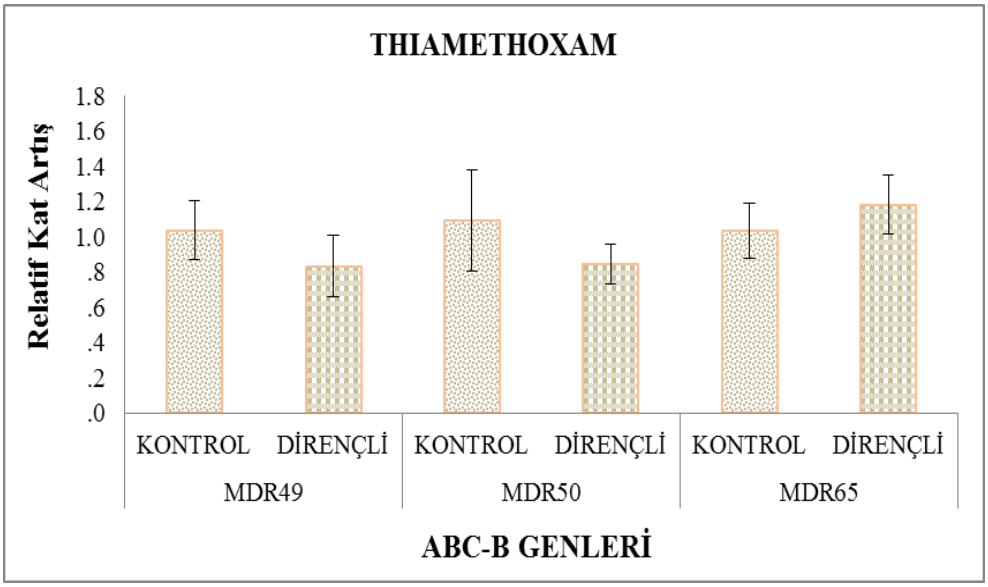
Deltamethrin dirençli bireylerinin kontrol grubuna kıyasla oluşan ABC-B alt ailesi genlerinin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.15'de verilmiştir. MDR49 1.1 kat, MDR50 1.2 kat ve MDR65 1.4 kat farklılık göstermiştir. İstatistiksel olarak MDR49, MDR50 ve MDR65 genleri kontrol ile aynı grupta yer alarak kontrole kıyasla anlamlı bir fark oluşturmamıştır (P_{MDR49}= 0.928, t= 0.094, df= 6; P_{MDR50}= 0.593; t= -0.564, df= 6; P_{MDR65}= 0.205 t= -1.421, df= 6).



Şekil 4.15. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra ABC-B enzim ailesine ait MDR49, MDR50 ve MDR65 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05)

4.3.3.1.2. Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde ABC-B Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Çalışmada yapılan qRT-PCR analizi ile Thiamethoxam grubunun ABC-B alt ailesi genlerinin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.16'da verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Deltamethrin dirençli grubunun gen ekspresyonları MDR49 1.2 kat, MDR50 1.3 kat ve MDR65 1.2 kat farklılık göstermiştir. İstatistiksel olarak MDR49, MDR50 ve MDR65 genleri kontrol ile aynı grupta yer alarak kontrole kıyasla anlamlı bir fark oluşturmamıştır (P_{MDR49}= 0.438, t= 0.830, df= 6; P_{MDR50}= 0.446, t= -0.815, df= 6; P_{MDR65}= 0.541, t= -0.649, df= 6).

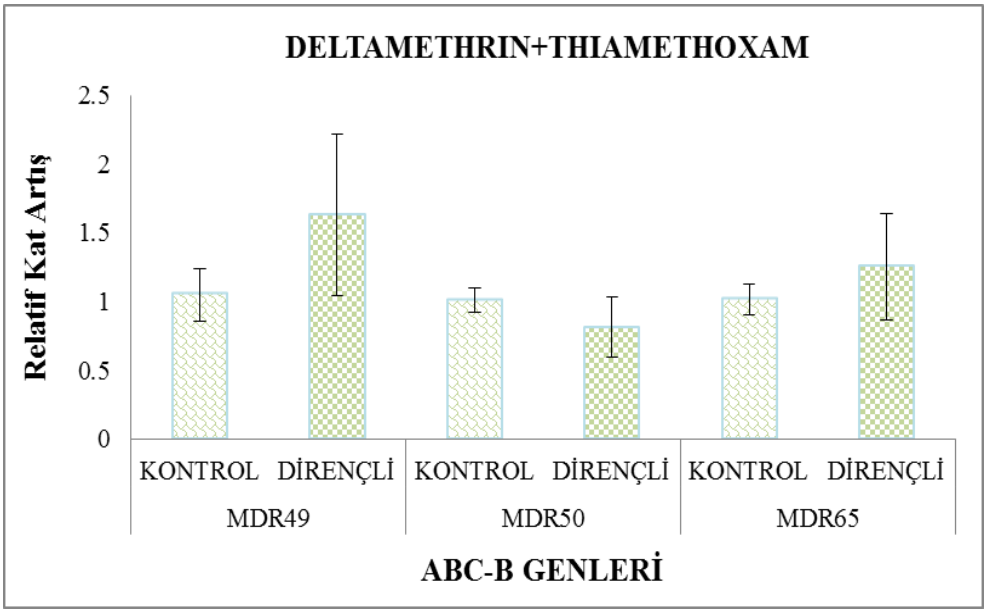


Şekil 4.16. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra ABC-B enzim ailesine ait MDR49, MDR50 ve MDR65 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05)

4.3.3.1.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde ABC-B Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamalarının ABC-B alt ailesi genlerinin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.17'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Deltamethrin+Thiamethoxam dirençli grubunun gen ekspresyonları MDR49 1.6 kat, MDR50 1.2 kat ve MDR65 1.2 kat farklılık göstermiş ancak ABC-B alt ailesi

genlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (P_{MDR49}= 0.382, t= -0.942, df= 6; P_{MDR50}= 0.435, t= 0.837, df= 6; P_{MDR65}= 0.580, t= -0.585, df= 6).



Şekil 4.17. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra ABC-B enzim ailesine ait MDR49, MDR50 ve MDR65 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05)

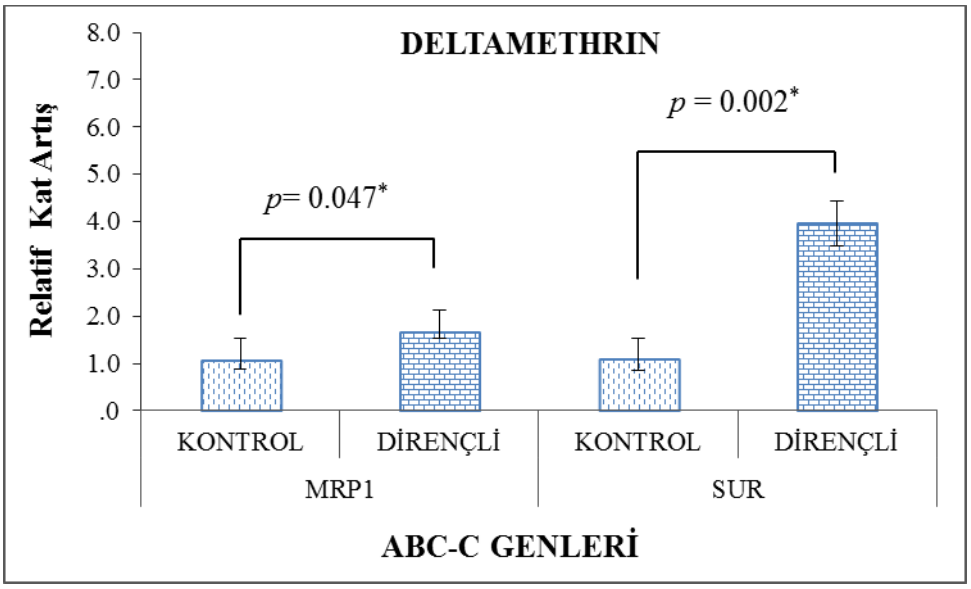
4.3.3.2 ABC-C Alt Ailesi Gen Ekspresyon Analizleri

Çalışmanın bu bölümünde ABC-C alt ailesi genlerinden MRP1 ve SUR genlerinin Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit gruplarının uygulanması sonucu kontrol ve dirençli grupların gen ekpresyon düzeyleri qRT-PCR analizleri kullanılarak belirlenmiş ve grafikler Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de gösterilmiştir.

4.3.3.2.1 Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde ABC-C Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Uygulamadan sonra yapılan qRT-PCR ile ABC-C alt ailesi genlerindeki ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.18'de verilmiştir. Kontrol grubuna

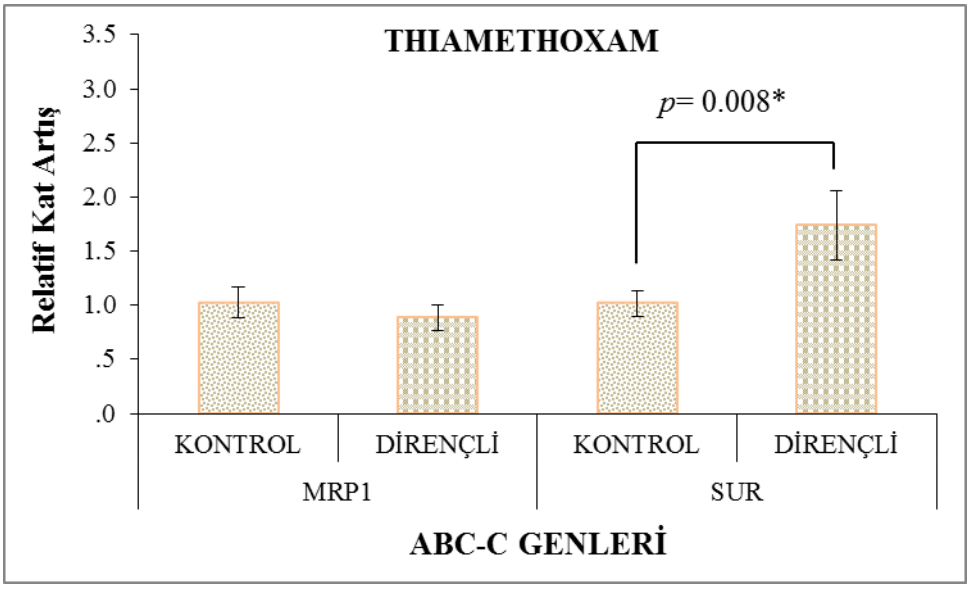
kıyasla Deltamethrin dirençli grubunun gen ekspresyonları MRP1 1.5 kat, ve SUR 3.7 kat farklılık göstermiştir. İstatistiksel olarak MRP1 ve SUR genlerinin ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık göstermiştir (P_{MRP1}= 0.047 t= -2.489, df= 6; P_{SUR} = 0.002 t= -5.487, df= 6).



Şekil 4.18. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra ABC-C protein ailesine ait MRP1 ve SUR gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)

4.3.3.2.2 Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde ABC-C Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

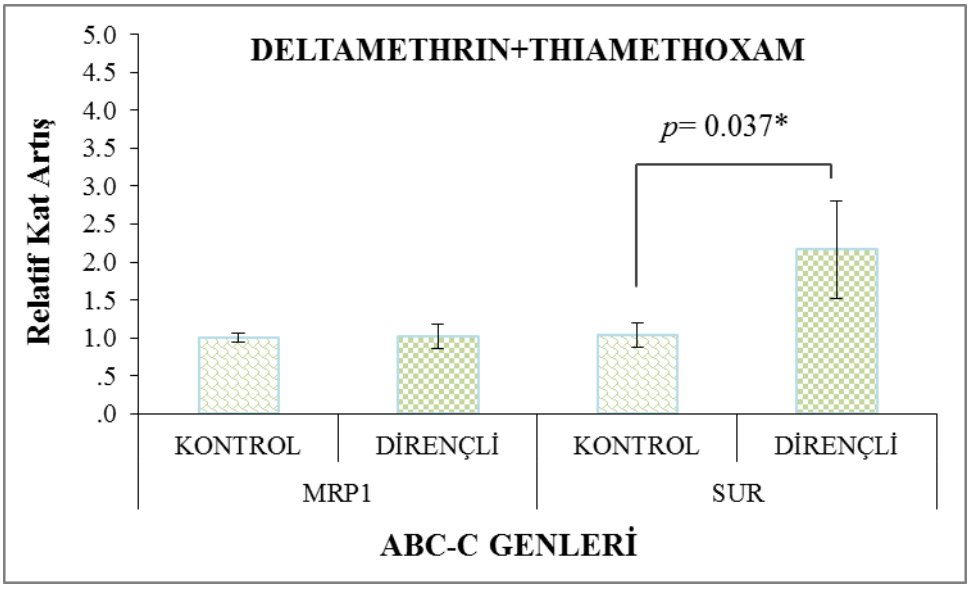
Çalışmada yapılan qRT-PCR ile ABC-C alt ailesi genlerinin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.19'da verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Thiamethoxam dirençli grubunun gen ekspresyonları MRP1 1.1 kat, ve SUR 2 kat farklılık göstermiştir. İstatistiksel olarak MRP1 geninde bir fark bulunmazken, SUR geninin ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık göstermiştir (P_{MRP1}= 0.676, t= 0.475, df= 5; P_{SUR} = 0.008, t= -1.664, df= 2.285).



Şekil 4.19. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra ABC-C protein ailesine ait MRP1 ve SUR gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)

4.3.3.2.3 Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde ABC-C Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Uygulamadan sonra yapılan qRT-PCR ile ABC-C alt ailesi genlerinin ekspresyon farklılıkları Şekil 4.20'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Deltamethrin+Thiamethoxam dirençli grubunun gen ekspresyonları MRP1 1 kat, ve SUR 2.5 kat farklılık göstermiştir. İstatistiksel olarak MRP1 geninde bir fark bulunmazken, SUR geninin ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık göstermiştir (P_{MRP1}= 0.985, t= 0.444, df= 5; P_{SUR} = 0.037, t= -4.279, df= 5).



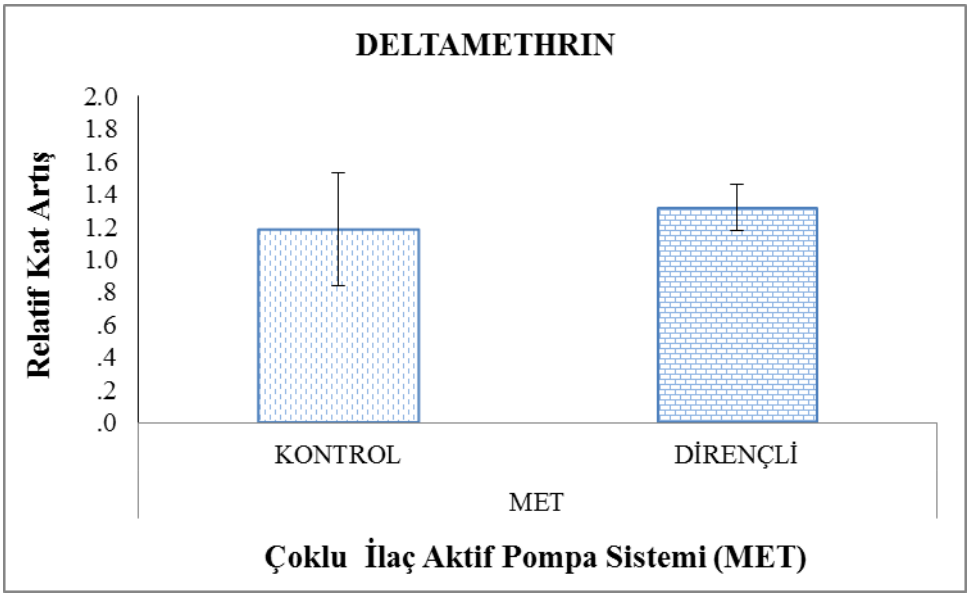
Şekil 4.20. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra ABC-C protein ailesine ait MRP1 ve SUR gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)

4.3.3.3 Çoklu İlaç Aktif Pompa Sistemi Gen Ekspresyon Düzeyleri

Çalışmanın bu bölümünde karakterize edilmemiş proteinlerden Çoklu İlaç Aktif Pompa Sistemi MET geninin Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit gruplarının uygulanması sonucu kontrol ve dirençli gruplarının gen ekpresyon düzeylerindeki faklıklar qRT-PCR analizleri kullanılarak yapılmış ve grafikler Şekil 4.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'te gösterilmiştir.

4.3.3.3.1 Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde MET Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

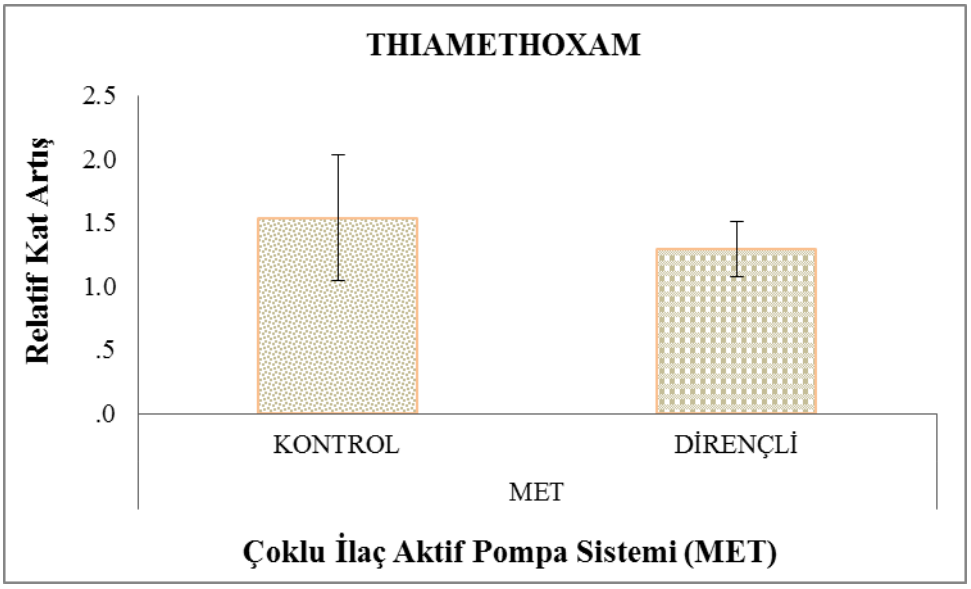
Çalışmada yapılan qRT-PCR ile MET geninin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.21'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Deltamethrin dirençli grubunun gen ekspresyonları MET geninde 1.1 kat farklılık göstermiş, ancak istatistiksel olarak konrol grubu ile aynı istatistik grup içinde yer almıştır (P_{MET} = 0.732, t= -0.358, df= 6).



Şekil 4.21. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulanmasından 24 saat sonra MET geninin ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, $P<0.05$)

4.3.3.3.2 Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde MET Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

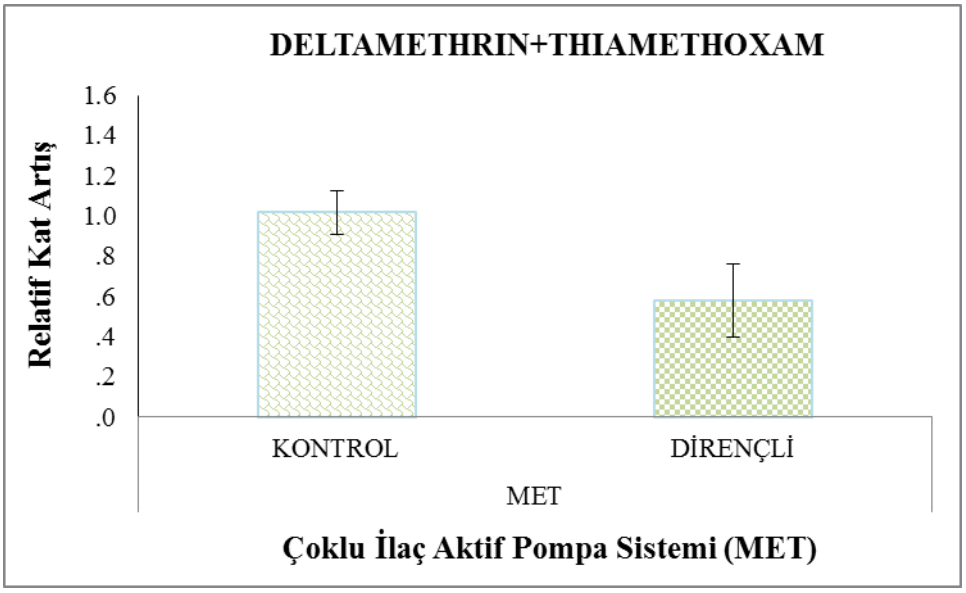
Uygulamadan sonra yapılan qRT-PCR ile MET geninin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.22'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Thiamethoxam dirençli grubunun gen ekspresyonları MET geninde 1.2 katlık artış göstermiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (P_{MET} = 0.661, t= 0.462, df= 6).



Şekil 4.22. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulanmasından 24 saat sonra MET geninin ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, $P<0.05$)

4.3.3.3.3 Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde MET Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Çalışmada yapılan qRT-PCR ile MET geninin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.23'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Deltamethrin+Thiamethoxam dirençli grubunun gen ekspresyonları MET geninde 1.8 kat düşüş göstermiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (P_{MET} = 0.082, t= 2.086, df= 6).



Şekil 4.23. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulanmasından 24 saat sonra MET geninin ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, $P<0.05$)

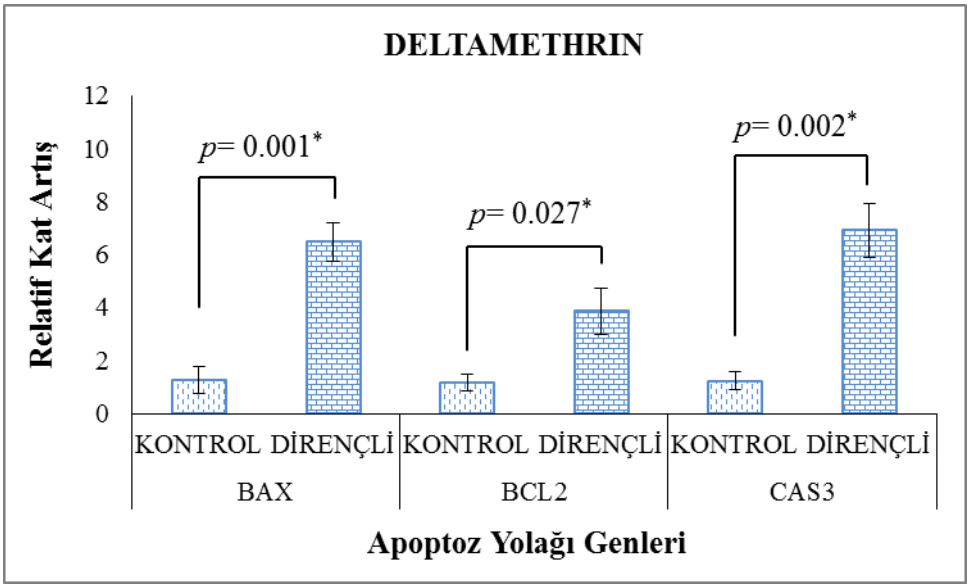
4.3.4. Apoptoz Yolağı Gen Ekspresyon Analizleri

Çalışmanın bu bölümünde insektisitlerin vücuda alınmalarının sonucunda hasar gören hücrelerin programlanmış hücre ölümüne götürülerek vücuttan atılmasını sağlayan Apoptoz yolağı BAX, BCL2 ve CAS3 genleri kullanılmıştır. Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit gruplarının uygulanmasından sonra kontrol ve dirençli grupların cDNA kütüphaneleri materyal ve yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde oluşturulmuş ve bu kütüphane yardımıyla Apoptoz yolağı genlerine ait mRNA ekspresyonları belirlenmiştir.

4.3.4.1. Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde Apoptoz Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Çalışmada yapılan qRT-PCR ile Apoptoz yolağı genlerine ait mRNA ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.24'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Deltamethrin dirençli grubun gen ekspresyonları BAX 5.2 kat, BCL2 3.4 kat ve CAS3 5.7 kat farklılık göstermiş ve istatistiksel olarak BAX, BCL2 ve CAS3 genleri önemli

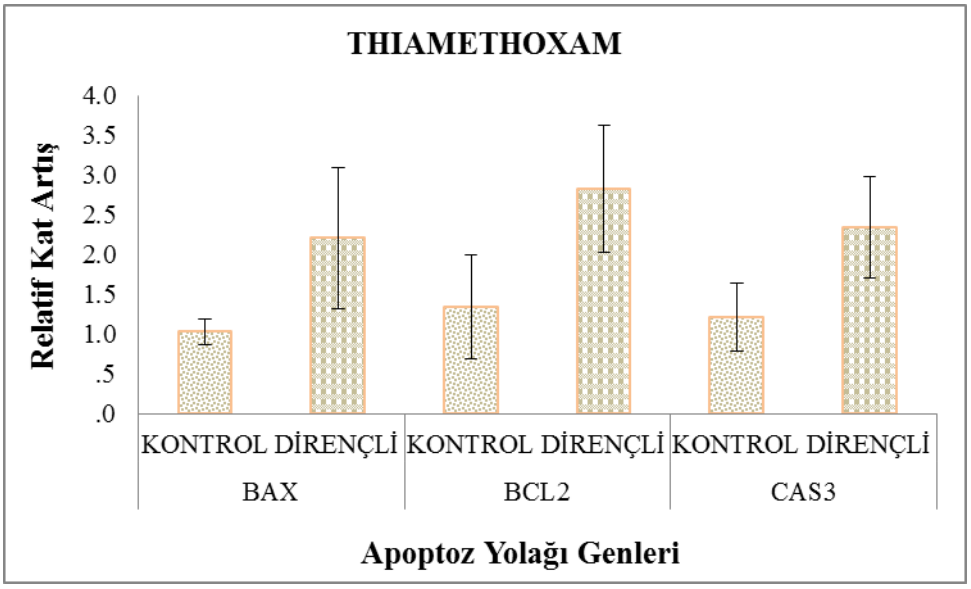
düzeyde bir fark oluşturmuştur (P_{BAX} = 0.001, t= -5.852, df= 6; P_{BCL2}= 0.027, t= -2.911, df= 6; P_{CAS3}= 0.002, t= -5261, df= 6).



Şekil 4.24. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra Apoptoz yolağına ait BAX, BCL2, ve CAS3 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)

4.3.4.2. Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde Apoptoz Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

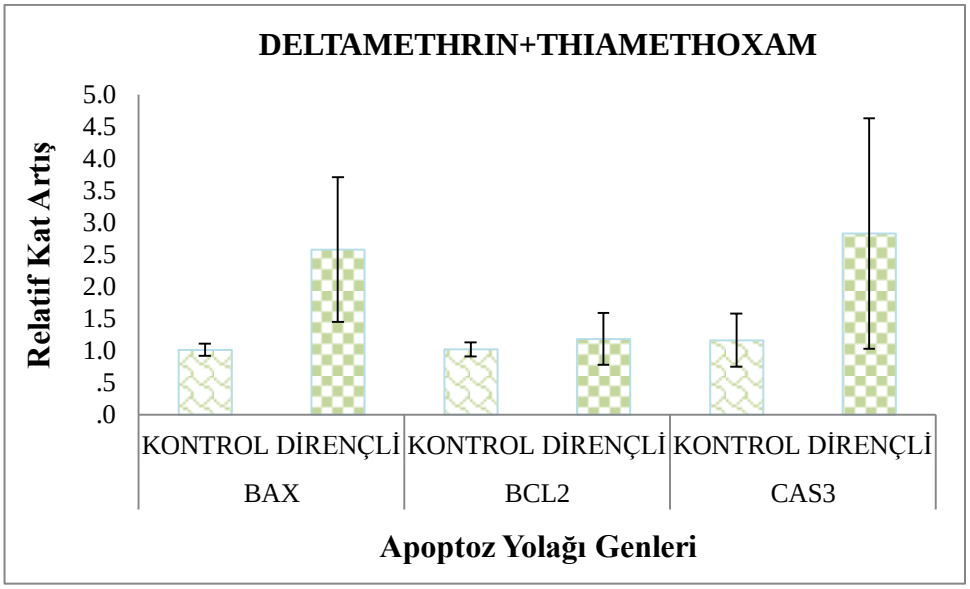
Thiamethoxam dirençli bireylerde Apoptoz yolağı genlerinin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.25'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Thiamethoxam dirençli grubun gen ekspresyonları BAX 2.1 kat, BCL2 2.1 kat ve CAS3 1.9 kat fark göstermiş ancak istatistik olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (P_{BAX} = 0.278, t= -1.306, df= 3.194; P_{BCL2}= 0.202, t= -1.434, df= 6; P_{CAS3}= 0.194, t= -1.464, df= 6).



Şekil 4.25. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra Apoptoz yolağına ait BAX, BCL2, ve CAS3 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, $P<0.05$)

4.3.4.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde Apoptoz Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Deltamethrin+Thiamethoxam dirençli bireylerde Apoptoz yolağı genlerinin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.26'da verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Deltamethrin+Thiamethoxam dirençli grubunun gen ekspresyonları BAX 2.6 kat, BCL2 1.2 kat ve CAS3 2.4 kat farklılık göstermiş ancak istatistik olarak dirençli grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (P_{BAX} = 0.260, t= -1.380, df= 3.044; P_{BCL2}= 0.707, t= -0.394, df= 6; P_{CAS3}= 0.401, t= -0.904, df= 6).



Şekil 4.26. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^{+} ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra Apoptoz yolağına ait BAX, BCL2, ve CAS3 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, $P<0.05$)

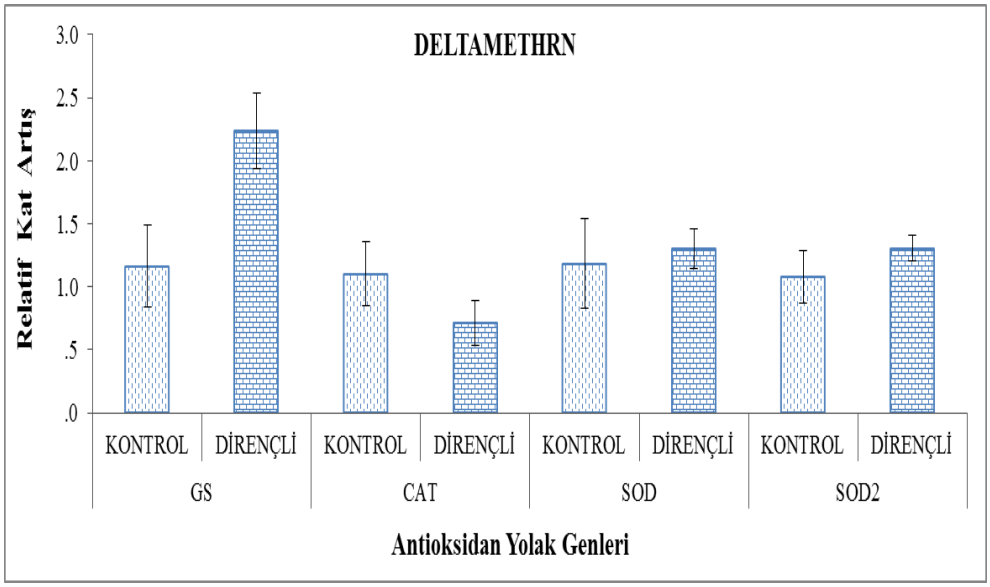
4.3.5. Antioksidan Yolak Genleri Ekspresyon Analizleri

Çalışmanın bu bölümünde insektisitlerin vücuda alınmalarının sonucunda oluşan serbest radikallerin meydana getirdiği hasarları ortadan kaldırmak üzere savunma görevi üstlenen Antioksidan yolak genleri GS, CAT, SOD ve SOD2 genlerinin Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit gruplarının uygulanması sonucu kontrol ve dirençli gruplarının gen ekpresyon düzeylerindeki faklılıklar qRT-PCR analizleri kullanılarak belirlenmiş ve grafik olarak Şekil 4.27, Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da gösterilmiştir.

4.3.5.1 Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde Antioksidan Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Çalışmada yapılan qRT-PCR ile antioksidan yolağı genlerinin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.27.'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Deltamethrin dirençli grubunun gen ekspresyonları GS 1.9 kat, CAT 1.5 kat, SOD 1.1 kat, SOD2 1.2 kat farklılık göstermiş ancak istatistik olarak dirençli grup ile kontrol

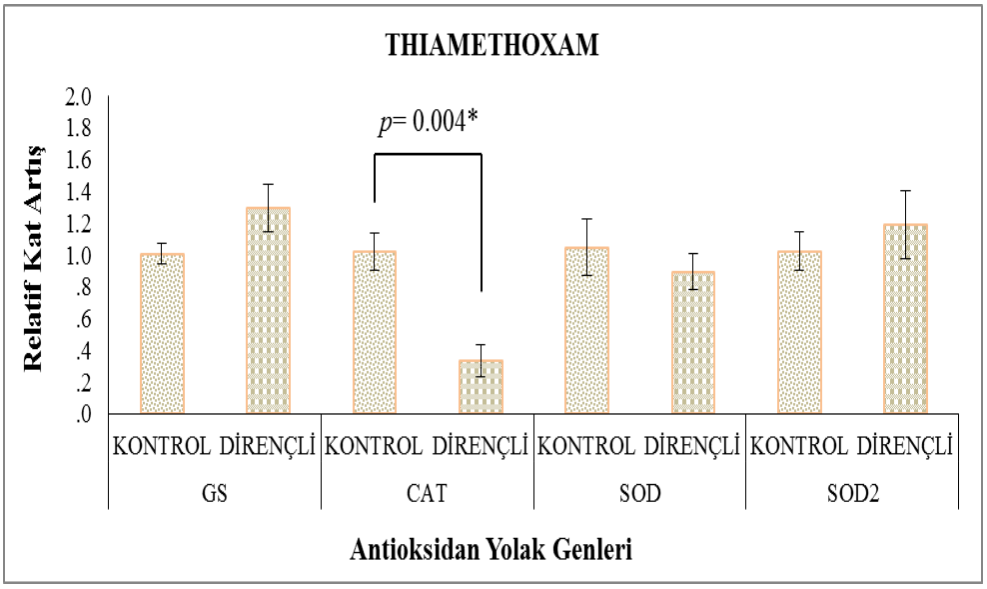
grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (P_{GS} = 0.051, t= -2.432, df= 6; P_{CAT} = 0.262, t= 1.239, df= 6; P_{SOD} = 0.771, t= -0.305, df= 6; P_{SOD2} = 0.356, t= -1.000, df= 6).



Şekil 4.27. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra Antioksidan yolağına ait GS, CAT, SOD ve SOD2 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata, (t-test, P<0.05)

4.3.5.2. Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli D. melanogaster Bireylerinde Antioksidan Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

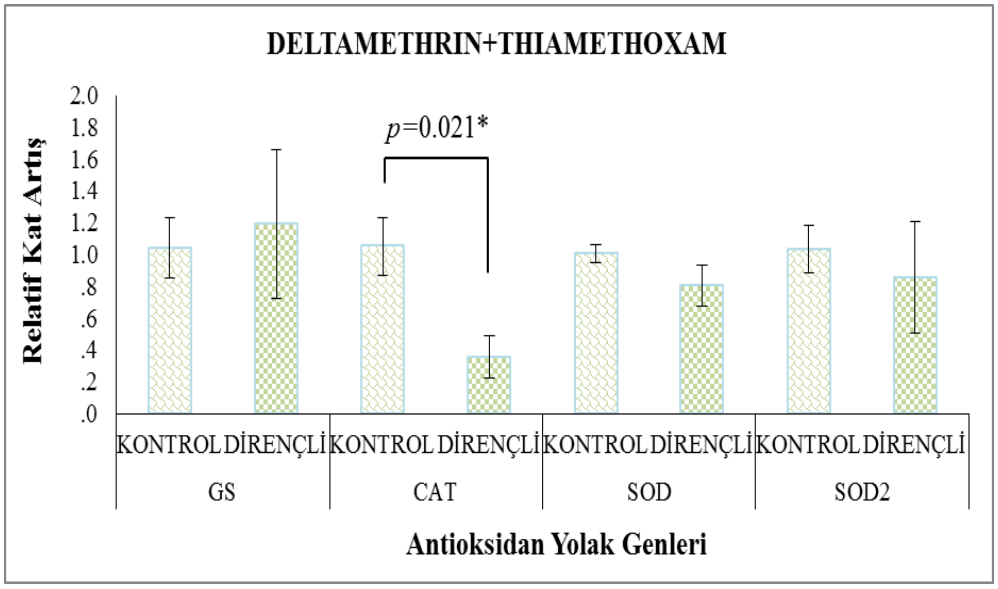
Çalışmada yapılan qRT-PCR ile antioksidan yolağı genlerinin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.28'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Thiamethoxam dirençli grubunun gen ekspresyonları GS 1.3 kat, CAT 3.1 kat, SOD 1.2 kat, SOD2 1.2 kat farklılık göstermiştir. İstatistik olarak CAT geninde anlamlı bir fark bulunurken GS, SOD ve SOD2 genlerinde dirençli grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (P_{GS} = 0.130, t= -1.755, df= 6; P_{CAT} = 0.004, t= 4.480, df= 6; P_{SOD} = 0.492, t= 0.732, df= 6; P_{SOD2} = 0.521, t= -0.682, df= 6).



Şekil 4.28. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^{+} ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra Antioksidan yolağına ait GS, CAT, SOD ve SOD2 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, Ortalama±standart hata *ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)

4.3.5.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde Antioksidan Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Çalışmada yapılan qRT-PCR ile Antioksidan yolağı genlerinin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.29'da verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Deltamethrin+Thiamethoxam dirençli grubunun gen ekspresyonları GS 1.1 kat, CAT 3 kat, SOD 1.3 kat, SOD2 1.2 kat farklılık göstermiştir. İstatistik olarak CAT geninde anlamlı bir fark bulunurken GS, SOD ve SOD2 genlerinde dirençli grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (P_{GS} = 0.778, t= -0.295, df= 6; P_{CAT} = 0.021, t= 3.100, df= 6; P_{SOD} = 0.205, t= 1.423, df= 6; P_{SOD2} = 0.658, t= 0.465, df= 6).



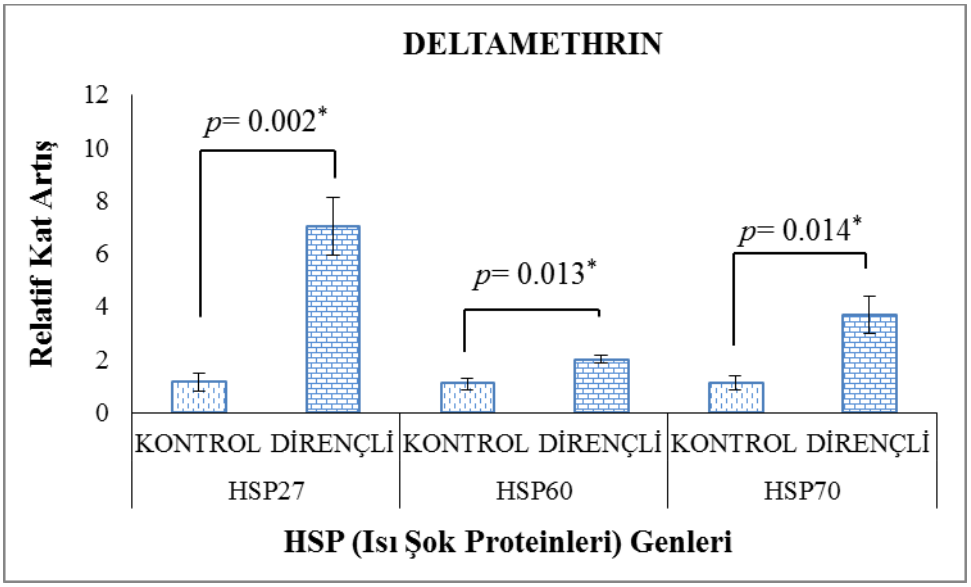
Şekil 4.29. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra Antioksidan yolağına ait GS, CAT, SOD ve SOD2 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, $P<0.05$)

4.3.6. HSP Genleri Ekspresyon Analizleri

Çalışmanın bu bölümünde insektisitlerin vücuda alınmalarının sonucunda hasarlı proteinlerin toplayıcıları olarak hareket eden HSP Isı Şok proteini ailesi HSP27, HSP60 ve HSP70 genleri kullanılmıştır. Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit gruplarının uygulanmasından sonra kontrol ve dirençli grupların cDNA kütüphaneleri materyal ve yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde oluşturulmuş ve bu kütüphane yardımıyla HSP yolağı genlerine ait mRNA ekspresyonları belirlenmiştir.

4.3.6.1 Deltamethrin Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde HSP Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

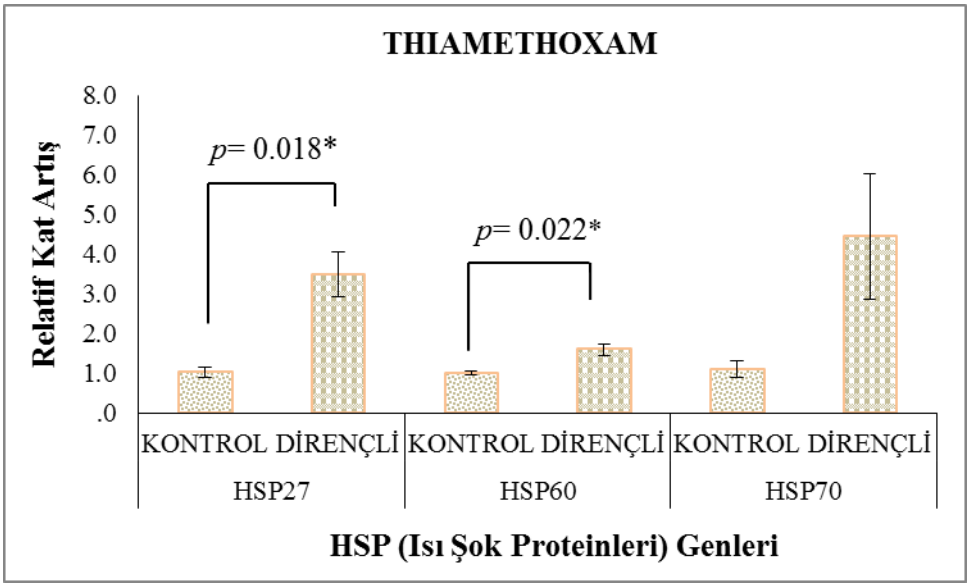
Çalışmada yapılan qRT-PCR ile HSP Isı Şok Proteini genlerinin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.30'da verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Deltamethrin dirençli grubunun gen ekspresyonları HSP27 6.1 kat, HSP60 1.9 kat, HSP70 3.3 kat farklılık göstermiş ve istatistik olarak HSP genlerinde dirençli grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (P_{HSP27} = 0.002, t= -5.082, df= 6; P_{HSP60} = 0.013, t= -3.474, df= 6; P_{HSP70} = 0.014, t= -3.402, df= 6).



Şekil 4.30. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulamasından 24 saat sonra HSP yolağına ait HSP27, HSP60 ve HSP70 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)

4.3.6.2 Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde HSP Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

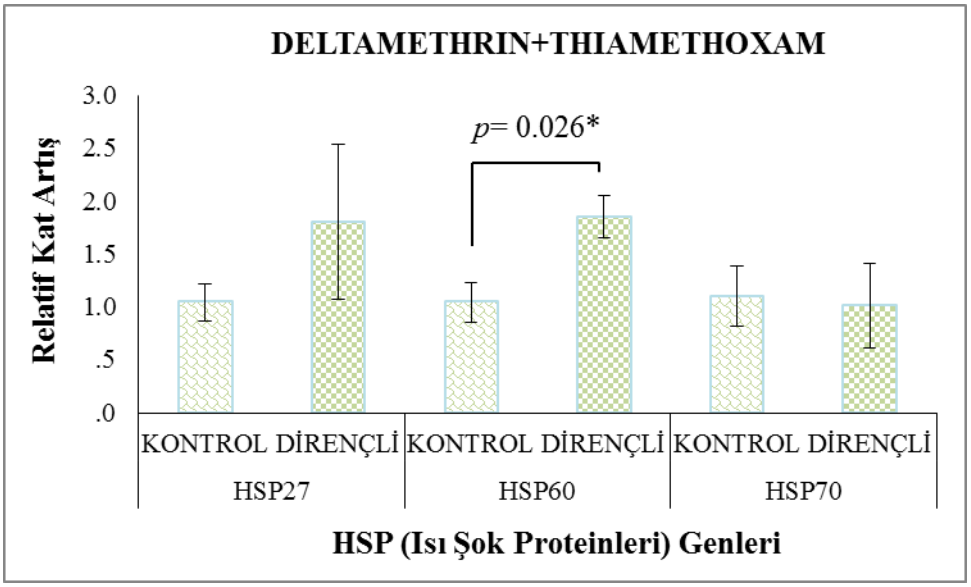
Çalışmada yapılan qRT-PCR ile HSP Isı Şok Proteini genlerinin ekspresyon farklılıklarını gösteren grafik Şekil 4.31'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Thiamethoxam dirençli grubunun gen ekspresyonları HSP27 3.4 kat, HSP60 1.6 kat, HSP70 4.1 kat farklılık göstermiştir. İstatistik olarak HSP70 geninde dirençli grup ile kontrol grubu arasında bir fark bulunmazken HSP27 ve HSP60 genleri önemli bir fark oluşturmuştur (P_{HSP27} = 0.018, t= -4.326, df= 3.329; P_{HSP60} = 0.022, t= -3.991, df= 3.430; P_{HSP70} = 0.082, t= -2.088, df= 6).



Şekil 4.31. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra HSP yolağına ait HSP27, HSP60 ve HSP70 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)

4.3.6.3. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinde HSP Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Çalışmada yapılan qRT-PCR ile HSP Isı Şok Proteini genlerinin ekspresyon farklılıkları Şekil 4.32'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Deltamethrin+Thiamethoxam dirençli grubunun gen ekspresyonları HSP27 1.7 kat, HSP60 1.8 kat, HSP70 1.1 kat farklılık göstermiştir. İstatistik olarak HSP60 geninde dirençli grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken HSP27 ile HSP70 genleri kontrol grubu ile aynı istatistik grup içinde yer almıştır (P_{HSP27} = 0.355, t= -1.002, df= 6; P_{HSP60} = 0.026, t= -2.929, df= 6; P_{HSP70} = 0.860, t= 0.184, df= 6).



Şekil 4.32. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulamasından 24 saat sonra HSP yolağına ait HSP27, HSP60 ve HSP70 gen ekspresyonları. Tüm veriler RP49 mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Veriler: n=4, ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, P<0.05)

4.4. Morfolojik Analizler

Çalışma kapsamında, *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerinden Bölüm 3.7.2'de anlatıldığı şekilde örnekler alınmıştır. Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit uygulama grupları *Drosophila melanogaster* ergin bireylerinde belirlenmiş olan LD_{50} dozlarında sprey yöntemi ile uygulanarak 24 saat sonra örnekler alınmıştır. 5. nesil dirençli bireylerde ve tek uygulama sonucunda ölen duyarlı bireylerde insektisitlerin genotoksik etkisinin model organizma olarak kullanılan sirke sineklerinin morfolojilerinde oluşturdukları etkiler incelenmek istenmiştir. Her gruptan dişi ve erkek bireyler stereo mikroskop ile 20X büyütmede görüntülenerek anormallikler gösterilmiştir. Görülen anormallikler sırasıyla; Kanat, bacak, toraks ve abdomen anormallikleridir.

Kanatlarda görülen anormallikler: Sağ ya da sol kanatta veya her iki kanatta birden gözlemlenen anormallikler kanat ucunun püskül biçimini ya da mızrak biçimini almış olması, kıvrık, ters V şeklinde ya da vücuda yapışık şekil almış olması biçimindedir.

Bacaklarda görülen anormallikler: Bacak segmentlerinde kütleşmeler, bacak yapısının normal yapısından farklılaşarak çengel yapı halini almış olması şeklinde gözlenmiştir.

Toraksta görülen anormallikler: Kanat anormallikleri ile birlikte görülmüştür. Kanatların üçüncü toraks segmentinde yer alması ve görülen anormalliklerin kanatlarda daha çok gözlenmiş olmasından dolayı kanat anormallikleri ile ilişkilendirilmiştir.

Abdomen anormallikleri: Abdomen segmentlerinin kaynaşarak özellikle dişi bireylerde abdomen ucunun siyahlaşması şeklinde belirtiler oluşmasıdır.

4.4.1. Deltamethrin Uygulanmasının Deltamethrin 5. Nesil Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinin Morfolojileri Üzerine Etkisi



Şekil 4.33. Deltamethrin 5. nesil dirençli bireylerde ortaya çıkan morfolojik anormallikler

Deltamethrin dirençli bireylerin görüntüleri Şekil 4.33'te verilmiştir. (A, B ve F) şekillerindeki bireylerde anormallik gözlenmezken, (E)'de kanat ucunun kıvrılması, (C)'de sağ kanatta dönme, (D)'de kanadın toraksa yapışık durumda olması gibi kanat anormallikleri gözlenmiştir.

4.4.2. Deltamethrin Uygulanmasıın Duyarlı *Drosophila melanogaster* Bireylerinin Morfolojileri Üzerine Etkisi



Şekil 4.34. Deltamethrin uygulaması yapılan duyarlı bireylerde ortaya çıkan morfolojik anormallikler

Deltamethrin duyarlı bireylerin görüntüleri Şekil 4.34'de verilmiştir. Deltamethrinin toksik etkisinden kurtulamayan bireylerde kanatlarda ters V yapısı ve bacaklarda çengel yapı (A), sağ kanatta kıvrılma (B), sağ kanadın mızrak şeklini alması(C), kanat uçlarında kıvrılmalar (D ve E), her iki kanatta kıvrılma (F) şekillerinde anormallikler görülürken, tüm bireylerin abdomen yapılarında farklılaşma görülmüştür.

4.4.3. Thiamethoxam Uygulanmasının Thiamethoxam 5. Nesil Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinin Morfolojileri Üzerine Etkisi



Şekil 4.35. Thiamethoxam 5. nesil dirençli bireylerde ortaya çıkan morfolojik anormallikler

Çalışmada stereo mikroskop ile görüntülenen Thiamethoxam dirençli bireylerin görüntüleri Şekil 4.35'de verilmiştir. (A, B ve E) şekillerindeki bireylerin kanatlarının ters V şeklini alması, (C) şeklinde kanadın toraksa yapışık şekil alması ile toraks segmentinin belirginleşmesi, (D ve F) şekillerinde kanat ucunda kısmi katlanmalar gözlenmiştir.

4.4.4. Thiamethoxam Uygulanmasıın Duyarlı *Drosophila melanogaster* Bireylerinin Morfolojileri Üzerine Etkisi



Şekil 4.36. Thiamethoxam uygulaması yapılan duyarlı bireylerde ortaya çıkan morfolojik anormallikler

Yapılan çalışmada stereo mikroskop ile görüntülenen Thiamethoxam duyarlı bireylerin görüntüleri Şekil 4.36'da verilmiştir. (A ve F) şekillerindeki bireylerin sol kanadı mızrak şeklinde, sağ kanadı ise toraksa yapışık bir şekil almıştır. (B ve D)'deki bireylerin kanat yapılarında ters V şekli alırken, (C) şeklindeki bireyin her iki kanadı da yapışarak püskül görünümü almış ve ön bacaklarda kaynaşma olusurken (E), şeklindeki bireyde ise kanat yapısında kıvrılarak daralma ve ters dönme şeklinde bir görünüm oluşmuştur.

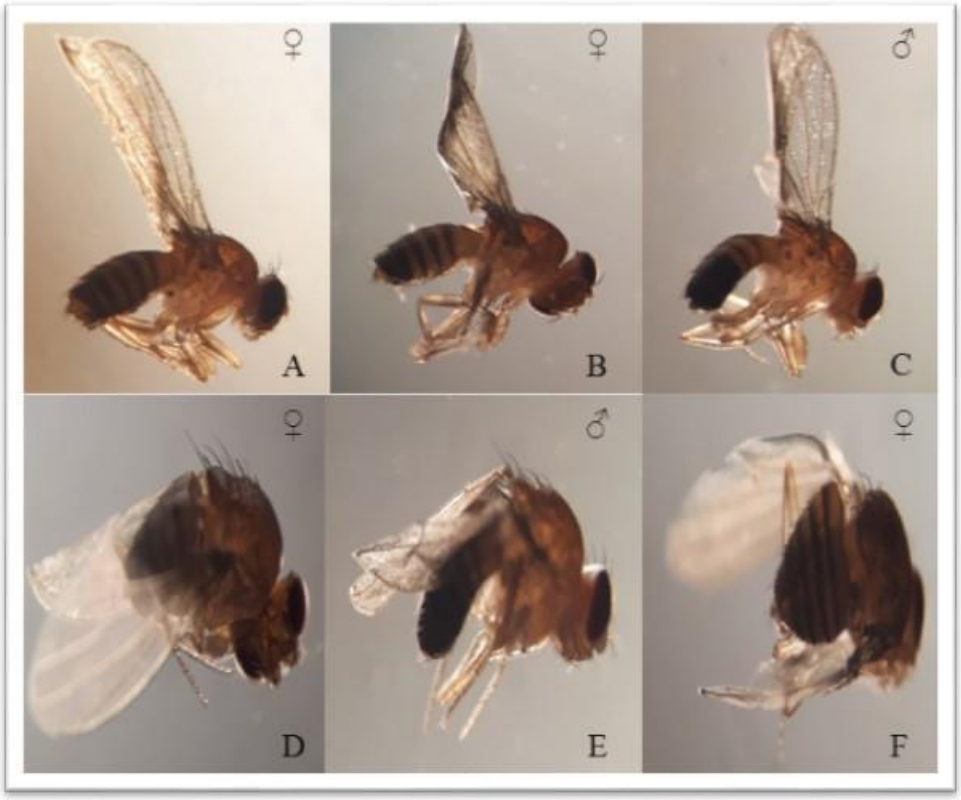
4.4.5. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasının Deltamethrin+Thiamethoxam 5. Nesil Dirençli *Drosophila melanogaster* Bireylerinin Morfolojileri Üzerine Etkisi



Şekil 4.37. Deltamethrin+Thiamethoxam 5. nesil dirençli bireylerde ortaya çıkan morfolojik anormallikler

Çalışmada stereo mikroskop ile görüntülenen Deltamethrin+Thiamethoxam dirençli bireylerin görüntüleri Şekil 4.37'de verilmiştir. (A-F) bireylerinin kanatlarında kıvrılma, ters V şeklini alma gibi anormallikler gözlemlenmiştir. (B ve C) şekillerindeki bireylerin kanatlarının toraks segmentine yapışık olması sebebiyle notum segmentinin daha şişkin göründüğü gözlenmiştir.

4.4.6. Deltamethrin+Thiamethoxam Uygulanmasıın Duyarlı *Drosophila melanogaster* Bireylerinin Morfolojileri Üzerine Etkisi



Şekil 4.38. Deltamethrin+Thiamethoxam uygulaması yapılan duyarlı bireylerde ortaya çıkan morfolojik anormallikler

Deltamethrin+Thiamethoxam uygulama grubunun ergin ve duyarlı bireylere sprey yöntemi ile uygulanması sonucu elde edilen stereo mikroskop görüntüleri Şekil 4.38'de verilmiştir. (A-F) bireylerinde kanat anormalliği, toraksın anormalliği, abdomen farklılaşması (abdomende normal görünümünden daha zayıf görünüm) ve bacaklarda femur ve tibia bölümlerinde kütleşmeler görülmüştür.

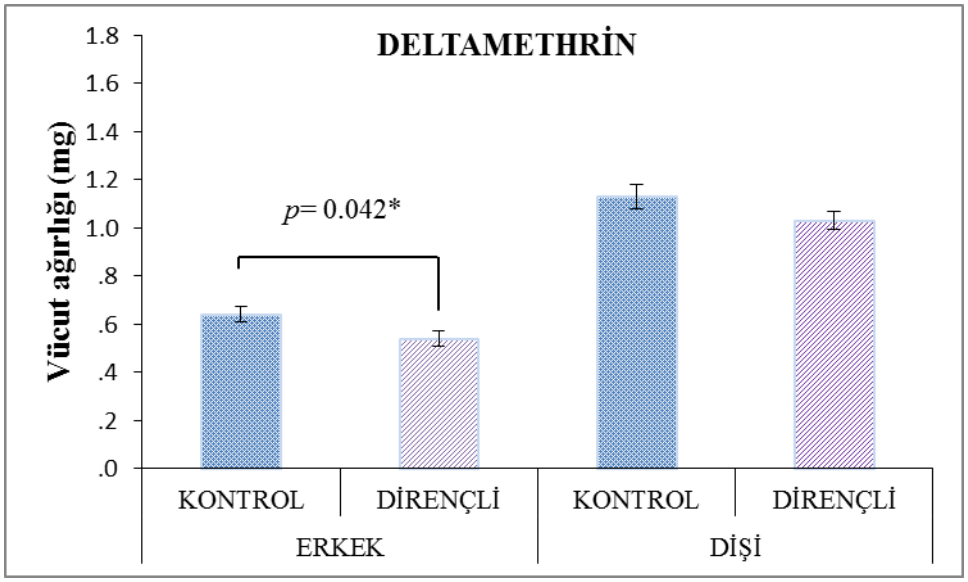
4.5. Yüzde Ağırlık Kaybı Analizleri

Çalışma kapsamında, *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ ergin bireylerine Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit uygulama grupları LD_{50} dozlarında 5 nesil boyunca *Drosophila melanogaster* ergin bireylerine püskürtme ile uygulanarak 24 saat sonra kuru örnekler alınmıştır.

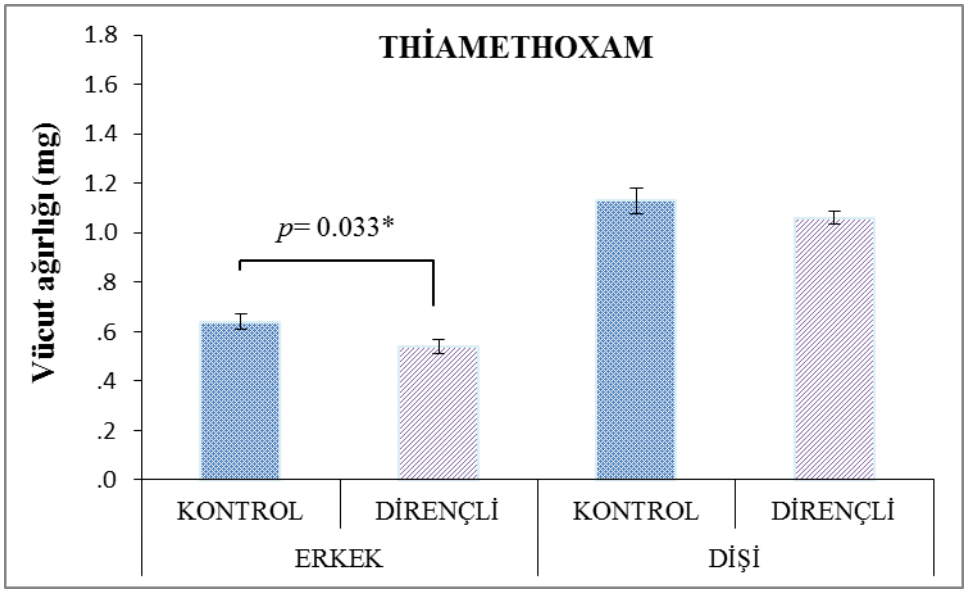
İnsektisit gibi çeşitli antropojenik ve çevresel etkenler böceklerin ortalama ağırlıklarında değişikliklere yol açabilmektedirler. Çalışmada insektisit uygulama gruplarının dirençli ergin meyve sineklerinin vücut ağırlıklarında oluşturdukları değişimler kontrol grubu ile kıyaslanarak araştırılmak istenmiştir. Bu kapsamda her gruptan dişi ve erkek bireylerin kuru vücut ağırlıkları hassas terazide tartılmış ve tartım verileri SPSS20 istatistiksel analiz programı t-test metodu kullanılarak yorumlanmıştır.

Elde edilen verilerin sonuçlarına göre 5. nesil Deltamethrin ve 5. nesil Thiamethoxam dirençli erkek bireylerin vücut ağırlıkları kontrol grubuna kıyasla anlamlı seviyede azalmıştır. Deltamethrin+Thiamethoxam 5. nesil dirençli erkek ve dişi bireylerin vücut ağırlıkları kontrol grubu bireylerinin vücut ağırlıklarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir.

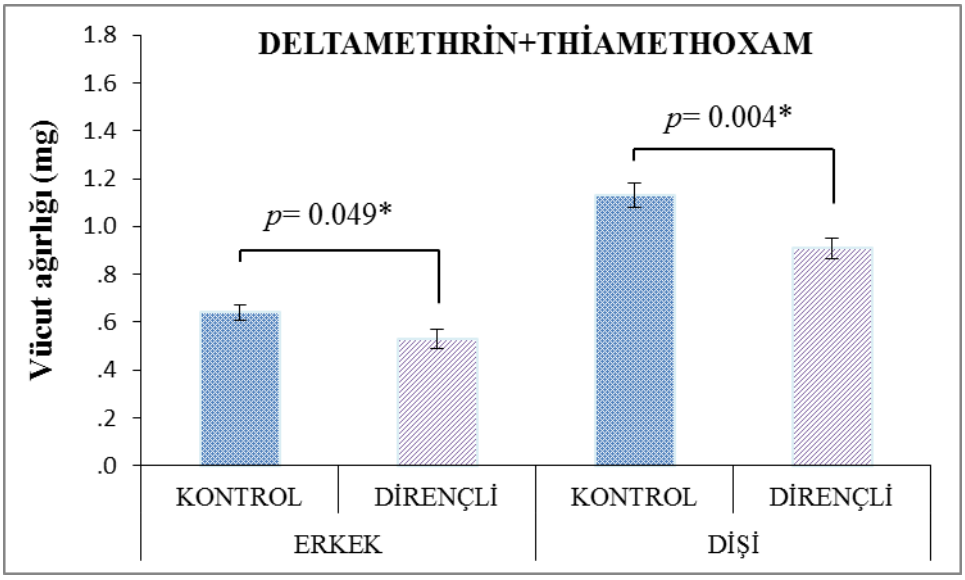
Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit uygulama gruplarının kontrol grubu ile kıyaslanmaları sonucu oluşan istatistiksel değişimler Şekil 4.39, Şekil 4.40 ve Şekil 4.41'de grafiksel olarak gösterilmiştir. ($P_{\text{deltamethrin+erkek}}$ = 0.042, t= 2.188, df= 18; $P_{\text{thiamethoxam+erkek}}$ = 0.033, t= 2.315, df= 18; $P_{\text{(deltamethrin+thiamethoxam)+erkek}}$ = 0.049, t= 2.108, df= 6, $P_{\text{(deltamethrin+thiamethoxam)+dişi}}$ = 0.004, t= 3.260, df= 18).



Şekil 4.39. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ erkek ve dişi ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin uygulanmasından 24 saat sonra vücut ağırlığı değişimleri. Veriler n=10, Ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, $P<0.05$)



Şekil 4.40. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^+ erkek ve dişi ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Thiamethoxam uygulanmasından 24 saat sonra vücut ağırlığı değişimleri. Veriler n=10, Ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, $P<0.05$)



Şekil 4.41. Kontrol ve Dirençli *Drosophila melanogaster* Oregon R^{+} erkek ve dişi ergin bireylerinde, LD_{50} dozunda Deltamethrin+Thiamethoxam uygulanmasından 24 saat sonra vücut ağırlığı değişimleri. Veriler n=10, Ortalama±standart hata *Ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır, (t-test, $P<0.05$)

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

İnsektisitler etkilerinin hızlı olması, lokal çözümler sağlayabilmeleri nedeniyle etkili bir yöntem olarak tarımda, hayvan sağlığı ve halk sağlığı alanlarında kullanılmaktadırlar. İnsektisitlerin sağladığı bu avantajlar sık ve yoğun olarak kullanılmalarına yol açmıştır. 1940'larda DDT'nin her alanda kullanılmasıyla başlayan sentetik insektisitlerin kullanımı çeşitli sağlık ve çevre sorunlarıyla birlikte insektisit direncinin gelişmesine de neden olmuştur (Thomas C. Sparks & Nauen, 2015) Son yıllarda yapılan çalışmalarda birçok önemli zararlı böcek türünde Sentetik piretroid (Picollo vd., 2005; Hargreaves vd., 2000; Chandre vd., 1999; Christophers, 1960) ve Neonikotinoid (Bass vd., 2015; Gao vd., 2014; Feng vd., 2010; Horowitz vd., 2004) sınıfı insektisit gruplarından bileşiklere karşı da direnç geliştiği gösterilmiştir. Böceklerde çeşitli mekanizmalar aracılığıyla direnç oluşabilmektedir. Bunlar; metabolik direnç, hedef bölge direnci, penetrasyon direnci, davranışsal direnç, çapraz direnç ve çoklu ilaç direnci mekanizmalarıdır. Direnç, bu mekanizmalardan biri aracılığıyla gelişebileceği gibi birden fazla mekanizmanın biraraya gelmesiyle de ortaya çıkabilmektedir. Böceklerin pek çok alanda zarar meydana getirmelerinden dolayı dirençli ve duyarlı böcek türlerinin genetik mekanizmalarında ve fenotiplerinde oluşan farklılıkların araştırılması büyük önem taşımaktadır. Farklı genotip ve fenotipe sahip bireylerin çeşitli çevresel koşullar altında populasyondaki yayılma hızlarının tespit edilebilmesi açısından bu özelliklerin araştırılması gerekmektedir.

Mevcut direnç mekanizmalarının bilinmesi zararlı böceklerle mücadelede yol gösterici olmakla birlikte *Drosophila melanogaster* model organizmasının kullanılmasıyla elde edilen moleküler cevaplar insanlar ve diğer canlıların da kullanılan insektisitlerden genetik ve fenotip olarak ne düzeyde etkilenebileceğini göstermektedir. Bu doğrultuda planlanan bu Yüksek Lisans Tez çalışmasında *Drosophila melanogaster* 1 günlük ergin bireyleri 24 saat süreyle Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit uygulama gruplarına LD_{50} dozlarında spreylemeye maruz bırakılmıştır. İnsektisit uygulama gruplarının 5 nesil boyunca uygulanmasıyla *Drosophila melanogaster* bireylerinde direnç oluşumunu sağlayabilen P-450, GST ve ABC taşıyıcı sinyal yolakları ile birlikte apoptoz, antioksidan ve HSP yolağı genlerinin kontrol bireylerine kıyasla ekspresyon düzeyleri moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Direnç, fenotip ve farklı büyüme faktörleri (vücut ağırlığı gibi) üzerinde de etkili bir olgu olduğu için bu parametreler de araştırılmıştır

Bu araştırma kapsamında ilk olarak Probit analiz yöntemi ile Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit uygulama grupları için üretici firmaların önerdiği dozlar 6 seri seyreltme dozunda insektisit duyarlılık testleri yapılarak LD_{50} dozları belirlenmiştir. Duyarlı bireylerde Deltamethrin için LD_{50} dozu 2023 ppm, Thiamethoxam için LD_{50} dozu 18518 ppm ve Deltamethrin+Thiamethoxam için LD_{50} dozu sırasıyla 347 ppm+4325 ppm olarak belirlenmiştir. Aynı insektisit uygulama grupları 5. nesil dirençli bireylerde 5 farklı seri seyreltme dozunda Deltamethrin için LD_{50} dozu 3890 ppm ile 1.92 kat artış gösterirken, Thiamethoxam için LD_{50} dozu 170394 ppm bulunarak 9.2 kat artış göstermiş ve Deltamethrin+Thiamethoxam için LD_{50} dozu sırasıyla 847 ppm+10555 ppm dozları duyarlı bireylere kıyasla yaklaşık 2.4 kat kat artış gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.7). Sonuç olarak Deltamethrin ve Thiamethoxam'ın düşük dozlarda tekli ve kombine uygulamalarının *Drosophila melanogaster* bireylerinde güçlü bir ilaç direnci cevabı oluşturduğu ortaya konulmuştur.

Çalışma kapsamında oluşan bu ilaç direncinin altında yatan moleküler mekanizmalar araştırılmıştır. Bu mekanizmalardan en bilinenlerden biri Sitokrom P-450 Monooksijenaz yolağıdır. Faz I enzimleri kutupsuz yapıdaki insektisitleri oksidasyon, hidroliz veya indirgenme yoluyla reaktif ve kutuplu ara maddelere dönüştürmektedirler.

Faz I detoksifikasyon enzimlerinden böceklerdeki rolleri iyi bilinenler Sitokrom P450 Monooksijenaz enzim sistemleridir. P-450 enzimleri, insektisitlere elektrofilik veya nükleofilik maddeler ekleyerek daha az zehirli ara maddelere dönüştürmektedirler (Feyereisen, 1999). Böceklerde P450'ler ile detoksifikasyon trans veya cis düzenleyici elementlerle düzenlenerek, dirençli böceklerde P-450 geninin artış göstermesinin bazal transkripsiyon faktörlerinin (BTF) ve trans düzenleyici faktörler (TRF) ile etkileşime girmesiyle oluşmaktadır (N. Liu vd., 2015). Çalışma kapsamında moleküler yöntemler kullanılarak elde edilen verilerden birbirleriyle gen homolojisine sahip olan P-450'lerden CYP6G1, CYP12D1 ve CYP6A2 genlerinde kontrol gruplarına kıyasla dirençli gruplarda istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Üstelik Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit uygulama gruplarında ise CYP6A2 geninde kontrol grubuna kıyasla dirençli grubun ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Ancak başka böcekler, başka insektisitler ve çalışmada kullandığımız dozlardan farklı dozlarla yapılan çalışmalarda bu genlerin DDT, Neonikotinoidler, Piretroidler ve Organik fosfatlarda direnç mekanizması ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. CYP6G1, CYP12D1 ve CYP6A2 ve dört P450 geninin daha insektisit direncindeki rollerinin transpozon çeşitlilikleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Jones vd., 2010; Chen & Li, 2007). CYP genlerinin insektisit direnci ile ilişkisini gösteren çalışmalarda *Drosophila melanogaster* DDT dirençli ırklarına çapraz direnç geliştirdiği bilinen İmidaclopridin uygulanması sonucu CYP6G1 geninin ekspresyon düzeyinin arttığı gösterilmiştir (Daborn, Boundy, Yen, & Pittendrigh, 2001). Drosophila hücre hatlarına çeşitli Neonikotinoidlerin uygulanması sonucu CYP6G1 geninin ekspresyonunda artış olduğu tespit edilmiştir (Sparks vd., 2012). CYP genlerinden CYP6A2, CYP6A8 ve CYP12D1 genlerinin ergin erkek *Drosophila melanogaster'*lerde insektisit direncinin PBO (Piperonil Bütoksit) ile güçlü bir şekilde indüklendiği ve insektisit direnci ile ilişkili 12 adet CYP geni olduğu gösterilmiştir (Giraudo, Unnithan, Le Goff, & Feyereisen, 2010; Willoughby, Batterham, & Daborn, 2007). Methotrexate ile PBO'in *Drosophila melanogaster* erginlerinde birlikte kullanıldığı bir çalışmada kontrol grubuna kıyasla CYP6A2 geninde herhangi bir ekspresyon farkı oluşmazken CYP6A8 ve CYP12D1 genlerinin ekspresyonlarında artış olduğu bulunmuş (Chahine & O'Donnell, 2011), buna paralel olarak başka bir çalışmada da *Drosophila melanogaster*'de Piretroid ve

piperamidlerin birlikte kullanılmasının CYP6A2 ve CYP12D1 genlerinin ekspresyonlarının arttırdığı bildirilmiştir (Jensen, Scott, Sims, Trudeau, & Arnason, 2006). Yaptığımız çalışmada CYP6A2, CYP12D1 ve CYP6G1 genlerinin hiçbirinde istatistik düzeyde anlamlı bir artış oluşmamış, bu sebeple probit analiz ile dirençli böceklerde tespit ettiğimiz LD_{50} dozu artışının kullandığımız pestisidler ile *Drosophila melanogaster*'da P450 mekanizması ile en azından bakılan genler açısından ilişkili olmadığı değerlendirilmiştir.

Faz II detoksifikasyon mekanizmalarında rol alan GST'ler, faz I enzimleri tarafından kutuplu yapı kazandırılan ara maddeleri hidrofilik maddelere dönüştürmektedir. Faz I reaksiyonları sonucunda insektisitlere hidroksil, karboksil ve epoksidaz gibi fonksiyonel gruplar eklenmektedir. Bu grupların eklenmesi sonucunda glutatyon, fosfat, sülfat, aminoasit gibi büyük moleküller oluşmaktadır. Faz II reaksiyonları sonucunda daha az toksik polar yapıda maddeler oluşturularak vücuttan atılmaktadır. (Ranson vd., 2005). GST'de benzer alanlara sahip 6 farklı sitozolik protein sınıfı bulunmaktadır. Bunlardan sadece böceklerde sınıflandırılmış olanlar Delta ve Epsilon sınıflarıdır (Enayati vd., 2005). *Drosophila melanogaster* ergin bireylerine 24 saat süreyle LD_{50} dozlarında Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit gruplarının uygulanması sonucunda yapılan moleküler yöntemlerden elde edilen verilerde GST enzim ailesi genlerinden Delta sınıfı GSTD1, GSTD5 ve Epsilon sınıfı GSTE1 genlerinin analizi yapılmıştır. Buna göre GSTE1 geninde her üç insektisit uygulama grubunda da kontrol grubuna kıyasla dirençli grupta önemli seviyede artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14). Çalışma bulgularımızı destekler şekilde *Drosophila melanogaster* ergin bireylerine methotrexate ve fenol bileşiğinin besiyeriyle birlikte 10 nesil boyunca uygulanması sonucunda GSTD1 ve GSTD5'de bir değişiklik oluşmazken GSTE1'de kontrol grubuna kıyasla artış oluştuğu belirlenmiştir (Chahine & O'Donnell, 2011). Başka bir çalışmada, *Drosophila melanogaster* ergin bireylerine 4 saat PBO uygulanması sonucu GSTD1, GSTD5 ve GSTE1 genlerinin mRNA ekspresyonlarında artış meydana geldiği belirlenmiştir (Willoughby vd., 2007). İnsektisit dirençli *Culex pipiens* (Diptera:Culicidae) sineklerine permethrin uygulanması sonucu GST genlerinden delta sınıfı GSTD1 ve GSTD2 genlerinin ekspresyonlarında herhangi bir değişikliğe rastlanmadığı bildirilmiştir (Samra, Kamita, Yao, Cornel, & Hammock,

2012). Ayrıca, 28 nesil boyunca Benzene maruz bırakılan *Drosophila melanogaster* sineklerinde GST enzimlerinde uzun vadede artış meydana geldiği gösterilmiştir (Sharma vd., 2018). Bu bilgiler ışığında *Drosophila melanogaster* bireylerinde Deltamethrin ve Thiamethoxam'a karşı gelişen ilaç direncinde Glutatyon S-Transrefaz mekanizması elemanlarından olan GSTE1'in önemli düzeyde etkili olduğu düşünülmüştür.

Faz III taşıyıcıları P-glikoproteinleri (MDR), çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinleri (MRP) ve organik anyon taşınmasında rol alan polipeptidleri kapsamaktadır. Faz III taşıyıcıları içerisinde en iyi bilinen taşıyıcı ailesi ABC (ATP bağlayan kaset) proteinleridir. Detoksifikasyon sürecinde ABC taşıyıcıları Faz I ve Faz II reaksiyonları sonucunda oluşan aminoasit, şeker, lipit, inorganik iyon, polisakkarit, metal, peptid, toksik metabolit ve ilaçları da kapsayan substratları taşırlar. aminoasit, lipit, şeker gibi büyük yapılı maddelerin, ksenobiyotikler ve ilaçların substratlar boyunca taşınmasını ATP hidrolizleyerek sağlamaktadırlar (Chahine & O'Donnell, 2011; C. Xu vd., 2005). ABC proteinleri, 8 alt aileyi (A-H) içermektedir ve bunlardan B,C ve G alt aileleri ilaç taşınmasına aracılık etmektedir. P- glikoproteinler olarak da bilinen ABCB1'ler ilk kez meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edilmesiyle keşfedilmiştir (Kartner & Ling, 1983). ABCB'lerden (MDR49, MDR50 ve MDR65) genleri insektisitlerin taşınmasında rol alırken ABCC alt ailesi (MRP1 ve SUR) genleri geniş çapta ilaçları geçirme kabiliyetleri nedeniyle çoklu ilaç direnci ile ilişkilendirilmişlerdir (Dermauw vd, 2014).

ABC-B'lerden MDR49 ve MDR50 orta bağırsak ile malpigi tübüllerinde eksprese edilirken, MDR65 merkezi sinir sisteminde eksprese edilmektedir (De Salvo vd., 2014). MDR49, MDR50 ve MDR65 geni de DDT direnci ve taşınmasında rol almaktadırlar (Gellatly vd., 2015). ABCB genlerinde meydana gelen genetik bozukluklar veya Verapamil gibi ABC inhibitörleriyle birlikte uygulanan insektisitlerin böceklerin duyarlılıklarında artışa sebep olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bunlardan (Epis vd., 2014)'in çalışmalarında ABC inhibitörü olan Verapamil ile Permethrinin malarya vektörü olarak bilinen *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) larvalarına birlikte uygulanmaları sonucunda ABCB genlerinin inhibe edildiği gösterilmiştir. (Figueira-Mansur vd., 2013)'un bildirdiğine göre Dengue ve Sarı humma gibi vektör kaynaklı hastalıkların vektörü durumundaki *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvalarına organik fosfatlı larvisit olan Temephos ile birlikte Verapamil

uygulunması sonucunda ABCB genlerinin inhibisyonu ile larvalar Temephosa daha duyarlı hale gelmiştir (Chahine & O'Donnell, 2009). *Drosophila melanogaster* erginlerinin besiyerine methotraxate uygulanmasıyla MDR49, MDR50 ve MDR65 genlerinin ekspresyonlarında artış meydana gelirken Verapamil, Salicylate ve MK-571 gibi ABC inhibitörlerinin uygulanmasınından sonra MDR genlerinin ekspresyonlarında azalma oluştuğunu bildirmişlerdir. Chlorantraniliprole, Ivermectin, Imidacloprid, Nitenpyram, Pyriprole ve Spinosad insektisitlerinin *Drosophila melanogaster* bireylerine uygulandıktan sonra insektisit direnci CRISPR-Cas9 yöntemi kullanılarak MDR49, MDR50 ve MDR65 genlerinde incelenmiş ancak sadece MDR65 geninde insektisitlere duyarlılıkta artış saptanmıştır (Denecke, Fusetto, & Batterham, 2017). *Laodelphax striatellus* (Homoptera:Delphacidae) bireylerine Chlorpyrifos, Deltamethrin ve İmidacloprid uygulaması yapılarak ABC genlerinin dirençli bireylerde arttığı ve Verapamil uygulamasından sonra dirençli bireylerdeki direnç katsayısının azaldığı belirtilmiştir (Sun, Pu, Chen, Wang, & Han, 2017). Bizim çalışmamızda tüm insektisit uygulama gruplarında MDR49, MDR50 ve MDR65 genlerinin dirençli ve kontrol bireylerinin gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). Bu sonuçlarımız *Drosophila melanogaster*'da kullandığımız insektisitlerin taşınması ve detoksifikasyonunda ABC-B tip pompa mekanizmalarının etkin bir rol oynamadığını düşündürmektedir.

ABC-C alt ailesi genlerinden *Drosophila melanogaster* MRP1 ile SUR genleri arasında %38 oranında benzerlik bulunmaktadır (Grailles, Brey, & Roth, 2003). Zararlı böceklerle mücadelede kitin sentezi inhibitörü olarak benzoilüre sınıfı insektisitler genellikle kullanılmaktadır Benzoilürelerden Diflubenzuron uygulaması yapılmış bir çalışmada *Drosophila melanogaster* larvalarında kitin sentezi miktarının azalmadığı ve SUR yerine Sülfonilüreye duyarlı farklı bir ABC geninin kullanılabileceği düşünülmüştür (Meyer, Flötenmeyer, & Moussian, 2013). Glibenclamid Tip II diyabet türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir Sülfonilüredir. Glibenclamidin pozitif kontrol olarak kullanıldığı bir çalışmada, Diflubenzuron'un kitin sentezi inhibitörü olarak *Drosophila melanogaster* larvalarında ve *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) nimflerinin SUR fonksiyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve bu her iki türde de kitin sentezi inhibisyonunda SUR geninin hedefi olduğu sonucuna varılmıştır (Abo-Elghar, Fujiyoshi, & Matsumura, 2004). Bizim çalışmamızda Deltamethrin ve

Thiamethoxam uygulaması yapılmış olan bireylerde kontrol gruplarına kıyasla SUR geni ekspresyonunda anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Bu sonuç *Drosophila melanogaster* ergin bireylerinde SUR geni aracılığıyla ATP bağımlı potasyum kanallarının Deltamethrin ve Thiamethoxam direncinin gelişmesinde rol aldığı hipotezini desteklemektedir.

Faz II detoksifikasyon mekanizması reaksiyonları ve diğer detoksifikasyon ürünlerinin birleşme ürünleri Faz III detoksifikasyon taşıyıcı sisteminde bulunan dMRP (MRP1), MET ve OATP gibi çeşitli taşıyıcılar tarafından taşınır (Strycharz vd., 2013) Ergin sineklerin baş kısmında dMRP ekspresyonu fazla miktarlardadır ve nöron fonksiyonları dMRP'ler vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Tarnay vd., 2004). Methotrexate ile PBO'nun birlikte uygulanması ve PBO'nun tek başına uygulanmasıyla MRP1 ve MET genlerinin sineklerin malpigi tüplerinde daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir (Chahine & O'Donnell, 2011). DDT'nin taşınmasında *Drosophila melanogaster* bireylerinde ABC taşıyıcı proteinlerinden MRP1 geninin DDT direnci ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Gellatly vd., 2015). Besiyerlerine Methotrexate eklenen sineklerin malpigi tüplerinde MET ve MRP1 genlerinin ekspresyonu önemli seviyede artış gösterdiği belgelenmiştir (Chahine, Campos, & O'Donnell, 2012). Bizim bulgularımızda ise MRP1 geni için Deltamethrin uygulama grubundaki (Şekil 4.18) dirençli bireylerin mRNA seviyelerindeki artış *Drosophila melanogaster* hücrelerinde detoksifikasyonda ve zararlı oksijen metabolitlerinin taşınmasında rol aldığını düşündürmektedir. Thiamethoxam ve Deltamethrin+ Thiamethoxam insektisit uygulama gruplarında (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20) ise dirençli grup ile kontrol grupları arasında fark oluşmamış veya tespit edilememiştir. Bu bulgular ile *Drosophila melanogaster* erginlerinde Deltamethrin ve Thiamethoxam uygulamaları sonucu oluşan direnç mekanizmasında MRP1 ve MET geni ekspresyonlarının doğrudan etkili bir rol oynamadığı düşünülmektedir.

Apoptoz, hücrelerin programlı bir şekilde kendi kendilerini yok ettikleri enerji gereksinimi duyan, genlerle düzenlenen, protein sentezine gereksinim duyan moleküler bir olaydır. Apoptoz, yaşam boyunca normal fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemlidir. Apoptozun genel olarak düzenlenmesinde Bcl-2, seramid, kalsiyum gibi moleküller ile p53, sitokrom-c ve kaspazlar gibi proteinler ve mitokondriyonlar rol alırlar (Bellamy vd., 1995; Ellis vd., 1991). Mitokondri bağımlı programlanmış hücre

ölümü yolağında en önemli protein BCL gen ailesidir. BCL2 proteini apoptoz inhibitörü olarak görev yapar. Özellikle tamir edilemeyen bir DNA hasarı oluştuğunda apoptoz gereksinimi durumunda BCL2 geninin aktivitesi baskılanır, bu baskılama sonucunda BCL geninin son kısmında yer alan BAX geninin aktivitesi artmaya başlar. BAX proteini mitokondriyal membran potansiyelinin ve geçirgenliğinin bozulmasına yol açar. Bozulan mitokondriyal membran sebebiyle mitokondride bulunan sitokrom oksidase sitozole akar, burada apoptoz aktive edici faktör 1 (APAF1) ile birleşir bu yapıya Caspase 9 katılarak apoptozom kompleksi oluşur, bu kompleks CAS3 ekspresyonundaki artışı tetikler ve sonucunda hücre ölüme gider. Yaptığımız çalışmada apoptoz gen ekspresyonlarının artması *Drosophila melanogaster*'e uyguladığımız insektisitlerle zarar gören hücrelerin apoptoza götürülerek insektisitlerin öldürücü etkisinden kurtulmayı başardığını düşündürmüştür. Yapılan literatür araştırmalarında Deltamethrinin insan ağız kanseri hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmış ve deltamethrinin apoptozise bağımlı ölümü Ca^{2+} kanalları vasıtasıyla gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Chi, Chou, Liang, & Jan, 2014). Başka bir çalışmada nöroblastoma hücrelerine Deltamethrin uygulanması sonucu apoptoz ile Na^{2+} kanallarından doza ve zamana bağlı olarak apoptoz mekanizmasının tetiklendiği belirtilmiştir (Hossain & Richardson, 2011). *Drosophila melanogaster* S2 hücrelerine Organik fosfatlı Chlorpyriphos insektisitinin uygulanması sonucu genotoksisiteye ve hücre apoptozuna sebep olduğu gösterilmiştir (Li vd., 2015). Çalışmamızda özellikle Deltamethrinin uygulandığı grupta kontrol grubuna kıyasla güçlü bir apoptozis sinyali oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.24). Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam uygulama gruplarının birlikte uygulandığı durumlarda ise kontrol gruplarına kıyasla artış oluşmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26). Bu sonuçlar Deltamethrinden zarar gören hasarlı hücrelerin apoptoz ile elimine edildiğini düşündürmektedir.

Serbest radikaller, pestisitlerin ve çevresel kimyasalların toksisitesinde önemli bir rol oynar. Pestisitler, oksidatif stresi indükleyerek, serbest radikallerin oluşumuna ve antioksidanlarda, oksijensiz radikallerde ve süpürücü enzim sistemlerinde değişikliklere neden olabilirler (Banerjee, Seth, & Ahmed, 2001) Oksijen (O_2) metabolizması ürünlerinin azaltılması enzimatik süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon sentaz hücresel savunma mekanizmalarıyla kontrol edilmektedir. Antioksidan savunma sistemi

bileşenleri reaktif oksijen türlerine karşı birlikte görev alırlar. Pestisit uygulaması gibi stres koşulları altında antioksidan enzimlerin mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimler saptanabilmektedir. Süperoksit dismutaz, reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunmayı oluşturan enzimlerdendir ve süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene katalizler. Meydana gelen hidrojen peroksit katalaz enzimi tarafından suya ve oksijene dönüştürülür. Glutatyon sentaz toksik ksenobiyotiklerin ve elektrofillerin hücrelerden arındırılmasında rol alan Glutatyon mekanizmasının önemli bir molekülüdür. (Shinde vd., 2012; Valko vd., 2007). Tez sonuçlarımıza göre bu genlerin ifadelerinde CAT enzimi her üç insektisit uygulama grubunda kontrole kıyasla azalma gösterirken GS, SOD ve SOD2 enzimlerinin gen ifadelerinde ise anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.27., Şekil 4.28 ve Şekil 4.29). Konuyla ilgili yapılan bir çalışmada *Drosophila melanogaster* erginlerine 7 farklı insektisit karışımının farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucunda 1 ve 5. gün uygulamalarının antioksidan sistemlerindeki değişimlerine bakılmış ve GS, SOD2 ve CAT enzimlerinin gen ifadelerinde 1. gün uygulamalarına kıyasla 5. gün uygulamalarındaki gen ifadelerinde artış oluştuğu bildirilmiştir (Doganlar & Doganlar, 2015). Edirne ilindeki tarımsal alanlarda çalışanların pestisit maruziyetleri ile ilgili yapılan bir çalışmada tarım işçilerinden belirli dönemlerde alınan kan örnekleri kontrol grubu ile kıyaslanarak SOD, CAT ve GS enzimlerinin gen ifadelerinde pestisit uygulama dönemlerinde artış meydana geldiği bildirilmiştir (Doğanlar vd., 2018). Tez sonuçlarımız ise CAT gen ifadesi, bu çalışmalara benzer olmayan bir şekilde dirençli olmayan böceklerde istatistik olarak anlamlı seviyede düşük bulunmuştur. Bu durumun bir önceki bölümde anlatıldığı gibi, dirençli böceklerde etkin bir GSTE1 ve SUR pompa mekanizmalarının etkisiyle, hücreye giren ilaçların dışarıya atılmasından, hücrede mevcut kalan ilaçların yüksek düzeyde bir oksidatif stres ve özellikle H_2O_2 oluşumuna yol açmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

HSP'ler ökaryotik hücrelerde stres proteinleri ve moleküler şaperonlar olarak bilinirler. Fizyolojik koşullarda proteinlerin doğru katlanmasından sorumlu proteinlerdir (Öztürk vd., 2009). HSP'ler önemli stres biyomarkerlar olarak bilinir, başta çevresel kontaminantlar olmak üzere bir çok biyotik ve abiyotik stres faktörünün, proteinlerde oluşturdukları zararlı etkilere karşı en önemli savunma yanıtı mekanizmalarından birisidir ısı şokunun yanı sıra pek çok uyaran tarafından uyarılır (Csermely & Yahara,

2003). HSP'ler biyotik ve abiyotik stres koşullarının süresine ve şiddetine bağlı olarak farklı tepkiler gösterirler. Yapılan çalışmada HSP26 ve HSP60 genleri pestisitlerin yüksek konsantrasyonlarında etkili olurken, HSP70 ve HSP83 genleri düşük dozlarda ve 1. gün pestisit maruziyetinden sonra artış göstermiştir. 5. gün pestisit uygulamalarından sonra ise tüm HSP'lerde artış meydana geldiği bildirilmiştir (Doganlar & Doganlar, 2015). *Drosophila melanogaster* ergin bireylerine 28 nesil boyunca benzen uygulanması sonucunda HSP60 ve HSP70 genlerinin adaptasyon sürecinde organizmaya yarar sağlayabilecek farklı direnç koşullarında rol oynadığı bildirilirken HSP26 ve HSP27'de direnç ile ilgili bir verinin oluşmadığı bildirilmiştir (Sharma vd., 2018). Edirne ilindeki tarım çalışanlarından alınan kan örnekleriyle elde edilen gen ifadesi sonuçlarında HSP genlerinde kontrol grubuna kıyasla pestisit uygulama sezonlarında artış meydana geldiği gösterilmiştir (Doğanlar vd., 2018). Bizim çalışmamızda Deltamethrin uygulaması yapılan grupta HSP27, HSP60 ve HSP70'de anlamlı artışlar oluşurken (Şekil 4.30), Thiamethoxam'da HSP27 ve HSP60'da (Şekil 4.31) ve Deltamethrin+Thiamethoxam grubunda ise sadece HSP60'da (Şekil 4.32) anlamlı artışlar görülmüştür. Özellikle ilaç dirençli bireylerde görülen bu artışların, Deltamethrin, Thiamethoxam kaynaklı oksidatif stres, DNA hasarı ve bu hasara bağlı olarak oluşan hatalı katlanmış proteinlerin güçlü bir şekilde tamir edilmesi ve bu şekilde dirençli böceklerin hayatta kalmasının sağlanması sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Bu durum aynı zamanda HSP tepkisinin *Drosophila melanogaster* erginlerinde Deltamethrin, Thiamethoxam kaynaklı çoklu ilaç direncinde önemli bir rol oynadığını gösterdiği düşünülmektedir.

Deltamethrin, Thiamethoxamın ve Deltamethrin+Thiamethoxam insektisit uygulama gruplarının *Drosophila melanogaster* ergin dönem morfolojileri üzerindeki etkilerine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. *Drosophila melanogaster* insektisitlerin hedef organizması olmamasına rağmen hedef olmayan türler üzerinde etkilerini gözlemlemek için yararlı bir gözlem olacak ve bu gözlem diğer türler için de kullanılabilecektir. İnsektisit gruplarının uygulanması sonucunda *Drosophila melanogaster* bireylerinde çok sayıda ve çeşitte fenotipik anormallik oluşmuştur. İnsektisitlerin sineklerin mRNA'larında meydana getirdiği değişimler incelenmiş ve sinekler üzerinde genotoksik etki yarattığı gösterilmiştir. Çalışmalarımızda özellikle duyarlı bireylerde çok sayıda ve çok farklı fenotipik anormallikler gözlenmiştir. Ortaya

çıkan anormallikler daha çok torakstan türevlenen kanat anormallikleri ile birlikte toraks anormallikleri, bacak ve abdomen anormallikleri olarak gösterilebilir. Duyarlı ve dirençli bireyler stereo mikroskop ile görüntülenerek fenotipleri ile ilgili veriler toplanmıştır. İnsektisitlerin uygulanması sonucunda dirençli (Şekil 4.33, Şekil 4.35 ve Şekil 4.37) ve duyarlı (Şekil 4.34, Şekil 4.36 ve Şekil 4.38) bireylerin morfolojik gözlemleri yapılmış ve duyarlı bireylerde insektisit gruplarının uygulanması sonucunda en çok kanat anormalliği ardından toraks, bacak ve abdomen anormallikleri gözlenmiştir. Bu anormalliklerin, insektisitlerin gelişimsel genler üzerine mutajenik veya genotoksik etkileri sonucu ortaya çıkmış olabileceği düşünülmüştür. Bu görüşü destekler şekilde *Drosophila melanogaster*'in ağız parçalarını içeren antennapedia kompleksinde yer alan proboscipedia geninde meydana gelen bir mutasyonun fenotipte hem baskın hem de çekinik fonksiyon kaybına neden olduğu belirtilmiştir (Cribbs, Pattatucci, Pultz, & Kaufman, 1992). Cypermethrinin *Drosophila melanogaster* erginlerine uygulanması sonucunda fenotipik anormallikler oluşmuştur. Oldukça sık görülen kanat ve bacak anormallikleri homeotik genlerde oluşan bir mutasyon sonucu meydana gelmiş olabilir. Uygulanan insektisitler veya onların metabolitleri homeotik genlerle ya da bu genlerin regülasyonundan sorumlu tutulduğu kovalent bağ, gelişimsel bozukluklar sonucu fenotipik anormalliklere neden olmuş olabileceği belirtilmiştir (Karataş vd., 2009). 5. nesil dirençli bireylere kıyasla duyarlı bireylerde daha fazla fenotipik anormallik oluşması da Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxama karşı direnç gelişmiş olabileceğini kanıtlamaktadır.

Vücut büyüklüğü organizmaların en önemli karakterlerinden biridir, ancak vücut büyüklüğünü veya vücut büyüklüğündeki değişimi düzenleyen fizyolojik mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir. Toksikoloji çalışmalarında kullanılan model organizmalar farklı boyutlardadır ve doz, böcek vücut ağırlığının oranı olarak ifade edilir. Mide zehiri etkili insektisitlerin dozları böceğin 1 gram ağırlığına karşılık 1 miligram olarak belirlenir. Bu uygulama organizmanın fizyolojik tepkisinin vücut ağırlığı ile doğru orantılı olduğunu göstermektedir. *Diataraxia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarına LD_{50} dozlarında parathion, TEPP ve kurşun arsenat uygulanması sonucunda bu insektisitlere karşı gelişen direncin vücut ağırlığı ile doğru orantılı olduğu belirtilmiştir (Way, 1954). Ağırlık insektisit duyarlılığının önemli bir göstergesidir. Büyük sinekler insektisit uygulamasından sonra hayatta kalabilirler. *A. gambiae* ve *A.*

stephensi larvaları farklı sıcaklık, beslenme ve populasyon yoğunluğu gibi koşullarda yetiştirildikten sonra ortaya çıkan ergin bireyler Permethrine maruz bırakılarak farklı koşullar altında üreyen sineklerin ölüm oranlarında ve vücut ağırlığında önemli değişiklikler olduğu ve beslenmenin en önemli faktör olduğu gösterilerek vücut ağırlığının ve çevresel koşulların insektisit direncinin gelişmesinde önemli olduğu vurgulanmıştır (Owusu, Chitnis, & Müller, 2017). *Drosophila melanogaster* ergin bireylerine 28 nesil boyunca benzen uygulaması yapılması sonucunda 28. nesil dirençli bireylerin kontrol grubuna kıyasla vücut ağırlığında artış meydana gelmiştir. Dişi sineklerde vücut ağırlığı ve sağkalımın artışı erkek bireylere oranla daha fazla olduğu belirtilmiştir (Sharma vd., 2018). Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre 5. nesil Deltamethrin (Şekil 4.39) ve 5. nesil Thimethoxam (Şekil 4.40) dirençli erkek bireylerin vücut ağırlığı azalırken dişi bireylerin ağırlığında bir değişim oluşmamış ve 5. nesil Deltamethrin+ Thimethoxam (Şekil 4.41) dirençli bireylerinde ise erkek ve dişilerde kontrol grubuna kıyasla ağırlık azalışı gerçekleşmiştir. Bu durumun ilaç dirençli bireylerde yapısal bir dayanıklılık mekanizması sonucu oluştuğu düşünülmektedir.

Bu Tez çalışmasının sonucuna göre;

1-) Deltamethrin ve Thiamethoxamın tekli ve kombine uygulamalarının *Drosophila melanogaster* ergin bireylerinde çoklu ilaç direncinin multijenerasyonel etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda uygulanan dozların bireylerin canlılığı üzerindeki etkisi Probit analiz ile belirlenmiştir. Duyarlı bireylerde 6 farklı konsantrasyon dirençli bireylerde ise 5 farklı konsantrasyon uygulanarak 24 saat sonunda belirlenen LD_{50} dozları, dirençli bireylerde duyarlı bireylere kıyasla Deltamethrin için 1.92 kat artış, Thiamethoxam için 9.2 kat artış ve Deltamethrin+Thiamethoxam için 2.4 kat artış göstererek güçlü bir insektisit cevabı oluştuğu saptanmıştır.

2-) *Drosophila melanogaster* ergin bireylerine LD_{50} dozlarında uygulanan Deltamethrin, Thiamethoxam ve Deltamethrin+Thiamethoxam'ın; qRT-PCR gen ekspresyonu sonuçları değerlendirildiğinde, her üç insektisit uygulama grubunda dirençli bireylerde çoklu ilaç direncine aracılık eden GST enzimlerinden GSTE1 gen ifadesini arttırmasıyla Deltamethrin ve Thiamethoxam daha az zehirli yapıda hidrofilik polar maddelere dönüştürülerek böcek vücudundan uzaklaştıran, S-transferaz pompa mekanizmasının dirençte aktif rol oynadığı belirlenmiştir. ABC-C'lerden SUR

proteininin de gen ifadesinin tüm uygulama gruplarında artmış olması insektisitlerin ATP bağımlı potasyum kanallarından zararsız ara maddelere dönüştürülerek detoksifiye mekanizmasının aktif olduğu belirlenmiştir. GSTE1 ve SUR gen ekspresyonlarının artması multijenerasyonel insektisit uygulamalarının sonucunda model organizma olan *Drosophila melanogaster*'de çoklu ilaç direnci geliştiği ile ilgili güçlü bir kanıt sunmuştur. Deltamethrin uygulanması sonucu oluşan DNA hasarları apoptoz yolağı ile BCL geninin son kısmında yer alan BAX geninin aktivitesini arttırarak mitokondriyal membran potansiyelinin ve geçirgenliğinin bozulmasına yol açmış ve bu durum CAS3 geninin ekspresyonuna neden olarak hücre ölümüne neden olmuştur. Böylece hasarlı hücreler inflamasyona sebep olmadan elemine edilmişlerdir. Bu durumun dirençli böceklerde hayatın devamlılığı çin önemli bir mekanizma olduğu ve direnç çalışmalarında ele alınmasının önemli olduğu düşünülmektedir. Önemli stres biyomarkerları olan HSP'lerden HSP27, HSP60 ve HSP70 genlerinin direnç çalışmalarında kullanılabilecek önemli biyomarkerlar olduğu düşünülmüştür.

3-) Morfolojik analizler sonucunda, duyarlı *Drosophila melanogaster* dişi ve erkek bireylerinde kanat anormalliği, toraks anormalliği, bacak ve abdomen anormallikleri gözlenmiştir. Bu verinin ışığında hedef olan ve olmayan türlerin insektisit uygulamaları sonucunda fenotipik anormallikler gösterebileceği belirlenmiştir. Direnç gelişiminde önemli bir gösterge olan vücut ağırlığı değişimleri tüm insektisit uygulama gruplarında dirençli nesillerde azalmış olduğu ve bunun yapısal bir dayanıklılık mekanizması sonucu oluşmuş olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, tez ile elde ettiğimiz bulguların, model organizma olan *Drosophila melanogaster* sineklerinde pestisitlere karşı oluşan çoklu ilaç direnci mekanizmalarına ve bu mekanizmanın altında yatan moleküler sinyal yolaklarının daha net anlaşılması için temel teşkil edeceği ve önemli zararlı böcek türlerinde çoklu ilaç direnci konusunda yapılacak ileri araştırmalar ve etkili ve yeni pestisit geliştirme stratejilerininin ortaya konulması için temel düzeyde bilgi sunacağı düşünülmektedir.

ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmanın test sonuçları *Drosophila melanogaster* model organizma popülasyonlarımızda sentetik piretroidlerden Deltamethrin ve neonikotinoidlerden Thiamethoxam insektisitlerine karşı GST enzimlerinden GSTE1 ve ABC proteinlerinden SUR genlerinin dirençli bireylerin gen ekspresyonlarında artış oluşturarak çoklu ilaç direnci geliştiğini göstermekle birlikte daha ileri çalışmaların yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Örneğin hedef olan zararlı böcek popülasyonlarında insektisit direnci gelişmesine neden olan bu detoksifikasyon mekanizmalarının aktivasyonunu engelleyecek veya baskılayacak inhibitörler kullanılarak dirençli popülasyonlarda insektisitlerin hedef bölgeye bağlanmadan hücre dışına atılması engellenerek kullanılacak insektisitlere karşı duyarlılık oluşturma çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Çoklu ilaç direncine neden olan bu mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesi için çalıştığımız genlerden başka insektisitler ve başka genlerle de bu çalışmaların yapılarak başka hangi genler vasıtasıyla insektisit detoksifikasyonunun geliştiği araştırılmalıdır.

Bitki koruma, halk sağlığı ve hayvan sağlığı alanlarında kullanılan insektisitlerin olumsuz etkilerine karşı önlemler alınması gerekmektedir. Bunun için; insan sağlığına düşük etkili, hedef dışı organizmalara düşük zehirli, yeraltı suları ve toprağı kirletme potansiyeli en düşük olan ve hedef zararlı organizmalarda direnç geliştirme riski en düşük olan pestisitlerin seçimine özen gösterilmelidir. Entegre ürün yönetimi ve entegre zararlı yönetimi sistemleri kullanılarak, hedef zararlıyla mücadelede öncelikle kültürel, fiziksel, mekanik, biyolojik, biyoteknolojik ve pestisit uygulamalarının, hedef zararlı böceğin kontrol edilebileceği uygun, ekonomik, insan ve çevre sağlığına en az zararın oluştuğu yöntemlerin sistemli olarak uygulanmasıdır.

İnsektisitlere direnç gelişimi konusunda dikkat edilecek en önemli nokta aynı veya benzer etki mekanizmalarına sahip insektisit sınıflarından bileşiklerin birlikte veya ard arda kullanılmamasıdır. İnsektisit uygulaması yapılacak hedef zararlının zararlı olduğu dönem (larva veya ergin) ve üreme mevsimleri gözönünde bulundurularak spesifik ve farklı kimyasal yapıya sahip olan insektisitler dönüşümlü olarak kullanılmalıdır. Deltamethrin ve Thiamethoxam insektisitlerinin tekli ve kombine olarak kullanımları konusunda yaptığımız çalışmada bu insektisit sınıflarının antagonistik

etkiye sahip olmasına rağmen 5 nesil boyunca ard arda kullanımlarında çoklu ilaç direnci geliştirebildikleri görülmüştür. Bu nedenle insektisit kullanımdan önce entegre ürün yönetimi ve entegre mücadele yönetimi sistemlerinin koordineli olarak uygulanması büyük önem taşımaktadır.

KAYNAK LİSTESİ

Abo-Elghar, G.E., Fujiyoshi, P., Matsumura, F. (2004). Significance of the sulfonylurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology, 34*(8), 743-752.

Adams, J.M., Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences, 26*(1), 61-66.

Adrain, C., Martin, S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences, 26*(6), 390-397.

Aldred, E.M., Buck, C., Vall, K. (2009). Chapter 7 Free radicals. E. M. Aldred, C. Buck, K. Vall, (Ed.), *Pharmacology* (pp. 41-52). Edinburgh: Churchill Livingstone: Elsevier.

Alejandro, A., S Eliza, H., Colin, G., Monica, S. R. (2009). Molecular biology of KATP channels and implications for health and disease. *IUBMB life, 61*(10), 971-978.

Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M., Martínez, M. (2009). Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal, 182*(1), 7-20.

Azad, A.F., Radulovic, S., Higgins, J.A., Noden, B., Troyer, J.M. (1997). Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. *Emerging Infectious Diseases, 3*(3), 319.

Banerjee, B.D., Seth, V., Ahmed, R.S. (2001). Pesticide-induced oxidative stress: perspective and trends. *Reviews on Environmental Health, 16*(1), 1-40.

Bass, C., Denholm, I., Williamson, M.S., Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 121*, 78-87.

Bellamy, C.O., Malcolmson, R.D., Harrison, D.J., Wyllie, A.H. (1995). Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminars in Cancer Biology*. 6(1), 3-16.

Brengues, C., Hawkes, N.J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., Hemingway, J. (2003). Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology, 17*(1), 87-94.

Broehan, G., Kroeger, T., Lorenzen, M., Merzendorfer, H. (2013). Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics, 14*(1), 6.

Byrne, F.J., Toscano, N.C. (2006). Uptake and persistence of imidacloprid in grapevines treated by chemigation. *Crop Protection, 25*(8), 831-834.

Campos, G.S., Bandeira, A.C., Sardi, S.I. (2015). Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases, 21*(10), 1885.

Casida, J.E., Durkin, K.A. (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review Of Entomology, 58*, 99-117.

Catterall, W.A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Frank, H.Y., Konoki, K., Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon, 49*(2), 124-141.

Chahine, S., Campos, A., O'Donnell, M.J. (2012). Genetic knockdown of a single organic anion transporter alters the expression of functionally related genes in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology, 215*(15), 2601-2610.

Chahine, S., O'Donnell, M.J. (2011). Interactions between detoxification mechanisms and excretion in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology, 214*(3), 462-468.

Chahine, S., O'Donnell, M.J. (2009). Physiological and molecular characterization of methotrexate transport by malpighian tubules of adult *Drosophila melanogaster*. *Journal Of Insect Physiology, 55*(10), 927-935.

Chahine, S., Seabrooke, S., O'Donnell, M. J. (2012). Effects of genetic knock-down of organic anion transporter genes on secretion of fluorescent organic ions by malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Archives of Insect Biochemistry And Physiology, 81*(4), 228-240.

Chandre, F., Darrier, F., Manga, L., Akogbeto, M., Faye, O., Mouchet, J., Guillet, P. (1999). Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bulletin of the World Health Organization, 77*(3), 230.

Chapman, R., Penman, D. (1979). Negatively correlated cross-resistance to a synthetic pyrethroid in organo-phosphorus-resistant *Tetranychus urticae*. *Nature, 281*(5729), 298.

Chemspider. (2018). http://www.chemspider.com/Chemical-Structure. Erişim tarihi: 15.07.2018

Chen, S., Li, X. (2007). Transposable elements are enriched within or in close proximity to xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 genes. *BMC Evolutionary Biology, 7*(1), 46.

Chi, C.C., Chou, C.T., Liang, W.Z., Jan, C.R. (2014). Effect of the pesticide, deltamethrin, on Ca^{2+} signaling and apoptosis in OC_2 human oral cancer cells. *Drug and Chemical Toxicology, 37*(1), 25-31.

Christophers, S. (1960). Aedes aegypti (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. *Aëdes aegypti (L.) the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure.*

Corbel, V., N'guessan, R., Brengues, C., Chandre, F., Djogbenou, L., Martin, T., Rowland, M. (2007). Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Tropica, 101*(3), 207-216.

Couso-Ferrer, F., Arouri, R., Beroiz, B., Perera, N., Cervera, A., Navarro-Llopis, V.,Ortego, F. (2011). Cross-resistance to insecticides in a malathion-resistant strain of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology, 104*(4), 1349-1356.

Cribbs, D.L., Pattatucci, A.M., Pultz, M.A., Kaufman, T.C. (1992). Ectopic expression of the Drosophila homeotic gene proboscipedia under Antennapedia P1 control causes dominant thoracic defects. *Genetics, 132*(3), 699-711.

Csermely, P., Yahara, I. (2003). Chapter 6. Heat shock proteins. In *Molecular Pathomechanisms and New Trends in Drug Research* (pp. 67): New York: Taylor Francis Inc,

Daborn, P., Boundy, S., Yen, J., Pittendrigh, B. (2001). DDT resistance in Drosophila correlates with Cyp6g1 over-expression and confers cross-resistance to the neonicotinoid imidacloprid. *Molecular Genetics and Genomics, 266*(4), 556-563.

Daniels, T., Falco, R., Schwartz, I., Varde, S., Robbins, R. (1997). Deer ticks (Ixodes scapularis) and the agents of Lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in a New York City park. *Emerging infectious diseases, 3*(3), 353.

Das, Y.K., Aksoy, A. (2016). *Pestisitler* (Vol. 2). https://www.researchgate.net/publication/309358271_Pestisitler

Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research,* 11(7), 1156-1166. doi:10.1101/gr.184901

Deeley, R.G., Westlake, C., Cole, S.P. (2006). Transmembrane transport of endo-and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiological Reviews, 86*(3), 849-899.

Denecke, S., Fusetto, R., Batterham, P. (2017). Describing the role of *Drosophila melanogaster* ABC transporters in insecticide biology using CRISPR-Cas9 knockouts. *Insect Biochemistry and Molecular Biology, 91*, 1-9.

Dermauw, W., Osborne, E.J., Clark, R.M., Grbić, M., Tirry, L., Van Leeuwen, T. (2013). A burst of ABC genes in the genome of the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. *BMC Genomics, 14*(1), 317.

Dermauw, W., Van Leeuwen, T. (2014). The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology, 45*, 89-110.

DeSalvo, M.K., Hindle, S.J., Rusan, Z.M., Orng, S., Eddison, M., Halliwill, K., Bainton, R.J. (2014). The Drosophila surface glia transcriptome: evolutionary conserved blood-brain barrier processes. *Frontiers in Neuroscience, 8*, 346.

Doganlar, O., Doganlar, B.Z. (2015). Responses of antioxidant enzymes and heat shock proteins in Drosophila to treatment with a pesticide mixture. *Archives of Biological Sciences, 67*(3), 869-876.

Doğanlar, Z.B., Doğanlar, O., Tozkir, H., Gökalp, F.D., Doğan, A., Yamaç, F., Aktaş, Ü.E. (2018). Nonoccupational Exposure of Agricultural Area Residents to Pesticides: Pesticide Accumulation and Evaluation of Genotoxicity. *Archives of Environmental Contamination And Toxicology, 75*(4), 530-544.

Elbert, A., Nauen, R., Leicht, W. (1998). Imidacloprid, a novel chloronicotinyl insecticide: biological activity and agricultural importance. In *Insecticides with novel modes of action* (pp. 50-73): Leverkusen: Springer

Eleftherianos, I., Won, S., Chtarbanova, S., Squiban, B., Ocorr, K., Bodmer, R., Imler, J.L. (2011). ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP})–dependent regulation of cardiotropic viral infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 108*(29), 12024-12029.

Ellis, R.E., Yuan, J., Horvitz, H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology, 7*(1), 663-698.

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

Ensley, S.M. (2012). Chapter 48 - Neonicotinoids. Gupta, A., Ramesh C. In *Veterinary Toxicology (Second Edition)* (pp. 596-598). Boston: Academic Press.

Epis, S., Porretta, D., Mastrantonio, V., Comandatore, F., Sassera, D., Rossi, P., Genchi, C. (2014). ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Parasites Vectors, 7*(1), 349.

Erdoğan, O., Ceyhun, S.B., Ekinci, D., Aksakal, E. (2011). Impact of deltamethrin exposure on mRNA expression levels of metallothionein A, B and cytochrome P450 1A in rainbow trout muscles. *Gene, 484*(1), 13-17.

Fan, C.Y., Lee, S., Cyr, D.M. (2003). Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones, 8*(4), 309.

Feng, Y., Wu, Q., Wang, S., Chang, X., Xie, W., Xu, B., Zhang, Y. (2010). Cross-resistance study and biochemical mechanisms of thiamethoxam resistance in B-biotype *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Management Science, 66*(3), 313-318.

Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology, 44*(1), 507-533.

Feyereisen, R. (2012). Insect CYP Genes and P450 Enzymes A., Gilbert, Lawrence, I.(Ed.) In *Insect Molecular Biology and Biochemistry* (pp. 236-316). San Diego: Academic Press.

Feyereisen, R., Koener, J.F., Farnsworth, D.E., Nebert, D.W. (1989). Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P-450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 86*(5), 1465-1469.

Field, L.M., Anderson, A.P., Denholm, I., Foster, S.P., Harling, Z.K., Javed, N., Devonshire, A.L. (1997). Use of biochemical and DNA diagnostics for characterising multiple mechanisms of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Science, 51*(3), 283-289.

Figueira-Mansur, J., Ferreira-Pereira, A., Mansur, J., Franco, T., Alvarenga, E., Sorgine, M., Masuda, H. (2013). Silencing of P-glycoprotein increases mortality in temephos-treated *Aedes aegypti* larvae. *Insect Molecular Biology, 22*(6), 648-658.

Gao, C.F., Ma, S.Z., Shan, C.H., Wu, S.F. (2014). Thiamethoxam resistance selected in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae): Cross-resistance patterns, possible biochemical mechanisms and fitness costs analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 114*, 90-96.

Gellatly, K.J., Yoon, K.S., Doherty, J.J., Sun, W., Pittendrigh, B.R., Clark, J.M. (2015). RNAi validation of resistance genes and their interactions in the highly DDT-resistant 91-R strain of *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 121*, 107-115.

George, A.M., Jones, P.M. (2012). Perspectives on the structure–function of ABC transporters: the switch and constant contact models. *Progress In Biophysics And Molecular Biology, 109*(3), 95-107.

Gerrard, B., Stewart, C., Dean, M. (1993). Analysis of Mdr50: a Drosophila P-glycoprotein/multidrug resistance gene homolog. *Genomics, 17*(1), 83-88.

Giraudo, M., Unnithan, G.C., Le Goff, G., Feyereisen, R. (2010). Regulation of cytochrome P450 expression in Drosophila: Genomic insights. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 97*(2), 115-122.

Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology, 50*(4), 977-987.

Grailles, M., Brey, P.T., Roth, C.W. (2003). The Drosophila melanogaster multidrug-resistance protein 1 (MRP1) homolog has a novel gene structure containing two variable internal exons. *Gene, 307*, 41-50.

Gubler, D.J., Clark, G.G. (1995). Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerging Infectious Diseases, 1*(2), 55.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry, 249*(22), 7130-7139.

Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R. (2007). Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1770*(3), 330-344.

Hardstone, M.C., Scott, J.G. (2010). A review of the interactions between multiple insecticide resistance loci. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 97*(2), 123-128.

Hargreaves, K., Koekemoer, L., Brooke, B., Hunt, R., Mthembu, J., Coetzee, M. (2000). *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology, 14*(2), 181-189.

Hemingway, J., Field, L., Vontas, J. (2002). An overview of insecticide resistance. *Science, 298*(5591), 96-97.

Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology, 34*(7), 653-665.

Higgins, C.F., Linton, K.J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural and Molecular Biology, 11*(10), 918.

Horowitz, A.R., Kontsedalov, S., Ishaaya, I. (2004). Dynamics of resistance to the neonicotinoids acetamiprid and thiamethoxam in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology, 97*(6), 2051-2056.

Horrigan, L., Lawrence, R.S., Walker, P. (2002). How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environmental Health Perspectives, 110*(5), 445.

Hossain, M.M., Richardson, J.R. (2011). Mechanism of pyrethroid pesticide–induced apoptosis: role of Calpain and the ER stress pathway. *Toxicological Sciences, 122*(2), 512-525.

IRAC. http://www.irac-online.org/search/s=insecticide+resistance/. Erişim tarihi: 20.05.2018

Ishaaya, I., Kontsedalov, S., Horowitz, A.R. (2005). Biorational insecticides: Mechanism and cross-resistance. *Archives of Insect Biochemistry And Physiology, 58*(4), 192-199.

Jackson, L.A., Spach, D.H. (1996). Emergence of Bartonella quintana infection among homeless persons. *Emerging Infectious Diseases, 2*(2), 141.

Jensen, H.R., Scott, I.M., Sims, S., Trudeau, V.L., Arnason, J.T. (2006). Gene expression profiles of *Drosophila melanogaster* exposed to an insecticidal extract of Piper nigrum. *J Agric Food Chem, 54*(4), 1289-1295.

Jeschke, P., Nauen, R. (2005). Neonicotinoid insecticides. *Pest Management Science*, 64(11), 1084-1098.

Jones, R.T., Bakker, S.E., Stone, D., Shuttleworth, S.N., Boundy, S., McCart, C., van den Elsen, J. M. (2010). Homology modelling of Drosophila cytochrome P450 enzymes associated with insecticide resistance. *Pest Management Science, 66*(10), 1106-1115.

Kalinina, E., Chernov, N., Novichkova, M. (2014). Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Moscow), 79*(13), 1562-1583.

Karataş, A., Bahçeci, Z. (2009). Cypermethrin'in *Drosophila melanogaster*'de ergin bireylerin morfolojisi ve eşey oranina etkisi. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* (019), 1-14.

Kartner, N., Ling, V. (1983). Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science, 221*(4617), 1285-1288.

Keppler, D. (2011). Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handbook of Experimental Pharmacology* In *Drug Transporters* (pp. 299-323). Heidelberg: Springer

Kimantas, J. (2013). The Facts About Neonicotinoids. *Alternatives Journal Canada's Environmental Voice, November,2013*.

Kizlinski, M.L., Orwig, D.A., Cobb, R.C., Foster, D.R. (2002). Direct and indirect ecosystem consequences of an invasive pest on forests dominated by eastern hemlock. *Journal of Biogeography, 29*(10-11), 1489-1503.

Kristensen, M., Jespersen, J.B. (2008). Susceptibility to thiamethoxam of *Musca domestica* from Danish livestock farms. *Pest Management Science, 64*(2), 126-132.

Krogstad, D.J. (1996). Malaria as a reemerging disease. *Epidemiologic Reviews, 18*, 77-89.

Leslie, E.M. (2012). Arsenic-glutathione conjugate transport by the human multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs). *Journal of Inorganic Biochemistry, 108*, 141-149.

Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl pharmacol, 204*(3), 216-237.

Li, D., Huang, Q., Lu, M., Zhang, L., Yang, Z., Zong, M., Tao, L. (2015). The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere, 135*, 387-393.

Licht, A., Schneider, E. (2011). ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions. *Central European Journal of Biology, 6*(5), (pp. 785-801).

Limón-Pacheco, J., Gonsebatt, M.E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 674*(1), 137-147.

Lindsley, D.L., Zimm, G.G. (2012). The Genome of *Drosophila melanogaster*. (pp. 47-184). Kaliforniya: Academic Press.

Liu, N., Li, M., Gong, Y., Liu, F., Li, T. (2015). Cytochrome P450s–Their expression, regulation, and role in insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 120*, 77-81.

Liu, S., Zhou, S., Tian, L., Guo, E., Luan, Y., Zhang, J., Li, S. (2011). Genome-wide identification and characterization of ATP-binding cassette transporters in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics, 12*(1), 491.

Liu, W., Feng, Q., Li, Y., Ye, L., Hu, M., Liu, Z. (2012). Coupling of UDP-glucuronosyltransferases and multidrug resistance-associated proteins is responsible for the intestinal disposition and poor bioavailability of emodin. *Toxicol APPl Pharmacol, 265*(3), 316-324.

Mannervik, B. (1985). The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 57*, 357-417.

Marrs, T.C. (2012). *Mammalian toxicology of insecticides*: Royal Society of Chemistry.

Matsumura, F. (2012). *Toxicology of insecticides*: Springer Science Business Media.

Meslin, F. (1997). Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. *Emerging infectious diseases, 3*(2), 223.

Meyer, F., Flötenmeyer, M., Moussian, B. (2013). The sulfonylurea receptor Sur is dispensable for chitin synthesis in *Drosophila melanogaster* embryos. *Pest Management Science, 69*(10), 1136-1140.

Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Piton, A., Theret, N., Coles, B., Guillouzo, A. (2004). Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *Journal of Biological Chemistry, 279*(16), 16246-16253.

Morgan, T.H., Bridges, C.B. (1916). *Sex-linked inheritance in Drosophila*: Carnegie institution of Washington.

Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R.M., Grafius, E.J., Moyer, D.D. (2006). Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say)(Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Management Science, 62*(1), 30-37.

Motohiro, T. (2000). Insect nicotinic acetylcholine receptors: mode of action of insecticide and functional architecture of the receptor. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology, 44*(1), 1-15.

Muller, H.J. (1928). The production of mutations by X-rays. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 14*(9), 714-726.

Narahashi, T. (1996). Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology, 79*(1), 1-14.

Nauen, R. (2007). Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science, 63*(7), 628-633.

NCBI. (2018). NCBI https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/36316. Erişim tarihi 02.07.2018.

Nkya, T.E., Akhouayri, I., Kisinza, W., David, J.P. (2013). Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology, 43*(4), 407-416.

Omura, T., Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *Journal of Biological Chemistry, 239*(7), 2370-2378.

Ong, C., Yung, L.Y.L., Cai, Y., Bay, B.H., Baeg, G.H. (2015). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology, 9*(3), 396-403.

Orwig, D.A. (2002). Ecosystem to regional impacts of introduced pests and pathogens: historical context, questions and issues. *Journal of Biogeography, 29*(10-11), 1471-1474.

Owusu, H.F., Chitnis, N., Müller, P. (2017). Insecticide susceptibility of Anopheles mosquitoes changes in response to variations in the larval environment. *Scientific Reports, 7*(1), 3667.

Öztürk, E., Kahveci, N., Özlük, K., Yılmazlar, T. (2009). Isı şok proteinleri. *Turkish Journal of Surgery/Ulusal Cerrahi Dergisi, 25*(4).

Panini, M., Manicardi, G.C., Moores, G., Mazzoni, E. (2016). An overview of the main pathways of metabolic resistance in insects. *Invertebrate Survival Journal, 13*, 326-335.

Pavlidi, N., Khalighi, M., Myridakis, A., Dermauw, W., Wybouw, N., Tsakireli, D., Van Leeuwen, T. (2017). A glutathione-S-transferase (TuGSTd05) associated with acaricide resistance in *Tetranychus urticae* directly metabolizes the complex II inhibitor cyflumetofen. *Insect Biochemistry and Molecular Biology, 80*, 101-115.

Pavlidi, N., Vontas, J., Van Leeuwen, T. (2018). The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. *Current Opinion in Insect Science, 27*, 97-102.

Perry, T., Batterham, P., Daborn, P.J. (2011). The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochem Mol Biol, 41*(7), (pp. 411-422). Viktorya: Avustralya.

Picollo, M.I., Vassena, C., Orihuela, P.S., Barrios, S., Zaidemberg, M., Zerba, E. (2005). High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *Journal of Medical Entomology, 42*(4), (pp. 637-642). Huddersfield: İngiltere.

Pittendrigh, B.R., Margam, V.M., Walters Jr, K.R., Steele, L.D., Olds, B.P., Sun, L., Clark, J.M. (2014). Chapter 3 - Understanding Resistance and Induced Responses of Insects to Xenobiotics and Insecticides in the Age of "Omics" and Systems Biology. In *Insect Resistance Management (Second Edition)* (pp. 55-98). San Diego: Amerika..

Puinean, A.M., Foster, S.P., Oliphant, L., Denholm, I., Field, L.M., Millar, N.S., Bass, C. (2010). Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLOS Genetics, 6*(6), e1000999.

Rand, M.D. (2010). Drosophotoxicology: the growing potential for Drosophila in neurotoxicology. *Neurotoxicology and Teratology, 32*(1), (pp. 74-83).

Ranson, H., Hemingway, J. (2005). Mosquito glutathione transferases. *Methods in enzymology, 401*, (pp 226-241). Kaliforniya: Amerika

Rees, D.C., Johnson, E., Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nature reviews Molecular Cell Biology, 10*(3), (pp. 218). İngiltere.

Robinson, P. (2001). Evaluation of the new active thiamethoxam in the product Cruiser 350 FS insecticide seed treatment. *National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals, Australia*.

Roth, C.W., Holm, I., Graille, M., Dehoux, P., Rzhetsky, A., Wincker, P., Brey, P.T. (2003). Identification of the *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter superfamily genes. *Molecules and Cells, 15*(2), (pp. 150-158). Seul: Kore.

Samra, A.I., Kamita, S.G., Yao, H.W., Cornel, A.J., Hammock, B.D. (2012). Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from pyrethroid-resistant *Culex pipiens*. *Pest Management Science, 68*(5), (pp. 764-772). New York: Amerika.

Sanders, E., Borus, P., Ademba, G., Kuria, G., Tukei, P., LeDuc, J. (1996). Sentinel surveillance for yellow fever in Kenya, 1993 to 1995. *Emerging Infectious Diseases, 2*(3), 236.

Sarfraz, M., Dosdall, L., Keddie, B. (2005). Evidence for behavioural resistance by the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Journal of applied Entomology, 129*(6), 340-341.

Sau, A., Pellizzari Tregno, F., Valentino, F., Federici, G., Caccuri, A.M. (2010). Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 500*(2), 116-122.

Sawicki, R., Singh, S.P., Mondal, A.K., Beneš, H., Zimniak, P. (2003). Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Delta-class (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the Epsilon class. *Biochemical Journal, 370* (2), 661-669.

Schinkel, A.H., Jonker, J.W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews, 55*(1), 3-29.

Schinkel, A.H., Mol, C.A. A.M., Wagenaar, E., van Deemter, L., Smit, J.J.M., Borst, P. (1995). Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice. *European Journal of Cancer, 31*(7), 1295-1298.

Schowalter, T.D. (2016). Chapter 17 - Management of Insect Populations. In *Insect Ecology (Fourth edition)* (pp. 565-595). San diego: Amerika

Seifert, J., Scott, J.G. (2002). The CYP6D1v1 allele is associated with pyrethroid resistance in the house fly, *Musca domestica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 72*(1), 40-44.

Sharma, D., Singh, M.P., Vimal, D., Kumar, S., Jha, R.R., Chowdhuri, D.K. (2018). Benzene induced resistance in exposed *Drosophila melanogaster*: Outcome of improved detoxification and gene modulation. *Chemosphere, 201*, 144-158.

Sheikh, A.A., Rehman, N., Kumar, R. (2017). Diverse adaptations in insects: A Review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(2): 343-350

Shinde, A., Ganu, J., Naik, P. (2012). Effect of free radicals antioxidants on oxidative stress: a review. *Journal of Dental and Allied Sciences, 1*(2), 63.

Soderlund, D., Knipple, D. (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33*(6), 563-577.

Sparks, T.C., DeBoer, G.J., Wang, N.X., Hasler, J.M., Loso, M.R., Watson, G.B. (2012). Differential metabolism of sulfoximine and neonicotinoid insecticides by *Drosophila melanogaster* monooxygenase CYP6G1. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 103*(3), 159-165.

Sparks, T.C., Nauen, R. (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 121*, 122-128.

Strycharz, J.P., Lao, A., Li, H., Qiu, X., Lee, S. H., Sun, W., Clark, J.M. (2013). Resistance in the highly DDT-resistant 91-R strain of *Drosophila melanogaster* involves decreased penetration, increased metabolism, and direct excretion. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 107*(2), 207-217.

Sturm, A., Cunningham, P., Dean, M. (2009). The ABC transporter gene family of *Daphnia pulex*. *BMC Genomics, 10*(1), 170.

Sun, H., Pu, J., Chen, F., Wang, J., Han, Z. (2017). Multiple ATP-binding cassette transporters are involved in insecticide resistance in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *Insect Molecular Biology, 26*(3), 343-355.

Tarnay, J., Szeri, F., Ilias, A., Annilo, T., Sung, C., Le Saux, O., Robinow, S. (2004). The dMRP/CG6214 gene of Drosophila is evolutionarily and functionally related to the human multidrug resistance-associated protein family. *Insect Molecular Biology, 13*(5), 539-548.

Taxonomy, U. (2018). https://www.uniprot.org/taxonomy/118510. Erişim tarihi: 15.07.2018.

Thuyet, D.Q., Jorgenson, B.C., Wissel-Tyson, C., Watanabe, H., Young, T.M. (2012). Wash off of imidacloprid and fipronil from turf and concrete surfaces using simulated rainfall. *Science of the Total Environment, 414*, 515-524.

Tijet, N., Helvig, C., Feyereisen, R. (2001). The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene, 262*(1), 189-198.

Tomizawa, M., Casida, J.E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 45*, 247-268.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal Of Biochemistry Cell Biology, 39*(1), 44-84.

Vontas, J.G., Graham, J., Hemingway, J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal, 357*(1), 65-72.

Wakeling, E.N., Neal, A.P., Atchison, W.D. (2012). Pyrethroids and their effects on ion channels. In *Pesticides-Advances in Chemical and Botanical Pesticides*: InTech. doi: 10.5772/50330

Waters, L.C., Zelhof, A.C., Shaw, B.J., Ch'ang, L.Y. (1992). Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 89*(11), 4855-4859.

Way, M. (1954). The effect of body weight on the resistance to insecticides of the last-instar larva of *Diataraxia oleracea* L., the tomato moth. *Annals of Applied Biology, 41*(1), 77-87.

Wei, B., Mohan, K.R., Weisel, C.P. (2012). Exposure of flight attendants to pyrethroid insecticides on commercial flights: urinary metabolite levels and implications. *International Journal Of Hygiene And Environmental Health, 215*(4), 465-473.

Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology, 1*(6), reviews3003. 3001.

Whitehorn, P.R., O'connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 1215025.

Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A., Devonshire, A.L. (1996). Identification of mutations in the houseflypara-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Molecular and General Genetics MGG, 252*(1-2), 51-60.

Willoughby, L., Batterham, P., Daborn, P.J. (2007). Piperonyl butoxide induces the expression of cytochrome P450 and glutathione S-transferase genes in *Drosophila melanogaster*. *Pest Management Science, 63* (8), 803-808.

Wilson, T.G. (1988). *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): a model insect for insecticide resistance studies. *Journal of Economic Entomology, 81*(1), 22-27.

Wu, C.T., Budding, M., Griffin, M.S., Croop, J.M. (1991). Isolation and characterization of Drosophila multidrug resistance gene homologs. *Molecular and Cellular Biology, 11*(8), 3940-3948.

Xie, X., Cheng, T., Wang, G., Duan, J., Niu, W., Xia, Q. (2012). Genome-wide analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family in the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Biology Reports, 39*(7), 7281-7291.

Xu, C., Li, C.Y.T., Kong, A.N.T. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research, 28*(3), 249.

Xu, W., Liu, S., Zhang, Y., Gao, J., Yang, M., Liu, X., Tao, L. (2017). Cypermethrin resistance conferred by increased target insensitivity and metabolic detoxification in *Culex pipiens* pallens Coq. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 142*, 77-82.

Yaicharoen, R., Kiatfuengfoo, R., Chareonviriyaphap, T., Rongnoparut, P. (2005). Characterization of deltamethrin resistance in field populations of *Aedes aegypti* in Thailand. *Journal of Vector Ecology*, *30*(1), 144.

Yamamoto, K., Yamada, N. (2016). Identification of a diazinon-metabolizing glutathione S-transferase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Scientific Reports*, *6*, 30073.

Ek

Kimyasal Sarf Ve Diğer Malzemeler

MALZEME ADI	**MARKA**	**KOD NUMARASI**	**ŞİRKET İSMİ /ÜLKE**
Agar agar	ZAG	9002-18-0	Bereket Kimya Tıp Teknik, TÜRKİYE
Ortho-Phosphoric acid	TEKKİM	TK.14036002501	Tekkim Kimya, TÜRKİYE
Propionic acid	MERCK	8006052500	Merck KGaA Darmstadt, ALMANYA
Ethanol	EMSURE	1009832511	Merck KGaA Darmstadt, ALMANYA
Deltamethrin (K-Othrine SC 50)	K-Othrine	52918635	Bayer, ALMANYA
Thiamethoxam (AGİTA 10 WG)	AGITA	153719234	Novartis Animal Health, Elanco US
2-Merkaptoethanol	SIGMA	M3148	Sıgma-Aldrich, ALMANYA
RNA izolasyon kiti (RNA Mini Kit)	PureLink	1920882	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	283900	Life Technologies, USA
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	1802568	Life Technologies, USA

384 Kuyucuklu PCR plak	Applied Biosystems	4309849	Life Technologies, USA
PCR Strip Tüpleri (0,2 ml)	Thermo Scientific	441100	Thermo scientific, UK
2 ml' lik Tüp	Eppendorf	F169625P	Eppendorf, ALMANYA
1,5 ml' lik Tüp	Eppendorf	D158642P	Eppendorf, ALMANYA
15 ml' lik falkon Tüp	ISOLAB	CTPPA1017	Isolab, Wertheim ALMANYA
50 ml' lik falkon Tüp	FIRATMED	8870000019	Fıratmed, TÜRKİYE

ÖZGEÇMİŞ

HATAY ilinin İskenderun ilçesinde 1986 yılında doğdum. İlk ve orta öğrenimimi İskenderun'da, lise öğrenimimi İstanbul'da tamamladım. Lise öğrenimimle birlikte 8 yıl kuyumculuk yaptım. 2014'de Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden mezun oldum. 2015'de Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım ve devam etmekteyim.

BİLİMSEL FAALİYETLER

SCI-SSCI veya SCI Expanded Kapsamındaki Yayınlar;

Z.B. Doğanlar, O. Doğanlar, H. Tozkir, F.D. Gökalp, A. Doğan, F. Yamaç, O.O. Aşkın, Ü.E. Aktaş, *Exposure of Agricultural Area Residents to Pesticides: Pesticide Accumulation and Evaluation of Genotoxicity*, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, (2018).

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler;

F. Yamaç, O. Doğanlar, *The Role of ABC transporter protein genes in the insecticide resistance against to Deltamethrin in Drosophila melanogaster adults*, International Agricultural, Biological Life Science Conference, 2-5 September, Edirne, Turkey, (2018).

Bilimsel Araştırma Projeleri;

İpsala Bölgesinde Monokültür Çeltik Tarımının Doğa ve İnsanlar Üzerine Genotoksik Etkileri, Yardımcı Araştırmacı, TÜBİTAK Proje No: 214Z056