



**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YAPAY VE YARI YAPAY ALANLARDA YAYILIM
GÖSTEREN *Culex pipiens* KOMPLEKS TÜRLERİNDE
GÖZLENEN KDR VE ACE DİRENCİ**

(Doktora Tezi)

Elif KILIÇARSLAN

**Danışman
Doç. Dr. Muhammet Mustafa AKINER**

**RİZE
2023**

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında, Doç. Dr. Muhammet Mustafa AKINER danışmanlığında, Elif KILIÇARSLAN tarafından hazırlanan *Yapay ve Yarı Yapay Alanlarda Yayılım Gösteren Culex pipiens Kompleks Türlerinde Gözlenen KDR ve ACE Direnci* adlı bu tez çalışması, 31/01/2023 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği/oy çokluğuyla başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı, Adı Soyadı

İmza

Başkan :

Prof. Dr. Ahmet Mutlu GÖZLER

Üye:

Prof. Dr. Fatih Ş. BERİŞ

Üye:

Doç. Dr. M. Mustafa AKINER

Üye:

Dr. Öğretim Üyesi Hilal BEDİR

Üye:

Dr. Öğretim Üyesi Fatma KOÇBAŞ

ETİK BEYAN

Biyoloji Doktora Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “Yapay ve Yarı Yapay Alanlarda Yayılım Gösteren *Culex pipiens* Kompleks Türlerinde Gözlenen *KDR* ve *ACE* Direnci” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve/veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim. 31 /01/2023

Elif KILIÇARSLAN

ÖN SÖZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programında hazırlanan bu çalışma ile ülkemizde ve dünyada yaygın olarak dağılım gösteren *Culex pipiens* kompleks türlerinde yoğun insektisit kullanımına bağlı olarak gelişen insektisit direncinin moleküler temeli araştırılarak, alınacak önlemlere ışık tutması amaçlanmıştır. Batı Nil Virüsü, Rift vadisi ateşi, Chikungunya gibi pek çok hastalığın vektörlüğünü yapan *Culex pipiens* kompleks türlerinin frekans ve dağılımının bu hastalıkların insanlara bulaşması yönüyle kontrol altında tutulması gerekmektedir. Bu nedenle ülkemizde farklı bölgelerde en çok karşılaşılan moleküler direnç mekanizmalarından olan *kdr* (Knock Down direnci) ve *ace* (Asetilkolinesteraz) direncinin varlığı araştırılmış ve genetik değişimi incelenerek olası bir kontrol sürecinde ortaya çıkacak problemlerin doğru yöntemlerle giderilmesi amaçlanmıştır.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam sürecinde benden desteğini esirgemeyen, her seferinde bana ilham veren, yol gösteren ve çalışma azmimi artıran çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. M. Mustafa AKINER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca laboratuvar çalışmalarımda yanımda olarak bana destek olan arkadaşım Murat Öztürk'e ve hayatım boyunca her zaman daha iyisini başarabilmem için bana imkan veren aileme çok teşekkür ederim.

Ayrıca değerli jüri üyesi hocalarıma bana verdikleri desteklerden ve tezime katkılarından ötürü çok teşekkür ederim.

Elif KILIÇARSLAN

2023/RİZE

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYAN.....	II
ÖN SÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. <i>Culex pipiens</i> Tür Kompleksi Türleri	3
1.2. <i>Culex pipiens</i> Kompleks Türlerinin Biyo-Ekolojisi	4
1.3. <i>Culex pipiens</i> Kompleksinin Coğrafi Dağılımı	7
1.4. <i>Culex pipiens</i> 'in Vektörel Önemi	7
1.5. Sivrisinek Mücadelesinde Kullanılan Kimyasal Mücadele Ajanları	9
1.5.1 Organoklorlu İnsektisitler.....	9
1.5.2 Organofosforlu İnsektisitler	10
1.5.3. Karbamat Grubu İnsektisitler	11
1.5.4. Piretroid Grubu İnsektisitler	11
1.5.5. Böcek Büyüme Düzenleyicileri.....	12
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	13
3. YAPILAN ÇALIŞMALAR	16
3.1. Örneklerin Toplanması ve Alan Özelliklerinin Belirlenmesi	16
3.2. Toplanan Örneklerin Laboratuvara Getirilmesi ve Saklama Koşulları	18
3.3. Laboratuvar Çalışmaları.....	19
3.3.1. Morfolojik Tür Tayini	19
3.3.2. DNA İzolasyonu.....	20
3.3.3. Moleküler Doğrulama	21

3.3.4. Hedef Gen Bölgesi Mutasyon Taramaları.....	22
3.3.4.1. <i>kdr</i> Mutasyon Taraması	22
3.3.4.2. <i>ace-1</i> Direnci Mutasyon Taraması.....	24
3.3.4.2.1. F290V Mutasyonu.....	24
3.3.4.2.2. G119S Mutasyon Bölgesinin Çoğaltılması.....	25
3.3.5. Veri Analizleri.....	26
4. SONUÇLAR	27
4.1. DDT ve Piretroid Direnç Mutasyonları	27
4.2. Organofosfat/karbamat Direnç Mutasyonları	30
4.3. Mutasyon Kombinasyonları	35
4.4. AMOVA Analizleri	36
5. TARTIŞMA	38
KAYNAKÇA.....	43

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ana Bilim Dalı : Biyoloji

Tez Türü : Doktora

Danışman : Doç. Dr. M. Mustafa AKINER

Hazırlayan : Elif KILIÇARSLAN

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 55

ÖZET

YAPAY VE YARI YAPAY ALANLARDA YAYILIM GÖSTEREN *Culex pipiens* KOMPLEKS TÜRLERİNDE GÖZLENEN *KDR* VE *ACE* DİRENCİ

Culex pipiens L., 1758 (Diptera: Culicidae) dünyadaki en önemli ve hastalık vektörü olan türlerden biridir. Etketif bir kontrol yapılabilmesi için insektisitlere karşı gelişen direncin takip edilmesi büyük öneme sahiptir. Bu çalışmada Türkiye Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde 2020 yılı aktif sezonunda dokuz ilden toplanan *Cx. pipiens* örneklerinde *vgsc* (*kdr* L1014F/C) ve *ace-1* (G119S, F290V) spesifik bölgelerinde direnç ile ilgili mutasyonların varlığı araştırılmıştır. *kdr* için, her bölgede L1014F mutasyonu belirlenirken, duyarlı ve dirençli tip aleller için üç farklı sessiz mutasyon tespit edilmiş olup çalışılan popülasyonların hiçbirinde L1014C mutasyonu saptanmamıştır. *ace-1* bölgesi için, çalışılan popülasyonlarda F290V değişimi heterozigot genotipte ve düşük oranlarda saptanırken, G119S değişimi daha yaygın bulunmuştur. *ace-1* bölgesi için G119I (6 popülasyon) ve G119N (5 popülasyon) değişimleri ilk defa tespit edilmiştir. Dirence neden olan mutasyon tiplerinde yapay ve tarımsal alanlar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Anahtar Kelimeler: *ace-1* direnci, *Culex*, insektisit direnci, *kdr* direnci

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies

Department : Biology

Thesis Type : Doctoral Thesis

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. M. Mustafa AKINER

Author : Elif KILIÇARSLAN

Year : 2023

Pages : 55

ABSTRACT

KDR AND ACE RESISTANCE OBSERVED IN *Culex pipiens* COMPLEX SPECIES DISTRIBUTING IN ARTIFICIAL AND SEMI- ARTIFICIAL AREAS

Culex pipiens L., 1758 (Diptera: Culicidae) is one of the most important pests and disease vectors in the world. It is of major importance to monitor the development of insecticide resistance in order to effectively control. This study investigated the presence of mutations in specific loci of the *vgsc* (*kdr* L1014F/C) and *ace-1* (G119S, F290V) gene, associated with insecticide resistance in *Culex pipiens* collected from nine provinces in central and eastern Black Sea Region of Türkiye in the 2020 active season. For *kdr*, L1014F mutation was determined for each region with three different silent mutations for wild and resistant type alleles, while L1014C was not recorded in any of the analyzed populations. For *ace-1*, substitution F290V was detected at a low frequency in heterozygosity, while G119S was more widespread, in the analyzed populations. For *ace-1*, G119I (6 populations) and G119N (5 populations) substitution was firstly described. Types of mutations differences related to the resistance between artificial sites and agricultural fields were not significantly different.

Keywords: *ace-1* resistance, *Culex*, insecticide resistance, *kdr* resistance

KISALTMALAR

<i>ace</i>	:	Asetilkolin Esteraz
AMOVA	:	Moleküler Varyans Analizi
An.	:	Anopheles
Bç (bp)	:	Baz çifti
CB	:	Karbamat
Cx.	:	<i>Culex</i>
DDT	:	Dikloro Difenol Trikloroethan
dH ₂ O	:	Distile su
dk	:	dakika
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
ECDC	:	Avrupa Hastalık Kontrol Merkezi
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
EVS	:	Ensefalit Vektör Araştırması
g	:	Gravite
GPS	:	Küresel Konumlama Sistemi
<i>kdr</i>	:	Knockdown Direnç (Devrilme Direnci)
L.	:	Linnaeus
µg	:	Mikrogram
MgCl ₂	:	Magnezyum klorür
µL	:	Mikrolitre
mL	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
ng	:	Nanogram
nM	:	Nanometre
OP	:	Organofosfatlar
PZR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	:	Ribonükleik Asit
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
TAE	:	Tris Asetat EDTA

<i>Taq</i>	:	<i>Thermus aquaticus</i>
TEPP	:	Tetra etil pirofosfat
U	:	Ünite
<i>Vgsc</i>	:	Voltaja duyarlı sodyum kanal proteini geni
VAF	:	Varyant alel frekansları
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü
⁰ C	:	Santigrat Derece



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Sivrisinek toplama alanları ve özellikleri	17
Tablo 2. <i>Culex pipiens</i> 'te PASA yöntemine göre L1014 <i>kdr</i> mutasyonu için genotip ve varyant alel frekansları, Hardy-Weinberg dengesi (χ^2) ve P değerleri.....	28
Tablo 3. PASA yöntemine göre <i>Cx. pipiens</i> kompleksinde F290 <i>ace-1</i> mutasyonu için genotip ve varyant alel frekansları Hardy-Weinberg dengesi (χ^2) ve P değerleri	32
Tablo 4. Sekans verilerine göre <i>Cx. pipiens</i> 'te G119 <i>ace-1</i> mutasyonu için genotip ve varyant alel frekansları (VAF) Hardy-Weinberg dengesi (χ^2) ve P değerleri.....	34
Tablo 5. <i>kdr</i> L1014F ve <i>ace-1</i> G119S, F290V mutasyon sitelerindeki kodon kombinasyonları ve bunların frekansları	36
Tablo 6. <i>Culex pipiens</i> L1014F ve F290V, G119S mutasyonlarının iki grubunun (yapay alanlar ve tarım alanları) Moleküler Varyans Analizi (AMOVA).....	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Örnek toplama alanları	17
Şekil 2. <i>Culex pipiens</i> kompleks tür teşhisinde kullanılan ana karakterler	20
Şekil 3. Örneklerden elde edilen <i>ace-2</i> ye ait jel görüntüleri	22
Şekil 4. <i>kdr</i> gen bölgesinin yerleşimi ve agaroz jel elektroforezi görüntüsü	23
Şekil 5. <i>ace-1</i> F290V gen bölgesinin yerleşimi ve agaroz jel elektroforezi görüntüsü	25
Şekil 6. <i>Culex pipiens</i> 'te PASA yöntemine göre L1014 <i>kdr</i> mutasyonu dağılımları	29
Şekil 7. <i>kdr</i> taraması amacıyla yapılmış olan PZR sonucunun %1,5'luk agaroz jel elektroforezi örnek görüntüsü	29
Şekil 10. <i>Culex pipiens</i> 'te PASA yöntemine göre F290 <i>kdr</i> mutasyonu dağılımları.	33

GİRİŞ

Sivrisinekler tıpkı diğer kan emen atropodlar gibi yumurtalarını olgunlaştırmak için kana ihtiyaç duyarlar ve bunu insan ve/veya hayvan gibi çeşitli konakları kullanarak elde eden vektör organizmalardır (Mehlhorn vd., 2012). Vektörel hastalıkların etkinliği düşünüldüğünde sivrisinekler, dünya genelinde entomolojik araştırmaların merkezinde ilk sıralarda yer almaktadır (Becker vd., 2010). Sivrisinekler tarafından bulaştırılan hastalık etkenleri; viruslar, protozoonlar ve filarial nematodlar olarak karakterize edilir. Sivrisinekler, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden ve çoğunlukla ciddi sosyal ve ekonomik kayıplara yol açan sıtma, Japon Ensefaliti, La Crosse Ensefaliti, St. Louis Ensefaliti, Batı Nil Virusu, Batı At Ensefaliti, Deng Virusu, Rift Vadisi Ateşi, Sarı Humma, Murray Vadisi Ensefaliti, O'Nyong-nyong, Ross Nehri Virusu, Çikunguya, Sindbis ve Filariasis gibi ciddi hastalıkların geçişinde vektör olarak işlev görürler. Ayrıca sivrisineklerin tularemi etkeni *Francisella tularensis* ve şarbon etkeni *Bacillus anthracis*'i de bulaştırdığı bildirilmiştir (CHPPM, 2022)¹. Dişi sivrisineklerin hastalık etkenlerini nakledebilmesi için en az bir yumurtlama döngüsünü tamamlanması ve tekrar kan emmesi gerekir (Bentley vd., 1989). Kan, genellikle memeli hayvanlar ve kuşlardan emilir; fakat birkaç sivrisinek türü düzenli olarak kurbağa ya da sürüngenler üzerinden de beslenir. Bazı türler ise hem kuşlardan hem de memeli hayvanlardan kan emeler (Alten, 1991; Snow, 1990). Kan emme davranışı ile sivrisineklerin dünyada her yıl yaklaşık 70 milyondan fazla insana hastalık etkenini bulaştırdığı bilinmektedir. Bundan dolayı sivrisinekler dünya genelinde, küresel olarak halk sağlığı üzerinde ciddi bir problem oluşturmaktadır (Fradin, 1998).

Arbovirus enfeksiyonları yeni milenyumda dünyanın yüzleştği çok önemli halk sağlığı problemleri arasındadırlar. Uluslararası arbovirus kataloğunda kayıtlı 520'den fazla arbovirus vardır ve bunların yaklaşık 100 tanesinin insanları enfekte ettiği bilinmektedir (Woodbridge vd., 2002). Son dönemlerde insan popülasyonlarının çok hızlı bir şekilde büyümesi ve taşımacılık sistemlerinin gelişimi ile tüm dünya coğrafyası küresel bir şekilde birbiriyle bağlantı içine girmiştir. Bu hızlı büyüme ve

¹ <http://chppm-www.apgea.army.mil/ento/FACTS/Tularemia.pdf>, US Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine (Son erişim tarihi: 20.05.2022)

taşımacılık sonucunda biyocoğrafik bariyerler kırılmış, türler yeni habitatlara girmeye başlamıştır. Ticaret ve seyahatin meydana getirdiği bu küreselleşme sonucu yeni alanlara taşınan türlerden birçoğu da insanlar, hayvanlar ve yaban hayatı üzerinde ciddi sağlık sorunlarına yol açan patojenler olarak yeni habitatlarda varlıklarını korumaktadırlar. Sivrisinekler, Flavivirus, Phlebovirus ve Alphavirus genuslarına ait çok fazla sayıda arbovirusün taşınmasında sebep olurlar. Flavivirusler insan patojenlerini de içeren batı nil virusü (BNV), deng virusü (DENV) ve japon ensefalit virusü (JE) gibi 70'den fazla virus türü içerirler (Kuno vd., 1998). Alphavirusler de yakın zamanda güney Avrupa'ya girmiş ve İtalya ve Fransa 'da yerli insan bulaşımına neden olmuş tıbbi önemi olan chikungunya virusünü içerirler (Rezza vd., 2007; Gould vd., 2010). Türkiye'de ise yapılan çalışmalar birçok önemli arbovirusün varlığını ortaya çıkarmıştır. Asya, Avrupa ve Amerika'da yoğun şekilde enfeksiyona ve ölümlere sebep olan BNV ülkemizde de ortaya çıkmıştır (Kalaycıoğlu vd., 2011). Diğer taraftan BNV vektörleri olabilen ve son yıllarda ülkemizdeki popülasyonlarının ortadan kalktığı düşünülen *Aedes aegypti* ile ülkemizde daha önce varlığı bildirilmemiş olan *Ae. albopictus* türlerinin 2015 yılından itibaren Karadeniz Bölgesi'nde hızla yayıldığı ve yerel popülasyonlar oluşturduğu da belirlenmiştir (Özkul vd., 2006; Ergünay vd., 2013; Akıner vd., 2016; 2019). Ayrıca sivrisinek türlerinin yayılış alanı tropik ve subtropik bölgelerde 120 milyon insanın *Wuchereria bancrofti* ile enfekte olduğu bilinmektedir (WHO, 2004)² ve sadece sıtma hastalığı her yıl milyonlarca insanın hayatını etkilemektedir (WHO, 2017)³. Dünya sağlık Örgütü (DSÖ) raporlarına göre dünyadaki sıtma vakalarının %80'i 15 Afrika ülkesinden bildirilmiştir, vakaların %50'si Nijerya, Kongo Cumhuriyeti, Mozambiya ve Hindistan gibi tropikal ülkelerde meydana gelmektedir. Ayrıca 2016 yılına kadar Ermenistan, Azerbeycan, Gürcistan, Kırgızistan, Kazakistan, Rusya, Türkmenistan, Tacikistan, Türkiye ve Özbekistan'da sıtma vakaları aralıklı olarak rapor edilmiştir (WHO, 2018)⁴.

² https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68729/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2004.8.pdf (Son erişim tarihi: 20.05.2022)

³ <https://reliefweb.int/report/world/world-malaria-report-2017> (Son erişim tarihi: 25.06.2022)

⁴ <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565653> (Son erişim tarihi: 12.05.2022)

1. GENEL BİLGİLER

1.1. *Culex pipiens* Tür Kompleksi Türleri

Sivrisinekler, Arthropoda şubesi, Insecta sınıfı, Diptera takımında yer alan Culicidae familyası içerisinde incelenmektedir. Culicidae uzun antenli, uzun ince bacaklı, larva ve ergin abdomeninde 10 segmentin sayılabildiği sineklerin yer aldığı, Nematocera alttakımı içerisinde yer alır (Becker vd., 2003). Culicidae familyası Anophelinae, Culicinae ve Toxorhynchitinae olmak üzere üç alt familyaya ayrılır. İnsan sağlığı açısından en önemli gruplar Anophelinae ve Culicinae içerisinde bulunmaktadır (Eldridge, 2005). Son araştırmalara göre sivrisinekler 485 tür Anophelinae ve 3061 tür Culicinae alt familyalarında bulunan cinslerde tespit edilmiş olup toplam 3546 tür ile temsil edilmektedir (Harbach ve Kitching, 2015). Türkiye’de ise Anopheles (11), Aedes (25), Culiseta (5), Coquillettidia (2), Culex (15), Orthopodomyia (1) ve Uranotaenia (1) cinsine ait toplam 60 türden oluştuğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca *An. hyrcanus* var. *pseudopictus* ve *Cx. pipiens* f. *molestus*’un da listeye eklenmesi durumunda bu sayı 62’ye çıkmaktadır (Günay 2015).

Türkiye’de *Cx. pipiens*, ülkemizde geniş dağılıma sahip bir türdür (Aldemir, 2003). Biyolojik toleransı yüksek olan bu türün hemen her türlü tatlı su habitatında larvaları bulunabilmektedir ve diğer sivrisinek türleri ile aynı sucul habitatı paylaşabilmektedir (Boşgelmez vd., 1995). *Cx. pipiens* kompleks türleri dünya genelinde *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pallens*, *Cx. australicus* ve *Cx. globosus* 5 tür ile temsil edilir. Bu kompleks türler içerisinde *Cx. pipiens* dünya genelinde yaygın bir dağılıma sahiptir, kutup daireleri dışında her anakarada bulunur. *Culex pipiens* davranışsal ve yaşam alanı açısından farklılık gösteren *pipiens* ve *molestus* olmak üzere iki farklı biyotip oluşturmuştur (Becker, 2003). Bu iki biyotipin tür ayrımı morfolojik olarak imkânsızdır, bu nedenle tür ayrımlarında moleküler yöntemler kullanılır. Ancak, bu iki türün habitat tercihleri ve yumurta bırakma davranışları dikkate alındığında morfolojik tür ayrımları mümkün olabilmektedir. Örneğin, *pipiens* biyotipi habitat olarak daha çok açık alanları tercih ederken, *molestus* biyotipi daha çok kapalı alanları tercih eder. Beslenme davranışlarında *molestus* biyotipi yumurta bırakmak için kan emmeye ihtiyaç duymaz, ancak *pipiens* biyotipi

ilk yumurta bırakma sırasında kan emmeye ihtiyaç duyar. Bununla birlikte, bu iki biyotipin hibrit bireyleri de bulunmaktadır (Bahnck ve Fonseca, 2006).

Culex quinquefasciatus genel olarak ekvatorial tropik kuşakta yayılım gösteren bir türdür, son yıllarda subtropik alanlarda da varlığı bildirilmiştir. *Culex pallens*, yalnızca Asya kıtasının belli bölgelerinde görülen bir türdür. *Culex australicus* ve *Cx. globosus* türleri Avustralya ve Okyanusya kökenlidirler (Öztürk, 2018). Hatta, kompleks üyelerinin yayılım alanlarının çakıştığı ortamlarda bu türlerin hibrit oluşturdıkları da ortaya çıkmıştır (Farajollahi vd., 2011). Kompleks üyelerinin dışında yer alan *Cx. torrentium*, *Cx. pipiens*'in ikiz türü olarak bilinir. Bu tür morfolojik olarak *Cx. pipiens*'e oldukça benzemekte olup, morfolojik tür ayrımları sadece genital karakterlerle mümkün olabilmektedir. Bu türler arasında davranışsal, konak tür seçimi ve beslenme tercihleri olarak da farklılıklar vardır (Shaikevich, 2004).

1.2. *Culex pipiens* Kompleks Türlerinin Biyo-Ekolojisi

Culex pipiens kompleks türlerinin yaşam döngüleri diğer sivrisineklerde olduğu gibi yumurta, larva, pupa ve ergin yaşam evrelerinden oluşmaktadır. *Culex pipiens* yumurtalarını, durgun su yüzeylerine oval bir sal şeklinde bırakır. Yumurta sallarını da ifade edilen bu yapılar tipik olarak 150-300 arasında yumurta içerir. İlk larvalar çıkıncıya kadar sallar su yüzeyinde yüzer halde kalır. Larvalar 30°C'de bir gün, 20°C'de üç gün ve 10°C'de on gün sonra yumurtadan çıkarlar, sıcaklık 7°C'nin altına düştüğü zaman embriyonik gelişim tamamlanamaz. Larvalar sıcaklığa bağlı olarak birkaç hafta içinde (30 °C'de 6-7 gün, 15 °C'de 21-24 gün) erişkin hale geçerler. Birinci evre larvalar genellikle soluk renkli ya da kahverengidir. Vücudun baş kısmında ağız parçaları, bir çift bileşik göz ve anten bulunur. Larvaların beslenmesinde ağız parçalarındaki yanıl fırçalar sudaki organik maddeleri filtrelemeye yardımcı olur (Foster ve Walker, 2002). Larva antenlerinin uzunluğu baş kısmından daha kısadır. Karın silindirik ve sekiz belirgin bölümden oluşur. Abdomen kısmında yer alan segment III ve IV'teki abdominal setalar genellikle çifttir. Abdomenin son kısmında yer alan uzun ve ince sifon sekizinci abdominal segmentten çıkar (Darsie ve Ward, 2005). Sifon, genellikle orta noktadan da genişliğinden dört ila beş kat daha uzundur. Türün pupa evresi ise tipik olarak diğer sivrisinek türlerinin pupalarına benzer ve virgül benzeri bir şekle sahiptir. Pupa başı ve göğüs kafesi bir sefalotoraksta

kaynaşmıştır ve abdomen bunun altında kıvrılmış halde bulunur (Foster ve Walker, 2002). Pupa evresi beslenmez, ancak sık sık solunum için su yüzeyine çıkar. Erginleşmeden önce pupa koyulaşır ve su yüzeyine çıkarak iç basıncını artırmak için hava yutar ve T şeklinde yırtılarak ergin çıkar. *Culex pipiens* erişkinleri diğer sivrisineklere göre küçük ya da orta boydadır. Erişkin boyutu genel olarak ortam koşullarına, genetik özelliklere, larvanın beslenme durumuna göre değişiklik göstermektedir. Erişkin bireylerin vücut yapısı baş, gövde ve abdomen olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Baş kısmında antenler, kan emme hortumu ve palpler yer alırken, gövde kısmında 3 çift bacak ve 2 çift kanat ve abdomen kısmında sifon ve genital organlar bulunur. *Culex pipiens*'in gövdesi pullarla örtülüdür ve pullar soluk ve açık kahverengidir. Kan emme hortumu koyu renklidir ve antenlerle kabaca aynı uzunluğa sahiptir. Scutum (toraksın dorsal kısmı) kahverengidir ve dar altın- kahverengi pullarla kaplıdır (Carpenter ve La Casse, 1974). Her abdominal segment, dorsa-lateral olarak iki noktada daralmış bazal soluk bantlara sahiptir. Karın tepe noktası sırttan bakıldığında açık bir şekilde yuvarlaktır (Darsie ve Ward, 2005). Yetişkin kanatları 3,5 ila 4,0 mm uzunluğundadır ve dar koyu pullarla kaplıdır (Carpenter ve La Casse 1974).

Culex pipiens türü holometabol davranış gösterirler. Türün kan emmiş ve döllenmiş dişileri yumurtalarını durgun haldeki sulara; su basmış mahzenler, şantiyeler, yol kanalları ve çukurları, su varilleri, metal tanklar, süs havuzları ve her tür kap (örneğin bahçeler veya mezarlıklar) gibi insan yapımı su kütlelerinin içine bırakırlar. Berrak suda olduğu kadar organik maddelerle kirlenmiş suda da üreyebilirler ve hatta az miktarda tuzluluğa (örneğin kıyı bataklıkları veya kaya havuzları) tolerans gösterebilirler. Tür, iklim koşullarına bağlı olarak yılda birkaç nesil tamamlayabilir (Vinogradova, 2000; Öztürk, 2019). Ülkemizde larvalar çok çeşitli üreme habitatında Nisan ayının başından Kasım ayına kadar bulunabilmektedir (Merdivenci, 1984). Türün larvaları sucul habitatlarda uygun fiziksel ve kimyasal koşullar altında 4 farklı larva evrelerini ve pupa evresini tamamlarlar. Larvalar bulundukları ortamlarda organik madde, mikroskobik organizmalar, hayvan ve bitki parçacıkları ile beslenirler (Foster ve Walker, 2002). Dördüncü evreye gelişen larvalar pupalara dönüşür. Pupa evresinden 2 ila 3 gün sonra erişkin sivrisinekler ortaya çıkar.

Pupadan çıkan erişkinlerin uçuş yetenekleri, ancak 30- 60 dakika dinlenmeden sonra elde belirginleşir.

Palearktikte, *Cx. pipiens pipiens* ve *Cx. pipiens molestus* başlıca biyotipler olarak kabul edilmektedir (Farajollahi vd., 2011). *Pipiens* ekoformunun sadece ornitofilik olduğu düşünülürken, *molestus* ekoformunun insanlar dahil diğer memeli konaklardan beslendiği bilinmektedir (Harbach vd., 1984; 1985). *Culex pipiens pipiens*, yumurta gelişimi için bir kana ihtiyaç duyarken (anotojeni), kuşlardan (ornitofilik) beslenmeyi tercih etmektedir ve kış aylarında diyapoz girmektedir. Buna karşılık *Cx. pipiens molestus* formu tipik olarak kan besinine (otojen) sahip olmayan ilk yumurta grubunu bırakabilir, memelilerden beslenir (mamofilik) ve yıl boyunca aktif kalırlar. Larvalar ilkbahar ortasından ilk donlara kadar bulunabilir ve türler yaz ve sonbaharda bol miktarda bulunur (Schaffner, 2001). Sadece çiftleşmiş dişiler kış mahzenler, mağaralar, sığınaklar veya yer oyukları gibi derin don olmayan barınaklarda geçirirler. Dişiler, sıcakkanlı omurgalıları geceleri, içeride veya dışarıda ısırır ve kanın sindirimi için içeride dinlenirler. Diapause/kışlayan dişilerin reaktivasyonu, sıcaklık ve fotoperiyod arttığında ilkbaharda gerçekleşir (Ciota vd., 2011). Yetişkinler üreme alanlarından genellikle 500 metreden az uzağa dağılmazlar (Becker, 2010). Doğada dişiler, diğer sivrisinek türlerinin daha sık görüldüğü yer seviyesinden daha fazla gölgelik seviyesinde bulunur (Becker, 2010; L'Ambert vd., 2012).

Pipiens ve *molestus* klasik formları arasında farklılıklar vardır. *Pipiens* dişilerinin esas olarak konakçıları kuşlar (yani ornitofilik) oluşturur, dışarıda beslenirler (yani egzo-fajik) ve dışarıda dinlenirler (yani egzo-filik). İlk parti yumurtalarını (yani anotojen) bırakmak için ise kana ihtiyaçları vardır ve yetişkinlik aşamasında zorunlu bir kış diyapozuna sahiptirler ve larvalar esas olarak temiz suda bulunur (hem doğal hem de yapay cisimler). *Molestus* formu, dişileri genellikle insanlar ve diğer memelilerden iç ortamlarda (örn. (yani otojen) beslenirler ve zorunlu diyapoz durumları yoktur. Larvalar genellikle yüksek miktarda organik madde içeren sularda, her zaman olmamakla birlikte genellikle yeraltında bulunur (örneğin, kanalizasyon ve metro sistemlerinde, su basmış mahzenlerde, çukurlarda, toplama havuzlarında ve atık su havuzlarında) (Schaffner vd., 2001; Harbach, 2012; Becker vd., 2010; Farajollahi vd., 2011). Bu nedenle, *molestus* formu insan ortamlarında daha

sık görülür ve kış boyunca su içeren karanlık ve sıcak kentsel habitatlarda çoğalabilir veya ısıtılmamış mahzenlerde veya benzer insan yapımı barınaklarda kışı geçirebilir. *Pipiens* formunun erişkinleri için geçerli olmayan, yavrulama olmadan kapalı alanlarda çiftleşebilirler, bu da onları laboratuvarında üretmeyi çok zorlaştırır. Genel olarak, *pipiens*lerin ve *molestus* formlarının popülasyonları açıktır ve Alplerin kuzeyinde farklılık gösterir, ancak Alplerin güneyinde, mevsim boyunca davranışlarındaki değişiklikler, farklı hava koşulları ve muhtemelen hibridizasyondan da kaynaklanmaktadır (Gomes vd., 2009; Brugman vd., 2018).

1.3. *Culex pipiens* Kompleksinin Coğrafi Dağılımı

Culex pipiens türünün günümüzde yaygın olarak geniş bir dağılımı olmasına rağmen, Afrika, Asya ve Avrupa'ya özgü bir türdür ve Avrupa, Asya, Afrika, Avustralya ve Kuzey ve Güney Amerika'nın ılıman bölgelerinde yayılım gösterir. *Culex quinquefasciatus* dünyanın tropikal, subtropikal ve sıcak ılıman bölgelerinde düşük ila orta yüksekliklerde bulunur (Harbach, 2012). *Culex torrentium* Kuzey Avrupa'da 46°K enlemine kadar ve daha güneyde sadece yüksek rakımlarda görülür (Aranda vd., 2000; Hesson vd., 2014).

Culex pipiens, İzlanda ve Faroe Adaları hariç tüm Avrupa ülkelerinde ve tüm Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkelerinde bulunur. *Culex quinquefasciatus* Irak ve Kuveyt hariç bu ülkelerde bilinen yerleşik popülasyonları bulunmamaktadır (Robert ve ark., 2019). Bu türün Türkiye'de (Günay vd., 2015) ve Yunanistan'da ortaya çıkışına ilişkin bilgiler bulunmasına rağmen, bu hibrit popülasyonun hala doğrulanması gerekmektedir (Shaikevich vd., 2014). Yakın zamanda *Cx. pipiens*'in yeni alanlara yayıldığına dair bir kanıt yoktur, ancak Amerika, Asya ve Avustralya'daki varlığı, gemiler aracılığıyla tarihsel girişi ve ardından yayılımı bilinmektedir (Harbach, 2012).

1.4. *Culex pipiens*'in Vektörel Önemi

Culex pipiens, dünya genelinde geniş bir dağılım gösterdiğinden ve çok çeşitli konakçı grubundan beslendiği için birçok patojenle temas halindedir. Bundan dolayı erişkin popülasyonlar, çeşitli patojenlerle doğal enfeksiyon, bazı vektör yeterlilikleri ve hatta önemli vektörel kapasiteler gösterir. *Culex pipiens*, aynı zamanda çok sayıda

arbovirüsün enzootik vektörü olarak bilinir ve tarihsel olarak ornitofilik sivrisinek olarak sınıflandırılmıştır. *Culex pipiens* dişileri genellikle doğada BNV sirkülasyonunda primer vektörler olarak rol oynar. Avrupa, Çek Cumhuriyeti, Portekiz, Romanya ve Rusya'da (Pages vd., 2009), İspanya'da ve son zamanlarda Hırvatistan, Yunanistan, İtalya ve Sırbistan'da birçok kayıt bulunmaktadır (Vilibic-Cavlek vd., 2019; Papa vd., 2011). Laboratuvar deneyleri, *Cx. pipiens* kompleksine ait pipiens ve molestus türlerinin Avrupa popülasyonlarının, hem BNV enfeksiyonuna duyarlı hem de virüs soyuna bağlı olarak bulaşma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Martinet vd., 2019). Vektör yeterliliğine ve doğal enfeksiyon sıklığına dayalı olarak *Cx. pipiens*, BNV iletiminde ana vektör olarak kabul edilir: enzootik döngüde (kuşlardan kuşlara) çoğaltıcı bir vektör, epizootik döngüde (kuşlardan memelilere) bir köprü vektörü ve bir rezervuar olarak rol oynar. (Savage vd., 1999; Balenghien vd., 2008). Aslında *Cx. pipiens*, esas olarak kuşlarla beslenen pipiensleri oluşturur, muhtemelen enzootik döngüde önemli bir rol oynar, oysa hem kuşlar hem de memelilerle beslenen form molestus ve hibritlerin epizootik döngüde bir köprü vektörü rolü oynaması daha olasıdır (Vogels vd., 2017).

Culex pipiens sivrisineklerinin Avrupa'daki son salgınlar sırasında (BNV'de olduğu gibi) sıklıkla doğal olarak USUV ile enfekte olduğu bulunmuştur ve deneysel enfeksiyonlar, hem pipiens hem de molestus formlarının vektör yetkinliğini göstermiştir (Martinet vd., 2019). BNV ile bir başka benzerlik, türün konakçı tercihleri ve salgın alanlarındaki bolluğu ve diğer türlere kıyasla yüksek doğal enfeksiyon sıklığıdır, bu da *Cx. pipiens*'in ılıman bölgelerde bir USUV vektörü olarak önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Fros vd., 2015; Camp vd., 2019). Çin'de *Cx. pipiens* form molestus'un laboratuvar enfeksiyonuna dayalı olarak Japanese ensefalit virüsü için orta derecede kompetan bir vektör olduğu da düşünülmektedir (Pages vd., 2009). *Culex pipiens*'in orta derecede etkili bir SINV vektörü olduğu ise virüsün sivrisineği önemli ölçüde enfekte etme ve yayma kabiliyeti, doğada gözlenen enfeksiyonlar ve erişkinlerin bolluğu ve beslenme davranışından dolayı düşünülmektedir. Ancak ikiz türü *Cx. torrentium* enzootik döngüde daha önemli bir rol oynayabilmektedir (Turell vd., 2012; Hubálek, 2008).

Culex pipiens dişilerinin Romanya'da doğal ortamlarda TAHV ile enfekte olduğu bulunmuştur (Arcan vd., 1974) ve laboratuvar deneyleri bazı vektör

yetkinliklerini göstermiştir (Pchelkina vd., 1978). Bu nedenle türler, Avrupa bağlamında bir vektör olarak hareket edebilmektedirler (Arcan vd., 1974). *Culex pipiens* Saint Louis ensefalit virüsünün enfeksiyonuna ve yayılmasına karşı orta düzeyde bir duyarlılık göstermiş olmasına rağmen, Doğu at ensefalit virüsü, Venezüella at ensefalit virüsü ve Batı at ensefalit virüsü ediniminde yetersiz kabul edilmiştir (Turell vd., 2012). Avrupa’da *Cx. pipiens*’in (hem *pipiens* hem de *molestus* formları), laboratuvar deneylerinde kanıtlandığı gibi vektör yeterliliğine ve dirofilariosis odaklarındaki bolluğuna ve ısırma aktivitesine bağlı olarak, köpekler ve muhtemelen insanlar için hem *Dirofilaria immitis* hem de *D. repens*’in bir vektörü olduğu düşünülmektedir (Bravo-Barriga vd., 2016). Birkaç sivrisinek türünün, kuş sıtma parazitlerinin (*Plasmodium relictum*, *Plasmodium vaughani*) vektörleri olduğu düşünülmektedir ve *Cx. pipiens*, kuzey yarımkürede önemli bir vektördür (Lalubin vd., 2013). Genel olarak, doğada bir patojenin sivrisinekler tarafından bulaşması, yalnızca vektör yetkinliğine değil, aynı zamanda yerel ortamda vektör, patojen ve konakçı arasındaki etkileşimin yoğunluğunu tanımlayan faktörlere de bağlıdır (Moutailler vd., 2008). Bu nedenle, bir sivrisinek popülasyonunun vektörel kapasitesini ve bulaşmadaki rolünü belirlemek için vektör ve konukçu yoğunlukları, coğrafi dağılım, uzun ömür, dağılım ve beslenme tercihleri dikkate alınmalıdır.

1.5. Sivrisinek Mücadelesinde Kullanılan Kimyasal Mücadele Ajanları

Hem sivrisinek mücadelesi hemde diğer böceklerle mücadelede kullanılan insektisitler için pek çok sınıflandırma yöntemi olsa da bu yöntemler arasında en çok tercih edilen sınıflandırma yöntemi aktif madde içeriklerine göre yapılanıdır. Sınıflandırma yöntemi içerisinde 4 ana grup (organoklorlu, organofosforlu, karbamat ve piretroid) yer almaktadır (Demirtaş, 2017).

1.5.1. Organoklorlu İnsektisitler

Bu insektisitler yapılarında bulunan aromatik veya alifatik bileşiklere klor içeren çeşitli bileşiklerin bağlanması ile elde edilir. Bu grup insektisitler isimlerini bağlanan bu klorlu bileşiklerden almaktadır (Önen vd., 2016). Bu bileşikler sivrisinekler üzerinde yüksek toksik etkiye sahipken mememelilerde daha az toksik etkiye sahip olmaları açısından avantajlı bileşiklerdir. Ancak bu grup insektisitlerin

doğadaki kalıcılıkları fazladır. Örneğin bu gruptan ilk olarak keşfedilen ve en çok bilinen DDT doğada yaklaşık 10 yıl kadar bozulmadan kalabilir. Ayrıca bu bileşiklerin biyolojik olarak yükseltgenmeleri, yararlı böcek gruplarını ve diğer yararlı canlı gruplarını da etkilemeleri, doğada ve canlılarda biyolojik birikime neden olmaları; yağmur, kar, rüzgâr, su akıntıları gibi etmenlerle taşınarak sürüklendikleri yerlerde canlılara zarar vermeleri sebebiyle yasaklanmış durumdadır (Campbell ve Reece, 2006; Önen vd., 2016; Demirtaş, 2017, Öztürk, 2018).

Bu grup içerisinde DDT olarak bilinen diklorodifenil trikloroetan ilk olarak 1930'lu yıllarda İsviçreli kimyager Paul Müller tarafından sentezlenmiştir. O yıllarda böcek mücadelesinde devrim olarak tanımlanan bu buluş Müller'e 1948'de Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel Ödülü'nü almasına sebep olmuştur. Ancak bu insektisit doğaya zararlarının belirlenmesi ve direnç vakalarının ortaya çıkması ile birlikte dünyanın pek çok bölgesinde yasaklanmıştır (Önen vd., 2016).

Organoklorlu insektisitler genel olarak böceklerin sinir sistemi üzerinde etkilidir. Kullanılan insektisit etkisi molekül yapısına göre değişiklik (molekülün üç boyutlu yapısı, büyüklüğü, uçuculuğu gibi) göstermektedir. Bu gruptan en çok bilinen insektisitler DDT, aldrin, dieldrin, endrin, toksafen, lindan, klordandır.

1.5.2. Organofosforlu İsektisitler

Organofosforlu insektisitler; triester yapıdadır ve fosforik asitten köken alırlar. Etken madde olarak yapılarında fosfor ihtiva ederler. Kimyasal yapıları fosforun bağlandığı maddeye göre çok sayıda çeşitlenebilmektedir. Paratyon, metil-paratyon, malation, diazinon, sülfrofos, klorpirifos, monokrotofos, triklorfon, TEPP (tetraetil pirofosfat) bu grup içerisinde en çok bilinen insektisitlerdir (Öztürk, 2018). Bu grup insektisitlerin zehirlilik düzeyleri oldukça yüksek olup genellikle temas, sindirim ve solunum yolu ile etki etmektedir ve böceklerde larva, ergin, nimf gibi dönemlerde etkindir. (Bursalı, 2013). Bu grup insektisitler organoklorlu insektisitlere alternatif olarak ortaya çıkmıştır ve organoklorlu insektisitlerde başlıca problem olan doğada kalıcılık sorununu ortadan kaldırmıştır. Bu grup insektisitler de organoklorlu insektisitlerde olduğu gibi sinir sistemi üzerinde etkilidir. Ancak bu grup insektisitler organoklorlu insektisitler gibi sodyum kanalını değil asetilkolinesterazı hedef alır (Demirtaş, 2017).

1.5.3. Karbamat Grubu İsektisitler

Karbamik asitin esterleri olarak kabul edilen karbamatlı insektisitler ilk olarak 1951 yılında İsviçre’de sentezlendi (Becker vd., 2010). Bu grup insektisitler böcekler üzerinde oldukça etkilidir ve genel olarak ergin mücadelesinde kullanılırlar. Bu grup insektisitlerin etki mekanizmaları organofosfatlarda olduğu gibi sinir sistemine etki eder ve asetilkolin estereazı inhibe eder. Ancak bu gruba ait insektisitlerin asetilkoline etki mekanizmaları organofosfatlı insektisitlerden farklıdır. Bu nedenle organofosfatlı insektisitlere direnç geliştiren canlılar üzerinde de etkili olarak kullanılabilmektedirler (Bursalı, 2013). Bu gruba ait karbaril, maneb, aldikarb, aminokarb, metomil, tiyodikarb, karbofuran, priopoksor, bendiocarb, propoxur, en çok bilinen karbamat grubu insektisitlerdir (Özdemir, 2006; Özcel ve Daldal, 1997; Bursalı, 2013).

1.5.4. Piretroid Grubu İsektisitler

Piretroidler günümüzde en fazla kullanılan insektisit grubudur. Bu grup insektisitler Asteraceae familyasına ait *Chrysanthemum cinerariaefolium* bitkisinin çiçeklerinin ekstraksiyonuyla elde edilen krisantemik asit (piretrin I) ve pteritik asit (piretrin II)’in kullanılarak sentezlendiği insektisitlerdir (Davies vd., 2007). Bu insektisitler ilk olarak Çin’de 1000’li yıllarda keşfedilmiştir. Ancak bu gruba ait insektisitler doğada oldukça hızlı bozunabilmektedir. Bu sınırlılığı sebebiyle bu insektisitlerin kullnıma alınmaları uzun yıllar sürmüştür. Bu insektisitlere ilk olarak 1949 yılında Cinerin 1 bitkisel eksraktı allethrin sentezlenmesiyle başlanmıştır. Böylece bu grup insektisitlerin doğadaki çok hızlı bozunmalarının önüne geçilmiştir. 1980’li yıllarda ise piretroid grubu insektisitlerin sentezi ile elde edilen insektisit sayıları artış göstermiş ve günümüze kadar sayısız piretroid grubu insektisit sentezlenmiştir. Bu grup insektisitler oldukça yüksek öldürücü özelliğe sahip olup, bu nedenle az miktarda kullanılsalar bile etkinlikleri yüksektir. Ayrıca uçucu özelliklerinden ötürü böcek uzaklaştırıcı özelliklerinin de olması onları daha cazip hale getirmiştir (Çağlar vd, 2008). Bu grup insektisitler organoklorlu insektisitlerde olduğu gibi sodyum kanal proteini üzerinde etkilidir ve böceklerin sinir sistemini hedef alarak böceğin sodyum kanal proteininin açık kalarak sinir hücrelerinin elektriksel yapısının bozulmasına neden olur (Öztürk, 2018). Kimyasal yapı olarak 2 tip piretroid grubu insektisit bulunmaktadır. Tip I piretroidler yapılarında siklopropan karboksilik asit

esterleri bulundurur. Tip 1 piretroidlerden en çok bilinen insektisitlere; bioallethrin, fenothrin, permethrin, etofenprox, pyrethrin, cysmethrin ve tetramethrin örnek verilebilir. Tip 2 piretroidler ise tip 1 insektisiklerin yapılarına siyano grubu eklenmesiyle elde edilirler. Cypermethrin, alpha-cypermethrin, cyfluthrin, lambda-cyhalothrin ve fenvalerat bilinen Tip II piretroidlerdir (Becker vd., 2010).

1.5.5. Böcek Büyüme Düzenleyicileri

Böcek büyüme düzenleyicileri böceklerin ergin öncesi evrelerinde etkili olan insektisit grubudur. Bu insektisitler böceklerin kitin sentezinden sorumlu enzim ve hücresel yapılarına etki ederek böceğin başkalaşım geçirmesine engel olurlar. Sadece böceklerde etkili olmaları bu insektisitlerin başlıca avantajlarından. Ancak bu insektisitler hedef böcek grupları dışında diğer böcekleri de etkilemektedir. Methoprene ve pyriproxyfen en fazla kullanılan böcek büyüme düzenleyicileridir (Özcel ve Daldal,1997).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Sivrisinek kaynaklı hastalıklar, milyonlarca ölümcül vakaya yol açarak dünya genelinde nüfusun yarısını etkilediği için halk sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Sivrisineklerin neden oldukları hastalıkların insidansının dünya genelinde arttığı ve bu hastalıkların yayılım alanlarının da genişlediği görülmüştür. Örneğin, Romanya'da 1996'da görülen ilk büyük salgından bu yana Güneydoğu Avrupa ve Akdeniz Bölgesinden Batı Nil virüsü hastalığı vakaları bildirilmiştir (Ceianu vd., 2001; Rezza, 2014; Martinet vd., 2019). Bu tür hastalıkların epidemik potansiyeli, palearktık bölgede istilacı sivrisineklerin yayılımı ile birlikte artmıştır (Marshall, 2000). Yaygın olarak 'kuzey ev sivrisineği' olarak adlandırılan *Cx. pipiens* L., 1758 (Diptera: Culicidae) kompleks türlerihem insanlardan kam emme davranışı nedeniyle verdiği rahatsızlıktan dolayıhem debaşlıcasıBatı Nil virüsü, Rift Valley hummasıgibi çeşitli arbovirüsleri ve *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) (Spirurida: Onchocercidae) bilinen nematodun vektörlüğünü yapması açısından önemli bir türdür. (Diaz-Badillo vd., 2011; Akıner ve Ekşi, 2015; Grigoraki vd., 2018; Zakhia vd., 2018). Batı Nil virüsü vakalarının ilki Türkiye'de 1970'li yıllarda tespit edilmiştir. O zamandan günümüze kadar pek çok farklı bölgelerde insan, koyun, at, keçi, karga, kedi ve köpek gibi konakların varlığı ile birlikte *Cx. pipiens* s.s. (Linnaeus, 1758), *Aedes caspius* (Pallas, 1771), *Cx. quinquefasciatus* (Say, 1823), *Cx. perexiguus* (Theobald, 1903) vektör türleri de tespit edilmiştir (Meco, 1977; Özkul vd., 2006; Ergunay vd., 2010a, Ergunay vd., 2010b, Kalaycioglu vd., 2012; Yazici vd., 2012; Failloux vd., 2017; Ari, 1972; Ergunay vd., 2014; Akıner vd., 2019).

Sivrisinek kaynaklı hastalıkların etkili bir tedavi yöntemi ve geliştirilmiş bir aşısı bulunmamaktadır. Bu nedenle hastalıkları önlemenin en önemli adımı konak ile vektör etkileşimini en aza indirmek ya da tamamen ortadan kaldırmaktır (Alten ve Çağlar, 1998). Vektör ve konak etkileşimini an aza indirmek için sıklıkla başvuru olan yöntem sivrisinek popülasyonunu hem daha az maliyetli hem de basit bir yöntem olan kimyasal mücadele yöntemi tercih edilmektedir (Öztürk, 2018). Türkiye'de insektisit kullanımı Cumhuriyetin ilk kurulduğu yıllarda sıtma vektörü olan *Anopheles* cinsi sivrisineklere karşı organoklorlu insektisitler (özellikle DDT) kullanılarak başlamıştır ve 1980'li yıllara kadar devam etmiştir. Ancak organoklorlu insektisitler doğaya

verdiği zararın ortaya çıkmasıyla birlikte kullanımı yasaklanmıştır (Demirtaş, 2017). Günümüzde ise sivrisinek mücadelesinde piretroid, organofosfat ve karbamatlı insektisitler sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kimyasal insektisitlerin aşırı kullanımı, direnç genleri için seçim baskısı oluşturarak sivrisineklerin zamanla insektisitlere dirençli hale gelmesine yol açar (Akıner, 2009).

Sivrisineklerde insektisit direncinden fizyolojik, genetik ve davranışsal mekanizmaları içeren pek çok insektisit direnç mekanizması olmasına rağmen bu direnç mekanizmaları içerisinde metabolik ve hedef bölge duyarsızlığı en önemli ve dirence en fazla neden olan iki farklı insektisit direnç tipidir (Akıner, 2009). Metabolik insektisit direnci, böceklerde vücuda alınan insektisitin (kullanılan insektisit grubuna bağlı olarak glutatyon S-transferaz, karışık fonksiyonlu oksijenaz, ve karboksi esteraz gibi) kendisini etkisizleştiren enzimlerin miktarında artış ile beraber böceğin vücutundan uzaklaştırılması ve böylece toksik etkisinin giderilmesidir (Kasai vd., 1998; Hemingway vd., 2004; Whalon vd., 2008; Akıner ve Ekşi, 2015). Hedef bölge direnci ise sinir sisteminde yer alan başta sodyum kanalı ve asetil kolin esterazı kodlayan genlerde meydana gelen nokta mutasyonlarından dolayı insektisitin hedefindeki enzim yapısında bulunan yapısal değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Hemingway vd., 2004; Shi vd., 2015).

İki temel hedef bölge direnci böceklerde önemlidir. Bunlardan *kdr* (Knockdown resistance) direnci, piretroid grubu insektisitlere ve DDT'ye karşı gelişen dirençten sorumludur (Donnelly vd., 2009). Sodyum kanal proteinini kodlayan Voltage-Gated Na⁺ Channels (Vgsc) geninde meydana gelen nokta mutasyonları piretroid grubu insektisitlerin ve DDT'nin hedefinde bulunan sodyum kanal proteinine affinitesini düşürerek bu insektisitlerin etkisini azaltmaktadır. Günümüzde otuzun üzerinde *kdr* direncine neden olan nokta mutasyonu bilinmektedir (Wang vd., 2012; Lol vd., 2013). Ancak bu mutasyonlardan en önemli ve en çok bilinen *kdr* direnci nokta mutasyonu sodyum kanalı proteini domain II içerisinde yer alan ve lösini kodlayan TTA kodonunun mutasyon sonrası fenilalanine kodlayan TTT kodonuna dönüşümü ile oluşan L1014F *kdr* direncidir (Shi vd., 2015). Dirence neden olan bu nokta mutasyonu tipi aynı zamanda piretroid ve DDT'nin metabolik parçalanmasında rol oynayan P450 enzim miktarındaki artışa neden olarak birlikte direnç miktarını daha da yükseltmektedir (Edi vd., 2012). Her ne kadar L1014F mutasyonu en

çokbilinen mutasyon tipi olsa da 1014 noktasında L1014H/C/S/W gibi farklı mutasyon tipleri de önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Rinkevich vd., 2013; Scott vd., 2015; Taşkın vd., 2016).

Temel insektisit gruplarından organofosfat ve karbamat grubu insektisitler asetilkolinesteraz enzimini hedef alan insektisit gruplarıdır. Bu insektisitler hidrolaz özelliğe sahip *ace* enzimine bağlanarak asetilkolinin serbest asetil ve kolin haline geçmesini engeller (Colovic vd., 2013). Bu insektisit grupları yapısal olarak asetilkolinin yapısına aşırı benzer yapıdadır. Bu nedenle asetilkolinle yarışarak asetilkolin esteraza bağlanır ve böylece böceğin sinir sistemini inhibe eder (Alout vd., 2008). Temel olarak böceklerde hedef bölge direncine neden olan 3 nokta mutasyonu organofosfat ve karbamat direncinden sorumlu tutulur. Ancak *Cx. pipiens* türlerinde dirence neden olan iki farklı hedef bölge değişimi mutasyonu bilinmektedir. Bu mutasyon tipleri *ace-1* geninin 119. noktasında yer alan ve G119S olarak bilinen glisinin serine dönüştüğü nokta mutasyonudur. Diğer *ace-1* gen mutasyonu ise felilalaninin valinaminoasidinedönüştüğü ve F290V olarak bilinen nokta mutasyonudur (Alout vd., 2008)

3. YAPILAN ÇALIŞMALAR

3.1. Örneklerin Toplanması ve Alan Özelliklerinin Belirlenmesi

Örnek toplama işlemi 2020 yılı aktif sezonda (Mayıs-Ekim ayları arasında) Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nden 9 ilden (Artvin, Rize, Trabzon, Giresun, Ordu, Samsun, Sinop, Çorum, Amasya) 33 farklı lokasyondan yapılmıştır (Şekil 1). Örneklem yapılan alanlar arasında minimum 1 km² uzaklık olmasına dikkat edilmiştir. Örneklem işlemi ECDC (Avrupa Hastalık Kontrol Ajansı) tarafından belirlenen protokole uygun olarak larva ve ergin şeklinde gerçekleştirilmiştir (Medlock vd., 2018). Kullanılan metodlar kısaca; larva örnekleme için 250 ml'lik larva kepçesi kullanılarak durgun sulardan her örneklem alanı için minimum 100 *Culex pipiens* örneği elde edilecek şekilde gerçekleştirilmiştir. Larva toplama alanları olarak kullanılmış lastikler içlerinde biriken sular, atık metal ve plastik kaplar, kovalar, bodrum içi su birikintileri, mezarlık başlıklarında biriken sular, sulama kanalları, göletler ve tarım alanları seçilmiştir. Ergin toplama işlemi CO² ile çekiciliği güçlendirilmiş EVS (Ensefalit Vektör Taraması Tuzağı) tuzaklar kullanılarak günlük kontrol sağlanmıştır. Örnek toplama alanları koordinat bilgileri GPS cihazı (eTrex Vista HCx, Garmin, Olathe, KS, USA) kullanılarak koordinat bilgileri WGS84 formatında ondalık derece olarak kaydedildi. Alan özelliklerinin belirlenmesi Avrupa Çevre Ajansı tarafından belirlenen Corine arazi özelliklerine göre yapılmıştır. Corine arazi örtüleri uydu görüntüleri üzerinden arazi örtüsünün bilgisayar ortamına aktararak yorumlanmasını sağlayan veriler kullanılarak yapılmasını sağlamıştır. Corine arazi örtüleri 5 ana (yapay bölgeler, tarımsal alanlar, orman ve yarı doğal alanlar, sulak alanlar, su yapıları) sınıf altında yer alan 44 alt sınıftan oluşmaktadır. Corine arazi verileri tarım ve ormancılık bakanlığı internet sitesinden 1 km çözünürlükte elde edilmiştir. Elde edilen arazi koordinatlarının alan özellikleri Corine haritası kullanılarak ArcGIS 10.5 de belirlenmiştir. Örneklem alanlarının koordinatları ve alan özellikleri Tablo 1 de verilmiştir.

Şekil 1. Örnek toplama alanları



Tablo 1. Sivrisinek toplama alanları ve özellikleri

		Corine kodu					
	Bölge	Latitude	Longitudo	(Sınıf 1 e göre)	Evre	Habitat	
Artvin	Artvin	41,181000	41,830800	112 (Yapay)	Larva	Atık lastik	
	Hopa	41,387600	41,437800	121 (Yapay)	Larva ve ergin	Atık lastik	
	Borçka	41,383170	41,690850	222 (Tarımsal)	Larva	Atık lastik	
						Yol kenarındaki su	
	Arhavi	41,358600	41,318400	112 (Yapay)	Larva	birikintisi	
	Fındıklı	41,280100	41,152700	112 (Yapay)	Larva	Atık lastik	
	Ardeşen	41,189330	40,970080	112 (Yapay)	Larva	Atık lastik	
						Atık lastik,Larva	
	Pazar	41,182010	40,893200	112 (Yapay)	Larva ve ergin	habitatına yanı	
	Hamidiye	41,183170	40,953530	222 (Tarımsal)	Larva	mermer	
Rize						Yol kenarındaki su	
	Çayeli	41,071960	40,715180	121 (Yapay)	Larva	birikintisi	
	Rize	41,041600	40,577100	121 (Yapay)	Larva	Su birikintisi	
	İyidere	40,987991	40,330908	112 (Yapay)	Larva	Atık lastik	
	İkizdere	40,773983	40,557746	242 (Tarımsal)	Larva	Atık lastik	
						Yol kenarındaki su	
	Sürmene	40,908611	40,107778	112 (Yapay)	Larva	birikintisi	
	Arsin	40,963056	39,988889	112 (Yapay)	Larva	Metal kap	
	Sümela	40,730670	39,637359	243 (Tarımsal)	Larva	Plastik kap	
	Trabzon	40,976600	39,748000	121 (Yapay)	Larva	Atık lastik	
Trabzon	Akçaabat	41,012200	39,593500	111 (Yapay)	Larva	Atık lastik	
	Çarşıbaşı	41,087700	39,385900	112 (Yapay)	Larva	Atık lastik	
						Atık lastik	
						Mermer, Larva	
	Vakfikebir	41,040200	39,280200	112 (Yapay)	Larva ve ergin	habitatına yanı	
	Giresun	Görele	41,037400	38,983900	222 (Tarımsal)	Larva	Metal kap
		Turnasuyu	40,980279	38,001947	222 (Tarımsal)	Larva	Su birikintisi
						Yol kenarındaki su	
		Gülyalı	40,966800	38,057200	112 (Yapay)	Larva	birikintisi
	Ordu	Ünye	41,122930	37,294650	111 (Yapay)	Larva	Atık lastik
Samsun		Engiz	41,494129	36,085397	212 (Tarımsal)	Larva	Sulama kanalı
							Su birikintisi
							vetünel
	Çarşamba	41,205200	36,741700	242 (Tarımsal)	Larva ve ergin		
	Bafra	41,617670	35,874580	212 (Tarımsal)	Larva ve ergin	Sulama kanalı	
	Boyabat	41,465420	34,821711	213 (Tarımsal)	Larva	Sulama kanalı	
	Sinop	Dikmen	41,650838	35,267845	242 (Tarımsal)	Larva	Sulama kanalı
		Laçın	40,775116	34,886957	112 (Yapay)	Larva	Su birikintisi
	Çorum	Osmancık	40,969140	34,804194	112 (Yapay)	Larva	Göl
		Merzifon	40,871039	35,463934	111 (Yapay)	Larva	Su birikintisi
Amasya	Amasya	40,667425	35,846207	112 (Yapay)	Larva	Atık lastik	
	Saluca	40,784078	35,681733	242 (Tarımsal)	Larva	Sulama kanalı	

3.2. Toplanan Örneklerin Laboratuvara Getirilmesi ve Saklama Koşulları

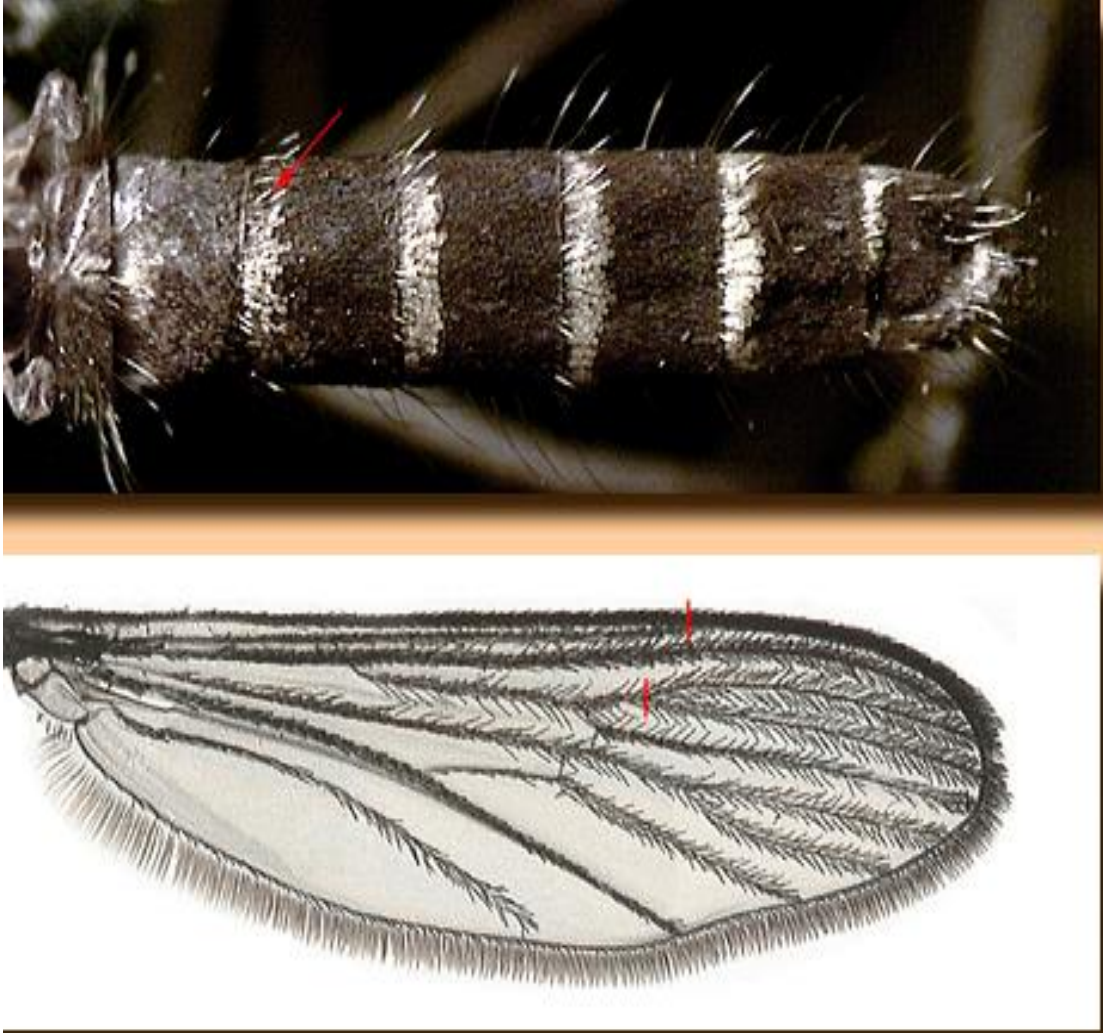
Araziden toplanan larvalar her alan için ayrı ayrı 500 mL’lik kaplar içerisinde canlı olarak getirilmiştir. Farklı alanlardan toplanan örneklerin karışmaması için her lokasyon için toplama kapları üzerine lokasyon adı ve toplama tarihleriyazılarak

etiketlenmiştir. Toplanan larva örnekleri Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Biyoloji Bölümü Vektör Kontrol ve Ekolojisi Laboratuvar'ında bulunan insektaryuma getirildikten sonra örnekler içerisinde *Culex* cinsi dışındaki cinsler ayıklanarak her bir lokasyon için ayrı kaplara alınmış ve larvalar günlük olarak balık yemi ile beslenmiştir. Her bir kap için larvalar günlük olarak kontrol edilmiş ve pupalaşan larvalar 30 cm x 30 cm x 30 cm'luk tül kafeslere alınarak erginleştirilmiştir. Kafeslerdeki örneklerin beslenmesi için %10'luk şekerli su çözeltisi kullanılmıştır. Tamamı erginleşen bölgelere ait örnekler ağız aspiratörü kullanılarak toplanmış ve -20 °C'de öldürülerek laboratuvar çalışmalarına kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır. Araziden ergin olarak toplanan örnekler ise kuru buz üzerinde laboratuvara getirilerek yine kuru buz üzerinde cins tayinleri yapıldıktan sonra -80 °C'de saklanmıştır.

3.3. Laboratuvar Çalışmaları

3.3.1. Morfolojik Tür Tayini

- 80 °C'de saklanan arazi örnekleri morfolojik tür tayinleri kuru buz üzerinde yapıldıktan sonra tür teşhisi için bilgisayar destekli Leica Microsystem EZ4 stereomikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) kullanılarak tamamlanmıştır. Türün belirlenmesi işlemi Schaffner ve ark. (2001) tarafından hazırlanan ve bilgisayar ortamında görselleştirilmiş “Avrupa Sivrisinekleri” Tür Teşhis Anahtarı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Culex pipiens*'in morfolojik ayrımında kullanılan ana karakterler Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. *Culex pipiens* kompleks tür teşhisinde kullanılan ana karakterler (Schaffner vd., 2001)

3.3.2. DNA İzolasyonu

Morfolojik olarak tanımlanan ve *Cx. pipiens* olduğu belirlenen örneklerin DNA izolasyonu, GeneJET Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti (Thermo Scientific®) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın tamamında dişi bireyler kullanılmış olup DNA izolasyonu kısaca aşağıda tarif edildiği şekildedir: Her dişi birey ayrı bir 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. 180 µL Bozundurma solüsyonu ve 20 µL Proteinaz K solüsyonu ilave edildikten sonra sivrisinekler porselen çubukla ezilmiş ve örnekler 56 °C'de yarım saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüplere 20 µL RNase A solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında (25°C) 10 dakika inkübe edildikten sonra 400 µL %50 etanol ilave edilerek vortekslenmiştir. Ortaya çıkan homojenat kolonlara alınmış ve 6000 g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü yenilenerek kolonlara 500 µL yıkama tamponu I ilave edilmiş olup 8000g'de 1 dakika santrifüj

edilmiştir. Devamında yıkama tamponu II kullanılarak aynı işlem tekrarlanmıştır. Toplama tüpleri atılarak yeni bir steril 1.5 mL mikrosantrifüj tüpü ile değiştirilmiştir. Kolona 200 µL elüsyon tamponu eklendi, oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi ve 8000 g'de 1 dakika daha santrifüjlendi. DNA içeren mikrosantrifüj tüpleri etiketlenerek -20°C'de saklandı.

3.3.3. Moleküler Doğrulama

Morfolojik çalışmaların moleküler olarak doğrulanması Smith & Fonseca'ya (2004) tarafından belirlenen ve morfolojik olarak *Cx. pipiens* kompleks üyelerine oldukça benzeyen *Cx. torrentium* türünün jel görüntülerinden ayrımını sağlayan ve alçak dipterlerde bulunan *ace-2* gen bölgesinin çoğaltılması ile gerçekleştirilmiştir. PZR işlemi için

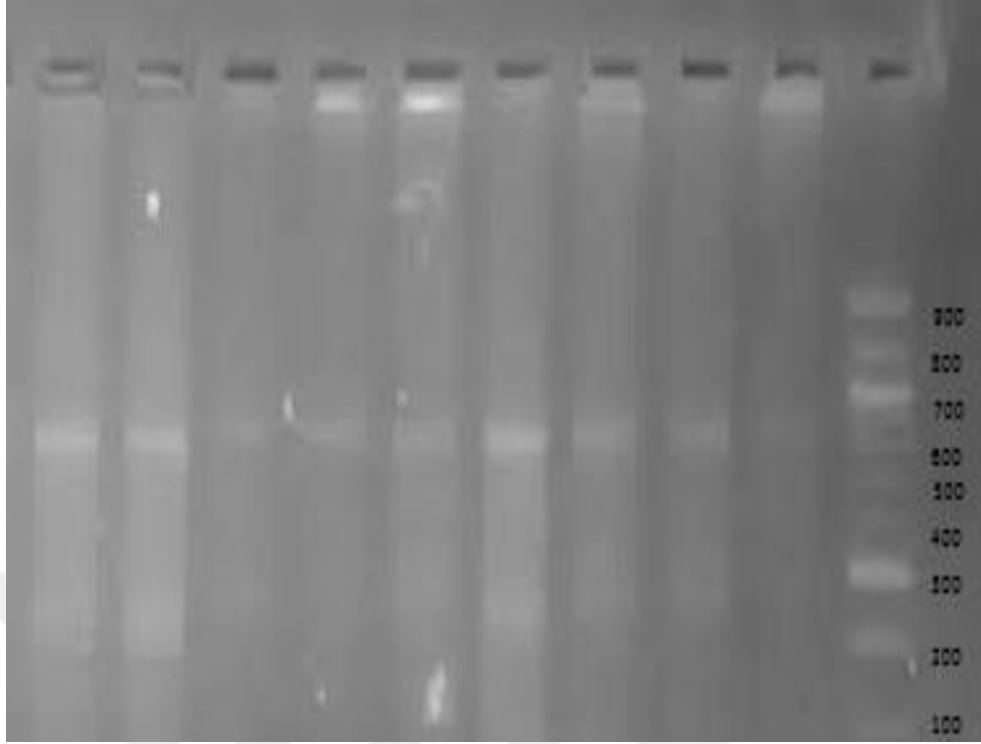
ACEquin (5'- CTTCTTGAATGGCTGTGGCA-3'),

ACEpip (5'-GAAACAACGACGTATGTACT-3'),

ACEtorr (5'-TGCCTGTGCTACCAGTGATGTT-3') ve

B1246 (5'-TGGAGCCTCCTCTTCACGGC-3') primer dizileri kullanıldı.

PZR işlemi için kullanılan master miks 30 µL hacim için 100 ng genomik DNA, 1x tampon, 2.5 mM MgCl₂, her biri 250 mM dNTP, her biri 100 nM primer ve 1 ünite Biolabs® Taq polimeraz kullanıldı. PZR koşulları, ilk denatürasyon için 94°C'de 5 dakikalık bir döngü ve 35 döngü boyunca 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 56°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 60 saniye uzama ve son uzatma için 72°C'de 5 dakika olacak şekilde yapıldı. Elde edilen amplikonlar, %1.5 agaroz jel kullanılarak görüntülendi. Tür teşhislerinin doğrulanması daha önce yazar tarafından belirlenen *Cx. pipiens* için 610 bp, *Cx. quinquefasciatus* 274 bp ve *Cx. pallens* 478 bp ve *Cx. torrentium* için 500 bp jel görüntülerine göre ayırım yapıldı (Smith ve Fonseca, 2004). Örneklerden elde edilen jel görüntüleri Şekil 3'de verilmiştir.



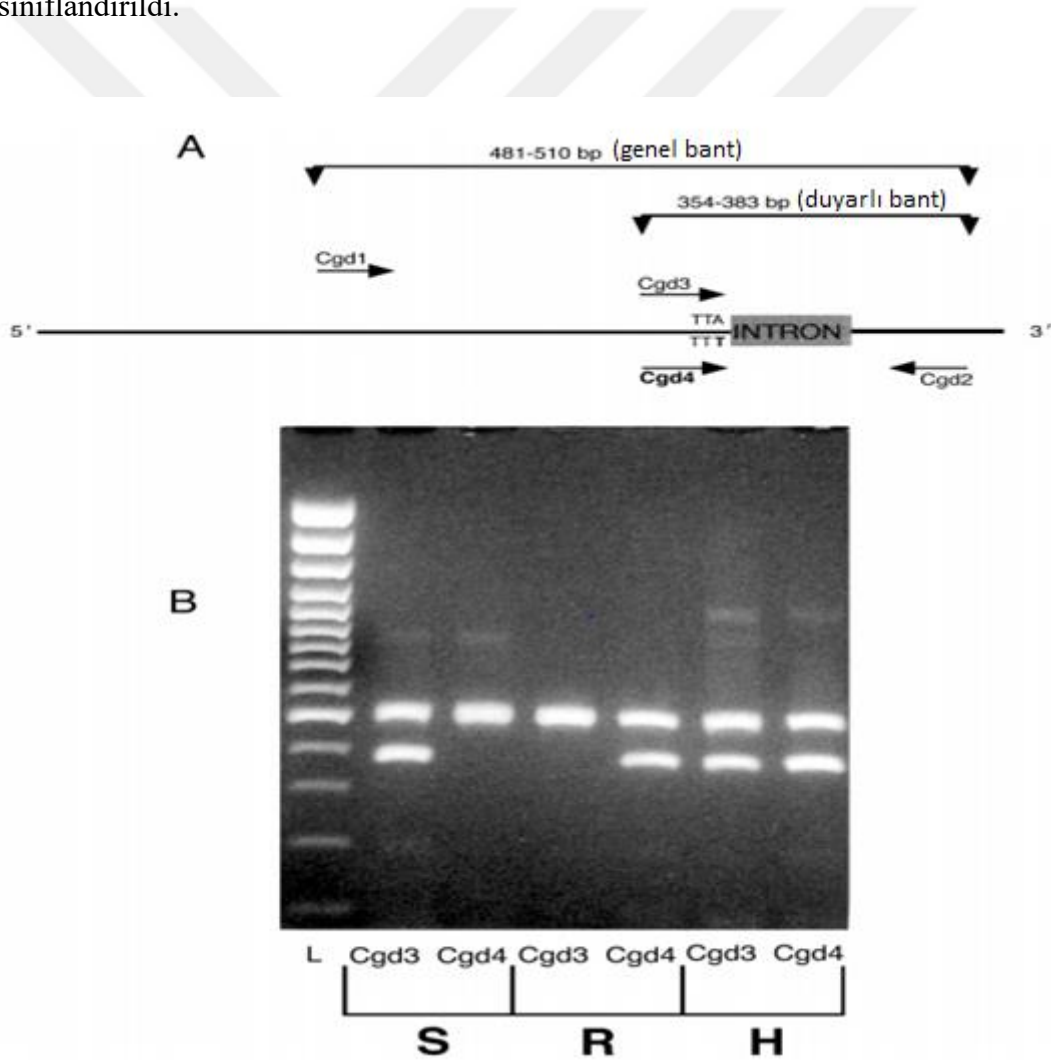
Şekil 3. Örneklerden elde edilen *ace-2* ye ait jel görüntüleri

3.3.4. Hedef Gen Bölgesi Mutasyon Taramaları

3.3.4.1. *kdr* Mutasyon Taraması

Voltaj-duyarlı sodyum kanalı (*Vssc*) genindeki mutasyondan kaynaklanan hedef bölge duyarsızlığına neden olan *kdr* direnci taramaları yapılması için alanlardan rastgele seçilen ve morfolojik ve moleküler doğrulaması yapılmış örnekler kullanılmıştır. Örneklerin jel görüntülerinden direncin belirlenmesi için her bölgeden 50'ser olmak üzere toplam 1650 örnek ile çalışılmıştır. Örneklerin PZR işlemi Martinez-Torres vd. (1998) göre yapılmıştır. PZR işlemi eş zamanlı olarak 2 PZR şeklinde olarak yapıldı. İlk PZR işlemi için Cgd1 (5' GTG GAA CTTTAC CGA CTT C 3'), Cgd2 (5' GCA AGG CTA AGA AAA GGT TAA G 3') ve Cgd3 (5'CCA CCG TAG TGA TAG GAA ATT TA 3'), primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. Üçüncü PZR işlemi için Cgd1 (5' GTG GAA CTTTAC CGA CTT C 3'), Cgd2 (5' GCA AGG CTA AGA AAA GGT TAA G 3') ve Cgd4 (5' CCA CCG TAG TGA TAG GAA ATT TT 3') primerleri kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Her iki PZR için PZR master mixi Biolabs® Taq Polymerase kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR karışımı içeriği 3 µL Buffer (10X), 3 µL MgCl₂ (25 mM), 1,5 µL 2.5 mM dNTP mix,

1'er µL her bir primerden (Primer ileri-Cgd1 (20 µM), Primer geri-Cgd2 (20 µM), Primer ileri-Cgd3 (20 µM), 0,5 µL Taq DNA Polimeraz (5 U/ µL), 5 µL Kalıp DNA ve toplam hacim 25 µl olacak şekilde ddH₂O (steril distile su) kullanılarak hazırlanmıştır. Elde edilen karışım için PZR reaksiyonu koşulları ise şu şekildedir: 95°C'de, 15 dakika başlangıç denatürasyonu, takip eden 40 döngü boyunca 94 °C'de 30 saniye ve 48 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 30 sn son uzama için 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde T100 TM Thermal Cycler–Bio-Rad® PZR cihazı ile yapılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri %1.5'luk agaroz jel elektroforezi sonucunda bant büyüklüklerine göre heterozigot dirençli ya da homozigot dirençli ya da homozigot duyarlı olarak Şekil 4'de verilen ve daha önce yazar tarafından tanımlanan bant büyüklüklerine göre sınıflandırıldı.



Şekil 4. *kdr* gen bölgesinin yerleşimi ve agaroz jel elektroforezi görüntüsü (S= duyarlı, R=dirençli, H= heterozigot) (Martinez-Torres vd., 1999).

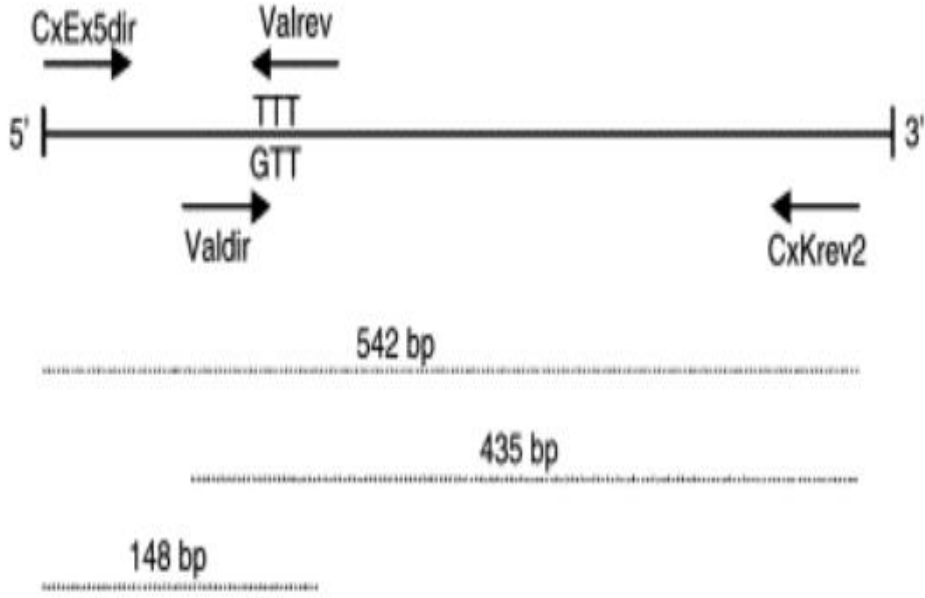
kdr gen bölgesinde 1014. noktada bulunan mutasyonların ve yeni mutasyon

tiplerinin belirlenmesi için her bölgeden 10'ar örnek kullanılarak işlemi gerçekleştirildi. *kdr* gen bölgesi PZR işlemi daha önce gerçekleştirilen PZR karışımından farklı olarak yalnızca Cgd1 ve geri Cgd2 primerleri kullanılarak tek adımda gerçekleştirilmiştir. Kullanılan PZR koşulları daha önce belirtilen koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri % 1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonucunda net bantlar elde edilen amplifikasyon ürünleri dizileme yapılana kadar -20 °C koşulunda muhafaza edilmiştir.

3.3.4.2. *ace-1* Direnci Mutasyon Taraması

3.3.4.2.1. F290V Mutasyonu

F290V mutasyonunu direnç frekansını belirlenmesi için her bölgeden 50 örnek olacak şekilde toplam 1650 örneğin PZR işlemi gerçekleştirildi. PZR işlemi için Valdir (5'ACG CTG GGG ATC TGC GAG G3'), Valrev (5'TCC ACA ACC GGA ACG AAC GGA AA3'), CxEx5dir (5'GTC TGG CCG AGG CCG TCA3'), CxKrev2 (5'TGC TTC TGT GCG TGT ACA GG3') primer setleri kullanılmıştır (Weill vd., 2004; Alout vd., 2007b). PZR master mix içeriği 3 µL Buffer(10X), 3 µL MgCl₂ (25 mM), 1,5 µL 2.5 mM dNTP Mix, 1er µL her bir primerden (Valdir (20 µM), Valrev (20 µM), CxEx5dir (20 µM), CxKrev2(20 µM), 0,5 µL Taq DNA Polimeraz (5 U/ µL), 5 µL Kalıp DNA ve toplam hacim 25 µL olacak şekilde ddH₂O Biolabs® Taq polimeraz kiti kullanılarak hazırlanmıştır. PZR işlemi T100™ Thermal Cycler–Bio-Rad® PZR cihazı ile yapılmıştır. PZR reaksiyon koşulları başlangıç için 95 °C'de 15 dakika ve takip eden 30 döngü boyunca 94 °C'de 30 saniye, 51 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 40 saniye ve son olarak olarak 72 °C'de 5 dakika final uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen PZR'leri %1.5'luk agaroz jelde yürütüldükten sonra Alout vd., 2007b tarafından belirlenen ve Şekil 5'te verilen bant büyüklüklerine göre homozigot duyarlı, homozigot dirençli ve heterozigot dirençli olarak sınıflandırıldı.



Şekil 5. *ace-1* F290V gen bölgesinin yerleşimi ve agaroz jel elektroforezi görüntüsü

F290V mutasyonu varyasyonunun araştırılması için her bölgeden 10 ar örnek alınarak ikinci bir PZR işlemi gerçekleştirildi. PZR karışımında ilk karışımdan farklı olarak CxEx5dir ve CxKrev2 primerleri kullanılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri %1,5' lik agaroz jelde görüntüledikten sonra pozitif örnekler ile sekanslama yapılmıştır.

3.3.4.2.2. G119S Mutasyon Bölgesinin Çoğaltılması

ace-1 gen bölgesindeki G119S mutasyonunu direnç frekansının belirlenmesi için her bölgeden 10 örnek olacak şekilde PZR işlemi gerçekleştirildi. PZR işlemi için CxEx3dir (5'CGA CTC GGA CCC ACT GGT3') ileri ve CxEx3rev (5'GTT CTG ATC AAA CAG CCC CGC3') geri primerleri kullanılmıştır. PZR karışımı olarak 3 µL Buffer (10X), 3 µL MgCl₂ (25 mM), 1,5 µL 2.5 Mm dNTP Mix, 1'er µL her bir primerden (CxEx3rev (20 µM), CxEx3dir (20 µM), 0,5 µL Taq DNA Polimeraz (5 U/ µL), 5 µL Kalıp DNA ve toplam hacim 30 µL olacak şekilde ddH₂O Biolabs® Taq polimeraz kiti kullanılarak hazırlanmıştır. Reaksiyon döngüsü 95 °C'de 15 dakika başlangıç denatürasyonu, 94 °C'de 30 sn ve 60 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 saniye olacak şekilde 32 döngü yapılmıştır. Son uzama için 72 °C de beş dakika bekletildikten sonra reaksiyon sonlandırılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu döngüleri sonucunda elde edilmiş olan PZR ürünleri % 1,5'lik agaroz jelde 100 bazçiftlik (bç) DNA büyüklük

belirteci ile birlikte elektroforezi yapılmıştır. Elde edilen ve kontrolü yapılan amplifikasyon ürünleri dizileme yapılana kadar -20 °C koşulunda muhafaza edilmiştir.

3.3.5. Veri Analizleri

Doğal sivrisinek popülasyonlarında PASA yöntemi ile belirlenen frekanslar, GenAlEx (ver. 6.5) yazılımında Hardy-Weinberg beklentileri ile karşılaştırıldı. Yapay ve tarımsal alanlardan gelen frekanslar arasındaki farklar AMOVA testi kullanılarak incelenmiştir (Direnç kodonları kullanılarak Arlequin programında hesaplanmıştır). Ham dizi verileri Mega 7 programları ile işlenmiştir. Gen bölgelerindeki SNP mutasyon noktaları, Martinez-Torres vd. (1998), Alout vd. (2007a) ve Weill vd. (2004) tarafından incelenmiş ve SNP'lerin frekansları hesaplanmıştır.

4. SONUÇLAR

Çalışmada *Cx. pipiens* kompleksine aittoplam 1650 adet örnek ile çalışılmıştır. Toplanan *Cx. pipiens* kompleksi üyeleri tüm örnekleme noktalarından larva ve bazı bölgelerde ergin olarak toplanmıştır. Larva toplama alanlarında daha çok kullanılmış lastiklerin iç kısımları tercih edildi (yaklaşık %39,394). Diğer larva yaşam alanları ise su birikintileri, mermer, metal ve plastik kaplar, sulama kanalları ve gölet olarak seçildi.

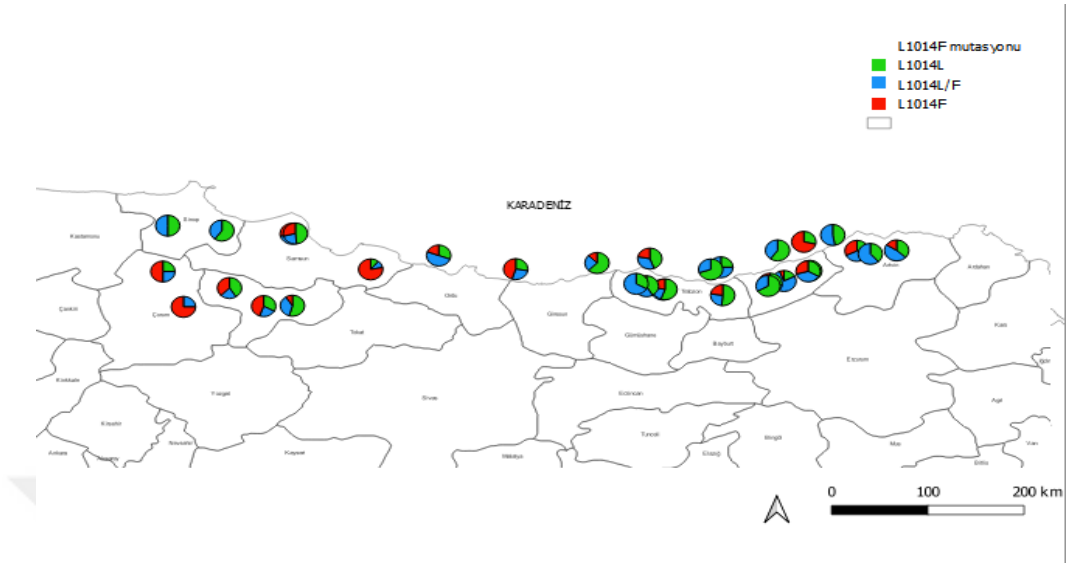
Morfolojik tanımlamaları yapılan *Cx. pipiens* örneklerimoleküler tanımlama içinagaroz jel üzerinde yürütölmüş ve yaklaşık 600 bç'lik bantlar ürettiği görölmüşür.

4.1. DDT ve Piretroid Direnç Mutasyonları

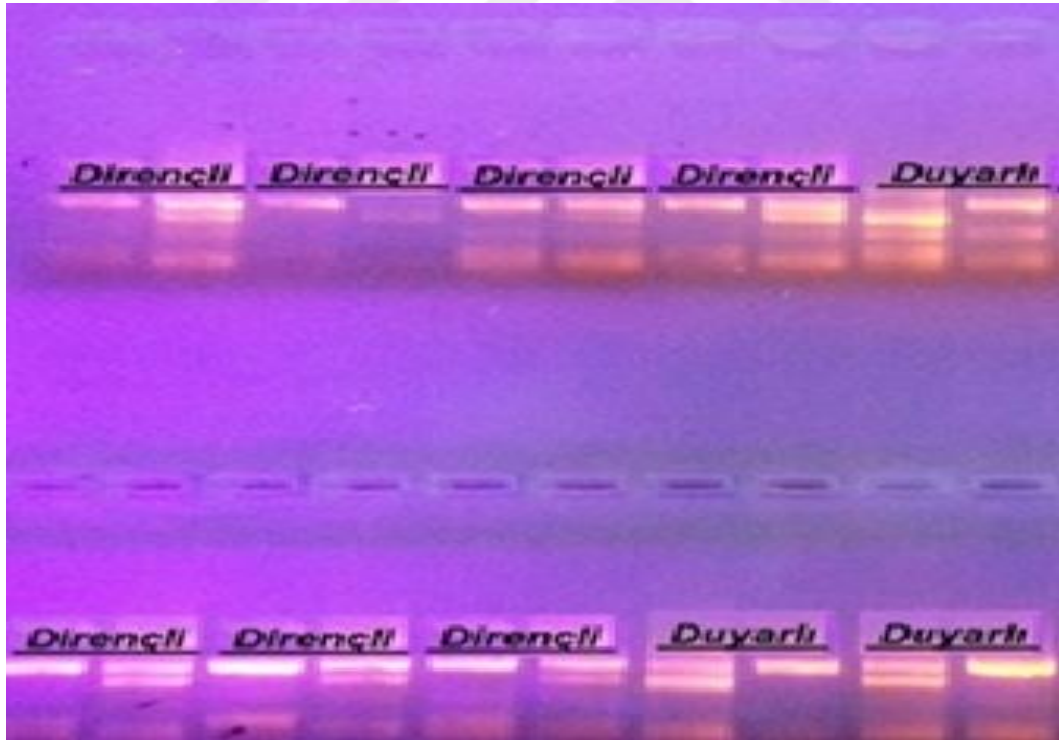
Culex pipiens kompleks türlerinde yaygınolarak görölen L1014F mutasyon taramaları, PASA yöntemi kullanılarak taranarak, taramalara ait örnek jel görüntöleri Şekil 7’de verilmiştir. Taramalar sonucunda, 8 ilden alınan 33 popölasyonunduyarlı tip, heterozigot ve homozigot olmak üzere üç alelinin tümü için farklı frekanslar içerdği göröldü. *kdr* duyarlı tip alelinde popölasyonların frekansı 0 ile 0,700 arasında yer aldı. En yüksek duyarlılık frekansı Arşin popölasyonunda, en düşük duyarlılık frekansı ise Dikmen popölasyonunda gözlenmiştir. Heterozigot frekans 0 ile 0,750 arasında değişirken, İyidere popölasyonu en yüksek heterozigot alel frekansına sahipti. Fındıklı popölasyonunda ise hiç heterozigot alel bulunmadı. Bazı popölasyonlarda ise (Borçka, Arhavi, Ardeşen, Pazar, İyidere, İkizdere, Arsine, Vakıfkebir, Boyabat ve Laçın popölasyonları) direnç alel frekansının sıfır olduğu göröldü. Popölasyon genotip frekanslarının çoğunun Hardy-Weinberg dengesine uygun olmadığı belirlendi ($p < 005$). Ayrıca, tüm popölasyonlarda dirence neden olan bir varyasyon varlığı doğrulanmıştır (Tablo 2, Şekil 6).

Tablo 2. *Culex pipiens*'te PASA yöntemine göre L1014 *kdr* mutasyonu için genotip ve varyant alel frekansları, Hardy-Weinberg dengesi (χ^2) ve P değerleri (n = 50).

İl	Bölge	N	Alel frekansları			VAF	χ^2	Pv
			L1014L	L1014L/F	L1014F			
Artvin	Artvin	50	0,36	0,47	0,15	0,39	0,00	0,95
	Hopa	50	0,26	0,41	0,32	0,52	1,39	0,23
	Borçka	50	0,38	0,61	0,00	0,30	9,87	0,00*
	Arhavi	50	0,47	0,52	0,00	0,26	6,48	0,01*
	Fındıklı	50	0,28	0,00	0,71	0,71	50,00	0,00*
	Ardeşen	50	0,55	0,44	0,00	0,22	4,08	0,04*
	Pazar	50	0,60	0,40	0,00	0,20	3,12	0,07
	Hamidiye	50	0,33	0,37	0,29	0,47	3,09	0,07
Rize	Çayeli	50	0,17	0,76	0,05	0,44	15,17	0,00*
	Rize	50	0,27	0,31	0,40	0,56	6,17	0,01*
	İyidere	50	0,25	0,75	0,00	0,37	18,00	0,00*
	İkizdere	50	0,66	0,33	0,00	0,16	2,00	0,15
	Sürmene	50	0,51	0,25	0,22	0,35	9,68	0,00*
	Arsin	50	0,70	0,30	0,00	0,15	1,55	0,21
	Sümela	50	0,25	0,50	0,25	0,50	0,00	1,00
	Trabzon	50	0,55	0,22	0,22	0,33	12,50	0,00*
Trabzon	Akçaabat	50	0,41	0,33	0,25	0,41	4,93	0,02*
	Çarşıbaşı	50	0,44	0,33	0,22	0,38	4,46	0,03*
	Vakfikebir	50	0,33	0,66	0,00	0,33	12,50	0,00*
Giresun	Görele	50	0,62	0,25	0,12	0,25	5,55	0,01*
Ordu	Turnasuyu	50	0,44	0,17	0,37	0,46	21,35	0,00*
	Gülyalı	50	0,27	0,27	0,45	0,58	9,35	0,00*
	Ünye	50	0,30	0,50	0,19	0,44	0,00	0,92
	Engiz	50	0,28	0,42	0,28	0,50	1,02	0,31
Samsun	Çarşamba	50	0,11	0,11	0,77	0,83	18,00	0,00*
	Bafra	50	0,48	0,22	0,29	0,40	14,08	0,00*
	Boyabat	50	0,50	0,50	0,00	0,25	5,55	0,01*
Sinop	Laçın	50	0,60	0,40	0,00	0,20	3,12	0,07
Çorum	Dikmen	50	0,00	0,25	0,75	0,87	1,02	0,31
	Osmancık	50	0,25	0,25	0,50	0,62	10,88	0,00*
	Merzifon	50	0,41	0,21	0,37	0,48	16,29	0,00*
Amasya	Amasya	50	0,54	0,36	0,09	0,27	0,34	0,55
	Saluca	50	0,33	0,22	0,44	0,55	15,12	0,00*



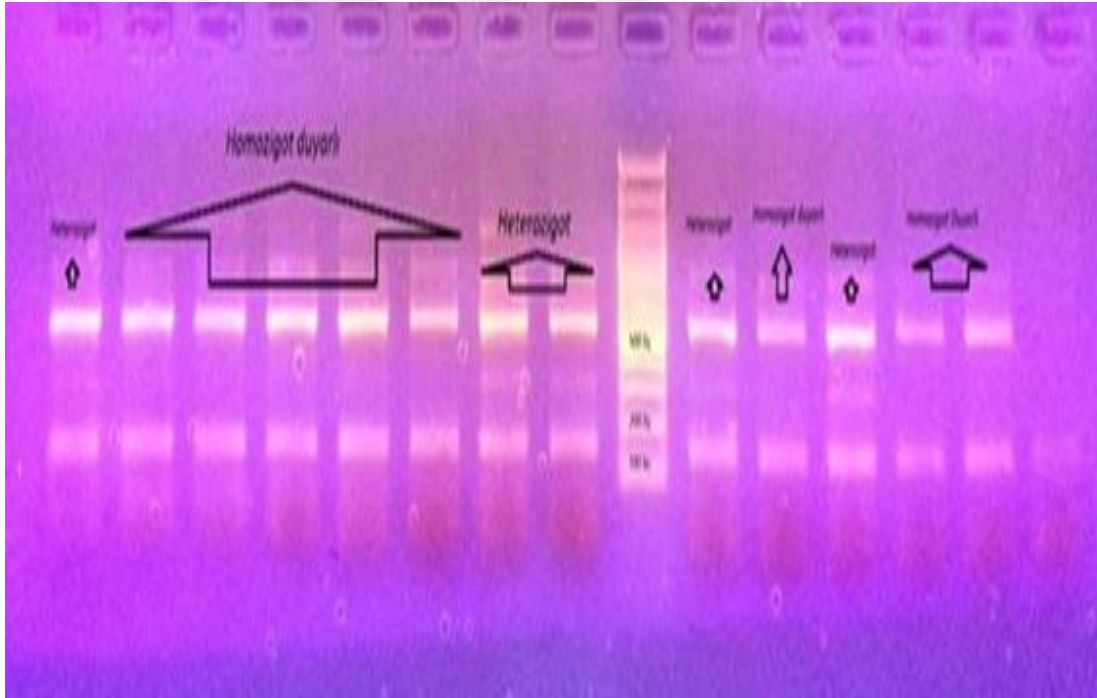
Şekil 6. *Culex pipiens*'te PASA yöntemine göre L1014 *kdr* mutasyonu dağılımları



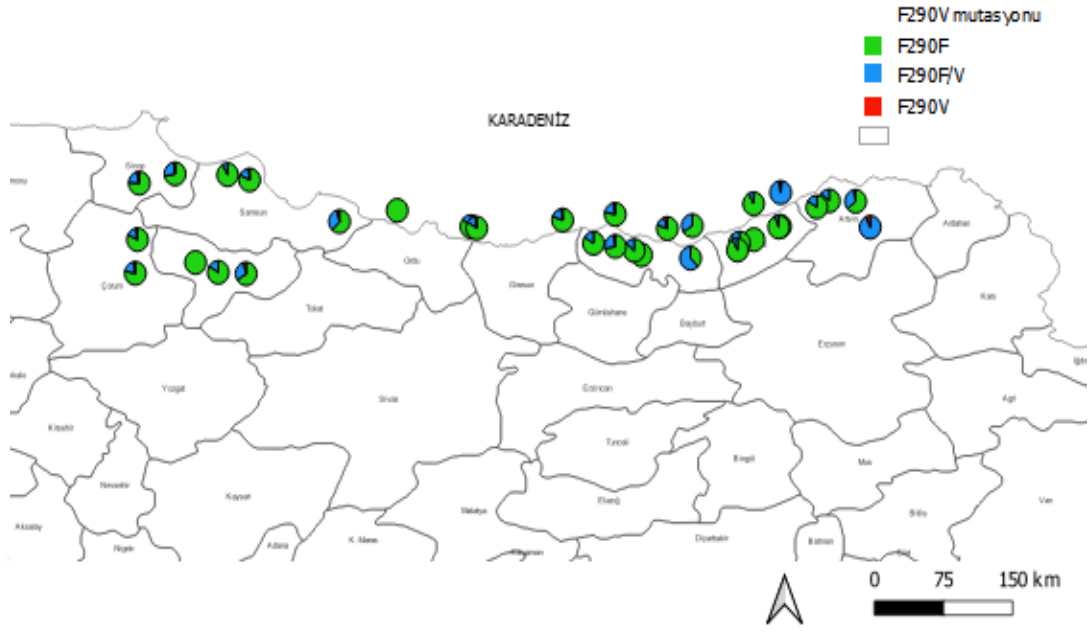
Şekil 7. *kdr* taraması amacıyla yapılmış olan PZR sonucunun %1,5'luk agaroz jel elektroforezi örnek görüntüsü (x ile işaretlenen örnek çiftleri değerlendirmeye alınmamıştır ve üst sırada Dirençli, alt sırada Duyarlı kontrol örneği kullanılmıştır).

4.2. Organofosfat/karbamat Direnç Mutasyonları

Organofosfat/karbamat direncine neden olan F290V mutasyonu taramaları PASA yöntemi kullanılarak yapıldı. F290V mutasyonuna ait örnek jel görüntüsü Şekil 8’de verilmiştir. Dirence ait dağılım frekansları haritası Şekil 9 da verilmiştir. Taramalarda, duyarlı tip alelin frekansının yüksek, dirençli alellerin frekansının ise oldukça düşük olduğu görülmüştür. Duyarlı tip alel frekanslarının genel olarak 0,6 ile 1 arasında değiştiği ve en yüksek duyarlı alel frekansının Ardeşen, Çayeli, Ünye ve Merzifon popülasyonlarında bulunduğu gözlemlendi. Dirençli alel frekansında 0 ile 0,05 arasında yığılma gözlemlendi, en yüksek dirençli alel frekansı Arşin popülasyonunda gözlemlenmiştir. Varyant alel Ardeşen, Çayeli, Ünye ve Merzifon popülasyonları dışında tüm popülasyonlarda bulunmuştur. Popülasyon genotip frekansları Fındıklı, Arsin ve Sürmene popülasyonları dışında Hardy-Weinberg dengesine uygun bulunmamıştır (Tablo 3).



Şekil 8. *ace-1* bölgesi F290V mutasyonu taraması amacıyla yapılmış olan PZR %1,5’luk agaroz jel elektroforezi örnek görüntüsü

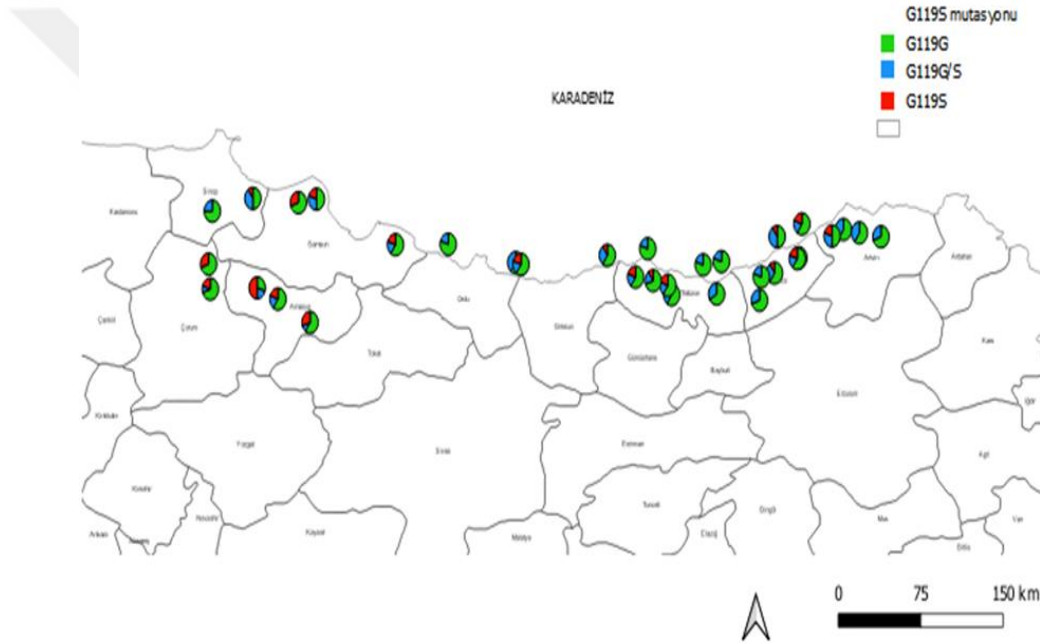


Şekil 9. *Culex pipiens*'te PASA yöntemine göre F290 *kdr* mutasyonu dağılımları

Tablo 3. PASA yöntemine göre *Cx. pipiens* kompleksinde F290 *ace* mutasyonu için genotip ve varyant alel frekansları Hardy-Weinberg dengesi (χ^2) ve P değerleri

İl	Bölge	N	Alel frekansları				χ^2	Pv
			F290F	F290F/V	F290V	VAF		
Artvin	Artvin	50	0,7	0,28	0,02	0,16	0,08	0,76
	Hopa	50	0,86	0,14	0,00	0,07	0,28	0,59
	Borçka	50	0,64	0,34	0,02	0,19	0,54	0,45
	Arhavi	50	0,84	0,16	0,00	0,08	0,37	0,53
	Fındıklı	50	0,02	0,96	0,02	0,50	42,32	0,00*
	Ardeşen	50	1	0,00	0,00	0,00	-	-
	Pazar	50	0,92	0,08	0,00	0,04	0,08	0,76
	Hamidiye	50	0,94	0,06	0,00	0,03	0,04	0,82
Rize	Çayeli	50	1	0,00	0,00	0,00	-	-
	Rize	50	0,86	0,14	0,00	0,07	0,28	0,59
	İyidere	50	0,66	0,34	0,00	0,17	2,09	0,14
	İkizdere	50	0,92	0,08	0,00	0,04	0,08	0,76
	Sürmene	50	0,38	0,62	0,00	0,31	10,09	0,00*
	Arsin	50	0,8	0,15	0,05	0,13	7,26	0,00*
	Sümela	50	0,68	0,28	0,04	0,18	0,13	0,71
	Trabzon	50	0,86	0,14	0,00	0,07	0,28	0,59
Trabzon	Akçaabat	50	0,72	0,26	0,02	0,15	0,01	0,89
	Çarşıbaşı	50	0,78	0,2	0,02	0,12	0,14	0,70
	Vakfikebir	50	0,84	0,16	0,00	0,08	0,37	0,53
	Giresun	50	0,8	0,18	0,02	0,11	0,32	0,56
Ordu	Turnasuyu	50	0,86	0,14	0,00	0,07	0,28	0,55
	Gülyalı	50	0,84	0,14	0,02	0,09	1,05	0,30
	Ünye	50	1	0,00	0,00	0,00	-	-
	Engiz	50	0,82	0,16	0,02	0,1	0,61	0,43
Samsun	Çarşamba	50	0,62	0,34	0,04	0,21	0,03	0,86
	Bafra	50	0,92	0,08	0,00	0,04	0,08	0,76
	Boyabat	50	0,76	0,2	0,04	0,14	1,43	0,23
Sinop	Laçın	50	0,72	0,26	0,02	0,15	0,01	0,89
	Dikmen	50	0,78	0,2	0,02	0,12	0,14	0,70
Çorum	Osmancık	50	0,82	0,16	0,02	0,1	0,61	0,43
	Merzifon	50	1	0	0,00	0,00	-	-
	Amasya	50	0,66	0,3	0,04	0,19	0,032	0,858
Amasya	Saluca	50	0,84	0,16	0,00	0,08	0,378	0,539

G119S mutasyon taraması, sekans analizi ile gerçekleştirildi. Duyarlı tip genotipin frekansı yüksek, dirençli alellerin frekansları ise oldukça düşük bulundu. Duyarlı tip genotip frekansları 0,3 ile 0,8 arasında değişmekte olup, en yüksek alel frekansı Rize, İyidere, Arşin, Çarşıbaşı, Ünye'de gözlenmiştir. Dirençli genotip frekansı 0,5'e kadar çıkmış ve en yüksek alel frekansı Merzifon popülasyonunda gözlenmiştir. Varyant aleli tüm popülasyonlarda bulunmuştur. Bafra, Dikmen, Osmancık ve Amasya popülasyonlarının dışında popülasyon genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uygun olmadığı görüldü (Tablo 4). Dirence ait frekans dağılım haritası ise Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 8. *Culex pipiens*'te PASA yöntemine göre G119S *ace* mutasyonu dağılımları

Tablo 4. Sekans verilerine göre *Cx. pipiens*'te G119 *ace-1* mutasyonu için genotip ve varyant alel frekansları (VAF) Hardy-Weinberg dengesi (χ^2) ve P değerleri (belirtilmedikçe n = 10)

İl	Bölge	Genotip frekansları			VAF	χ^2	P
		G119G	G119G/S	G119S			
Artvin	Artvin	0.70	0.30	0.00	0.15	0.31	0.57
	Hopa	0.60	0.40	0.00	0.20	0.62	0.42
	Borçka	0.60	0.40	0.00	0.20	0.62	0.42
	Arhavi	0.50	0.30	0.20	0.35	1.16	0.28
	Fındıklı	0.60	0.20	0.20	0.30	2.74	0.09
	Ardeşen	0.50	0.30	0.20	0.35	1.16	0.28
	Pazar	0.50	0.40	0.10	0.30	0.02	0.88
	Hamidiye	0.60	0.20	0.20	0.30	2.74	0.09
	Çayeli	0.60	0.30	0.10	0.25	0.40	0.52
	Rize	0.80	0.20	0.00	0.10	0.12	0.72
Rize	Iyidere	0.80	0.20	0.00	0.10	0.12	0.72
	Ikizdere	0.70	0.30	0.00	0.15	0.31	0.57
	Sürmene (n = 9)	0.66	0.33	0.00	0.16	0.36	0.54
	Arsin	0.80	0.20	0.00	0.10	0.12	0.72
	Sümela	0.60	0.20	0.20	0.30	2.74	0.09
Trabzon	Trabzon	0.60	0.20	0.20	0.30	2.74	0.09
	Akçaabat	0.70	0.20	0.10	0.20	1.41	0.23
	Çarşıbaşı	0.80	0.20	0.00	0.10	0.123	0.72
	Vakfikebir	0.60	0.20	0.20	0.30	2.74	0.09
	Görece	0.60	0.30	0.10	0.25	0.40	0.52
Giresun	Turnasuyu	0.60	0.40	0.00	0.20	0.62	0.42
	Gülyalı	0.60	0.20	0.20	0.30	2.74	0.09
	Ünye	0.80	0.20	0.00	0.10	0.123	0.72
	Engiz	0.50	0.30	0.20	0.35	1.16	0.28
	Çarşamba	0.60	0.20	0.20	0.30	2.74	0.09
Samsun	Bafra	0.70	0.00	0.30	0.30	10.0	0.00*

Tablo 4. (devam) Sekans verilerine göre *Cx. pipiens*'te G119 *ace-1* mutasyonu için genotip ve varyant alel frekansları (VAF) Hardy-Weinberg dengesi (χ^2) ve P değerleri (belirtilmedikçe n = 10)

İl	Bölge	Genotip frekansları			VAF	χ^2	P
		G119G	G119G/S	G119S			
Sinop	Boyabat (n = 9)	0.66	0.22	0.00	0.22	1.15	0.28
	Laçın	0.50	0.40	0.10	0.30	0.02	0.88
	Dikmen	0.70	0.10	0.20	0.25	5.38	0.02*
Çorum	Osmancık	0.70	0.00	0.30	0.30	10.0	0.00*
Amasya	Merzifon	0.30	0.20	0.50	0.60	3.40	0.06
	Amasya	0.60	0.10	0.30	0.35	6.09	0.01*
	Saluca	0.60	0.20	0.20	0.30	2.74	0.09

4.3. Mutasyon Kombinasyonları

İnsektisit direnci ile ilişkili olan *kdr* için L1014 ve *ace-1* için G119 ile F290 lokusları incelendiğinde L1014F mutasyon noktasında altı farklı genotip kombinasyonu belirlendi. Tüm konumlar için, TTA (lösin) kodonu en yüksek frekansa (0,679) sahipken, TTA/C (lösin/fenilalanin), TTG (lösin), TTT/G (fenilalanin/lösin) kodonlarının frekansları oldukça düşük olup değerleri sırasıyla 0,009, 0,006 ve 0,009 olarak gözlemlendi. Ayrıca lösin amino asitini kodlayan TTG kodonu sessiz bir mutasyon olarak izlendi. Belirlenen gen kombinasyonlarının frekansları Tablo 5'te verilmiştir.

Ace-1 geninin G119S bölgesinde dört farklı kodon belirlendi. Tüm diziler arasında GGC (glisin) kodon ve AGC (serin) kodon frekansları takip edilerek değerlerinin sırasıyla 0,709 ve 0,079 olduğu görüldü. Nokta mutasyonunun heterozigot frekansının (RGC) 0,176 olduğu, ATC ve ARC mutasyonlarının sıklığının ise popülasyonda oldukça düşük ve sırasıyla 0,018 ve 0,015 değerlerine sahip olduğu izlendi. Glisin/izolösin (6 popülasyon) ve glisin/asparagin (5 popülasyon) ikame frekansları oldukça düşük ve belirlenen tüm popülasyonlar için 0,1 civarında bulundu. Bu tür ikameler ilk olarak G119 lokusunda tanımlanmış, diğer *ace-1* geninde bulunan ve dirence neden olan F290V mutasyon noktasında ise TTT (fenilalanin) ve G/TTT (valin/fenilalanin) kodon kombinasyonları belirlenmiş ve mutasyonların frekans değerlerisırasıyla 0,842 ve 0,158 olarak bulundu (Tablo 5).

Tablo 5. *kdr* L1014F ve *ace-1* G119S, F290V mutasyon sitelerindeki kodon kombinasyonları ve bunların frekansları (W:A veya T, M:A veya C, K:G veya T ve R:A veya G; n = konum başına 10)

Bölge	L1014F						G119S				F290V		
	TTA	TTW	TTT	TTM	TTG	TTK	GGC	AGC	RGC	ATC	ARC	TTT	KT
Artvin	0.4	0.3	0.1	-	0.1	0.1	0.8	-	0.1	0.1	-	0.8	0.2
Hopa	0.7	0.3	-	-	-	-	0.7	-	0.2	-	0.1	0.9	0.1
Borçka	0.5	0.3	0.1	-	-	0.1	0.8	-	0.2	-	-	0.9	0.1
Arhavi	0.7	0.3	-	-	-	-	0.6	0.1	0.2	0.1	-	0.9	0.1
Fındıklı	0.2	0.7	0.1	-	-	-	0.8	-	0.2	-	-	0.8	0.2
Ardeşen	0.9	0.1	-	-	-	-	0.5	0.2	0.3	-	-	1.0	-
Pazar	0.8	0.2	-	-	-	-	0.6	0.1	0.3	-	-	0.9	0.1
Hamidiye	0.8	0.1	0.1	-	-	-	0.7	0.1	0.2	-	-	0.8	0.2
Çayeli	0.9	0.1	-	-	-	-	0.6	0.1	0.3	-	-	1.0	-
Rize	0.7	0.2	-	0.1	-	-	0.8	-	0.2	-	-	0.8	0.2
İyidere	0.5	0.2	0.2	0.1	-	-	0.8	-	0.2	-	-	0.7	0.3
İkizdere	1.0	-	-	-	-	-	0.8	-	0.2	-	-	0.8	0.2
Sürmene	0.4	0.5	-	0.1	-	-	0.7	-	0.2	-	0.1	0.6	0.4
Arsin	0.8	0.1	0.1	-	-	-	0.8	-	0.2	-	-	0.9	0.1
Sümela	0.6	0.2	0.2	-	-	-	0.7	0.1	0.1	0.1	-	0.7	0.3
Trabzon	0.7	0.2	0.1	-	-	-	0.7	0.2	0.1	-	-	0.9	0.1
Akçaabat	0.6	0.3	0.1	-	-	-	0.8	-	0.1	-	0.1	0.7	0.3
Çarşıbaşı	0.7	0.2	0.1	-	-	-	0.9	-	0.1	-	-	0.8	0.2
Vakfikebir	0.8	0.2	-	-	-	-	0.7	0.1	0.2	-	-	0.8	0.2
Görele	0.7	0.3	-	-	-	-	0.8	-	0.2	-	-	0.7	0.3
Turnasuyu	0.7	0.2	0.1	-	-	-	0.8	-	0.1	-	0.1	0.8	0.2
Gülyalı	0.7	0.2	0.1	-	-	-	0.7	-	0.3	-	-	0.9	0.1
Ünye	0.9	0.1	-	-	-	-	0.8	-	0.2	-	-	1.0	-
Engiz	0.7	0.2	0.1	-	-	-	0.6	0.1	0.3	-	-	0.9	0.1
Çarşamba	0.5	0.4	0.1	-	-	-	0.6	0.2	0.2	-	-	0.7	0.3
Bafra	0.6	0.2	-	-	0.1	0.1	0.8	0.1	-	-	0.1	1.0	-
Boyabat	0.5	0.4	0.1	-	-	-	0.8	-	0.1	-	-	0.7	0.3
Laçın	0.6	0.3	0.1	-	-	-	0.5	0.1	0.3	0.1	-	0.8	0.2
Dikmen	0.6	0.2	0.2	-	-	-	0.7	0.2	0.1	-	-	0.8	0.2
Osmancık	0.5	0.3	0.2	-	-	-	0.8	0.2	-	-	-	0.9	0.1
Merzifon	1.0	-	-	-	-	-	0.5	0.3	0.1	0.1	-	1.0	-
Amasya	0.8	0.1	0.1	-	-	-	0.6	0.3	0.1	-	-	0.9	0.1
Saluca	0.9	-	0.1	-	-	-	0.6	0.1	0.2	0.1	-	1.0	-
Total	0.67	0.22	0.07	0.00	0.00	0.00	0.70	0.07	0.17	0.01	0.01	0.84	0.15

4.4. AMOVA Analizleri

Seviye 1'deki Corine arazi örtüsünde *kdr* ve *ace-1* direncini belirlemek için AMOVA analizi yapıldı. Gruplar arası *kdr* direnci varyans bileşeni analizi düşük (%0.61) ve FCT mesafesi 0.24242 (P > 0.05) bulundu. Popülasyonlar arasındaki farkın yüksek olduğu ve FST değerinin %75,3 gibi düşük bir mesafe ortaya koyduğu görüldü (P < 0,005). Seviye 1 sonuçlarında Corine arazi örtüsünde *ace-1* F290V bölge direnci ile yapılan AMOVA analizi, *kdr* direnç analizi ile benzerlik göstermiştir. Gruplar arası varyans -%0,98 ve FCT değeri 0,21798 (P > 0,05) olarak izlendi.

Popülasyonlar arasındaki varyans bileşeni gruplar içinde ve popülasyonlar içinde sırasıyla 0,00343 (%21,0) ve 0,01229 (%79,0) olarak alınırken FSC ve FST değerleri sırasıyla 0,21032 ve -0,00980 alındı ($P > 0,05$). G119S için bölge analizinin, gruplar ve popülasyonlar arasında herhangi bir önemli farklılık ortaya çıkarmadığı görüldü. FCT, FSC ve FST istatistikleri, test edilen konumlar arasında en düşük olanıydı ve aralarında önemli bir fark bulunmadı (Tablo 6).

Tablo 6. *Culex pipiens* L1014F ve F290V, G119S mutasyonlarının iki grubunun (yapay alanlar ve tarım alanları) Moleküler Varyans Analizi (AMOVA)

Çapraz karşılaştırma	Varyans bileşenleri (varyasyonun yüzdesi)			F-statistiği		
	Gruplar arasında	Gruplar içindeki popülasyonlar arasında	Popülasyonlar içinde	FCT	FSC	FST
L1014F	0.00 (0.61%)	0.02 (24.9%)	0.07 (75.3%)	0.24	0.24*	0.00*
F290V	-0.00 (-0.98%)	0.00 (21.0%)	0.01 (79.0%)	0.21	0.21*	-0.00*
G119S	-0.00 (-0.64%)	0.00 (0.29%)	0.08 (100%)	0.00	0.00	-0.00

5. TARTIŞMA

Culex pipiens, insanlarda kan emme yoluyla rahatsızlık oluşturan ve insan ve hayvan sağlığı için önemli olan birçok patojenin vektörüdür. Bu nedenle vektör kontrol çalışmaları genellikle birçok alanda bu türü hedef almaktadır. Bununla birlikte, vektör kontrol çalışmaları insektisit direncinin gelişimine neden olmaktadır. Bu türün insektisit direncinin belirlenmesi bu türle yapılacak olan ya da yapılması planlanan saha uygulamalarının daha etkili sonuçlar vermesine yardımcı olacaktır. Tarımsal amaçlı insektisit uygulamaları birçok tarım alanında sivrisinek türleri için seleksiyon baskısını desteklemiştir (Awolola vd., 2007; Akıner vd., 2013). Benzer şekilde hem vektörel mücadele hemde verdikleri rahatsızlık sebebiyle kentsel alanlarda kullanılan insektisitler de bu bölgelerdeki ve göç edebildiği alanlardaki insektisit seçim baskısını arttırmaktadır. Gerek tarımsal zararlılar gerekse vektör mücadelesinde Piretroit, organofosfat ve karbamat grubu insektisitler sıklıkla tercih edilen insektisitlerdir. DDT ve diğer organoklorlu insektisitler ise geçmişte böcek mücadelesinde kullanılmış insektisitlerdir. Ancak bu alanlarda kullanılan insektisit miktarları ve çeşitleri arasında ne şekilde farklılıklar bulunduğu bilinmemektedir. Bu nedenle, farklı alanlardan gelen insektisit seçim baskısına göre farklı alanlarda vgsc ve *ace-1* gen frekansları farklı olacaktır. Yapılan bu çalışmada Türkiye'nin Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki *Cx. pipiens* kompleks türlerinde insektisit direnci ile ilgili vgsc ve *ace-1* genlerindeki mutasyonlar araştırıldı. İkinci olarak, insektisit direnci ile ilgili farklı alellerin frekansların yapay (insan tarafından inşa edilen veya değiştirilen) alanlar ve tarım alanlarındaki olası farklılıkları karşılaştırıldı. Ek olarak, insektisit direnci ile ilgili genetik lokuslarda yeni mutasyon tiplerinin varlığı araştırıldı.

Voltaj kapılı sodyum kanalları, hücre zarının elektiriksel potansiyelinin ayarlanmasından sorumludur (Yu ve Catterall, 2003). Kanal proteini kodlayan gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlar böceklerde dirence neden olmaktadır. Günümüzde 50 den fazla sodyum kanal proteini genlerinde nokta mutasyonu belirlenmiştir (Dong vd., 2014; Rinkevich vd., 2013). Ancak bu nokta mutasyonlarından *Culex pipiens* türlerinde de görülen 1014. pozisyondaki lösini kodlayan TTA kodonunun; fenilalanini kodlayan TTT, serini kodlayan TCA, sisteini kodlayan TGT kodonlarına dönüşmesi ile ortaya çıkan knockdown direncien çok bilinen direnç tipidir (Scott vd., 2015; Tmimi vd., 2018). L1014F mutasyonu ilk olarak

Piretroid grubu insektisitler ve DDT ile ilgili *Musca domestica* L.'de keşfedilmiştir (Chandrasiri vd., 2020). İlerleyen yıllarda pek çok böcek türünde bu mutasyon belirlenmiştir ve dirence neden olduğu kesin olarak bilinmektedir (Rinkevich, 2013; Demirtaş, 2017; Martinez-Torres vd., 1998; Scott vd., 2015; Shi vd., 2015; Bkhache vd., 2019; Wang vd., 2015; Taşkın vd., 2016). Yerel ve bölgesel ölçeklerde piretroid ve DDT direnci ile ilgili farklı alel kombinasyonlarının frekansları hakkında temel verilerin elde edilmesi önemlidir (Wang vd., 2012). Bununla birlikte duyarlı tip olarak bilinen ve lösini kodlayan Vgsc L1014 (TTA) kodonunun, tüm popülasyonlardavarlığı belirlenmiş ve farklı çalışmalarda elde edilen sonuçlarda alel frekansları farklı popülasyonlarda farklılık göstermiştir (Martinez-Torres vd., 1998; Scott vd., 2015; Shi vd., 2015; Wang vd., 2015; Bkhache vd., 2019; Taşkın vd., 2016).

Tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarımız içerisinde, duyarlı tip ve dirençli tip olmak üzere genotipler içerisinde üç farklı sessiz mutasyon belirlenmiştir. Bu sessiz mutasyonlardan biri lösini kodlayan TTA kodonunun yine lösini kodlayan TTG kodonuna dönüşmesiyle oluşan sessiz mutasyondur ve homozigot olarak bulunmaktadır. Diğer sessiz mutasyon ise dirençli tip fenotipe sebep olan ve fenil alanini kodlayan TTT kodonunun yine fenil alanini kodlayan TTC kodonuna dönüşmesiyle oluşan mutasyondur ve heterozigot olarak bulunmaktadır. Her ne kadar çalışmamızda bulunan bu sessiz mutasyon tipleri önemsiz olarak görülse de zamanla bu kodonlarda ortaya çıkacak olan yeni mutasyonlar bu kodonların yeni amino asitleri kodlamasına neden olabilir. Çalışmada 1014 noktasında *kdr* direnci ile ilgili 4 farklı kodon tipi belirlendi ve bunlar TTA homozigot duyarlı, TTW (A/T) heterozigot dirençli, TTT homozigot dirençli, sessiz mutasyonlu heterozigot dirençli TTM (A/C) ve duyarlı sessiz mutasyonlu homozigot TTG ve sessiz mutasyonlu heterozigot dirençli TTK (G/T) genotipleridir. Ponce vd. (2016), *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae) popülasyonlarında sistein, histidin, serin veya triptofan ile çeşitli ikameler bildirmiştir. Sonuçlarımız altı tip genotip ortaya çıkarsa da, genotipler yalnızca iki tip amino asit çeşidi ortaya çıkarmaktadır. Elde edilen sonuçlarımızda A nükleotidi T nükleotidine, A nükleotidi C nükleotidine ve A nükleotidi G nükleotidine dönüştüğü mutasyon tipleri saptanmış olup bu mutasyon tiplerinden A nükleotidinden T nükleotidine dönüşümün olduğu mutasyon tipinin frekansı yüksek bulunmuştur. Roberts ve Andre (1994), Sri Lanka'da *Cx quinquefasciatus*'te A nükleotidinden

Cnükleotidine dönüşümün olduğu mutasyonların baskın olduğunu bildirmesine rağmen, Chandrasiri ve arkadaşları (2020), daha sonraki yıllarda yaptıkları çalışmada Sri Lanka’da *Cx. quinquefasciatus* popülasyonlarında Adenin nükleotidinden Timin nükleotidine dönüşümün olduğu mutasyonların baskın olduğunu buldu. Bu sonuçlar, mutasyon frekanslarının zamanla değişebileceğini ve insektisit direncinin dinamik bir süreç olduğunu göstermiştir. Ayrıca Taşkın ve arkadaşları (2016) Türkiye’de yaptıkları çalışmalarda *Cx. pipiens* popülasyonlarında da 1014. kodonun üçüncü konumundaki Anükleotidinden T nükleotidine ve Anükleotidinden Cnükleotidine dönüşümün olduğu mutasyon tiplerinin varlığını görmüşler ve ayrıca yaptıkları çalışmalarında Anükleotidinden T nükleotidine dönüşümün olduğu mutasyon tipinin baskın mutasyon tipi olduğunu belirtmişlerdir. Lösini kodlayan TTG kodon mutasyonu, çalışmanın bazı popülasyonlarında (Artvin, Borçka ve Bafra popülasyonları) homozigot ve heterozigot olarak belirlendi. Bu sessiz mutasyon tipi önceki çalışmalarda da Çin’de *Anopheles sinensis* (Wiedemann, 1828) (Diptera: Culicidae)’de tespit edilmiştir (Zhong vd., 2013; Wang vd., 2015). Bununla birlikte, *Cx.pipiens* kompleks türlerinde bu mutasyon tipine ilişkin daha önce bir rapor bulunmamaktadır. Duyarlı alelin (L1014L) ortalama frekansı, çalışmamızda nispeten yüksekti (0.2-0.9). Heterozigot ve homozigot direnç tipi alellerin sıklığı, Türkiye’deki Orta ve Doğu Karadeniz popülasyonlarında orta veya düşük düzeyde dirençle desteklenebilir. Taşkın ve arkadaşları (2016), Türkiye’de Ege Bölgesi *Cx. pipiens* popülasyonlarında bu iki tip mutasyonun (L1014F ve L1014C) frekanslarının yüksek olduğunu bildirdi. Ancak Ege Bölgesi’nde yüksek frekansta bulunan L1014C mutasyon tipi Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi *Cx. pipiens* popülasyonlarında belirlenememiştir. Taşkın ve diğerleri, (2016) Türkiye’deki *Cx. pipiens* kompleksi türlerinde *kdr* direncinin önemli bir insektisit direnci mekanizması olabileceğini belirtmişlerdir.

Çalışılan popülasyonlardaki *kdr* alel frekansları genel olarak Hardy-Weinberg beklentisi için uygun değildi ve fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P < 0.05$). Bu durum, bu alanlardaki direnç seçilim baskısı ile ilişkilendirilebilir. Borçka, Arhavi, Ardeşen, İyidere, Vakfikebir, Boyabat ve Çayeli popülasyonlarında homozigot dirençli genotip frekansları sıfır veya oldukça düşük, heterozigot genotip frekansları ise yüksek bulunmuştur. Bu durum, bu konumlarda bir denge seçilimi olduğunu

gösterebilir. Yüksek dirençli genotip frekansları (Rize, Gülyalı, Fındıklı, Çarşamba ve Osmancık popülasyonları) bu alanlarda seleksiyon baskısının devam etmesini açıklayabilir. Düşük veya orta düzeyde L1014F mutasyonları, DDT'nin Türkiye'de sıtma eradikasyonu kampanyası ve birçok alanda tarım için uzun süreli kullanımını gösterebilir. Taşkın ve arkadaşları (2016), aynı durumu Türkiye'nin Ege Bölgesi'nde yaptıkları çalışmalarında yüksek frekansta başka bir mutasyon olan L1014C'yi bularak bildirmişlerdir. Bu sonuçları permethrin ve bu alanlarda başka bir yeni insektisit (piretroid) kullanımı ile ilişkilendirdiler. Ek olarak, uzun süreli ve aşırı piretroid kullanımının ve o bölgedeki *Cx. pipiens*'e karşı aşırı seçim baskısının öneminden bahsettiler.

ace-1 bölgesinde organofosfat ve karbamat direnci ile ilgili üç farklı mutasyon tanımlanmıştır (Massouli vd., 1992). Sivrisineklerde (*Cx.pipiens* dahil) en yaygın direnç mutasyon tipi, katalitik bölge etrafındaki *ace-1* gen bölgesinde G119S olarak tanımlanmıştır (Weill vd., 2003). F290V mutasyonu, *Cx. pipiens*'te Kıbrıs ve Akdeniz bölgelerinde birkaç kez belirlendi (Wirth ve Georghiou, 1996; Alout vd., 2009; Osta vd., 2012; Taşkın vd., 2016) Başka bir nokta mutasyonu (F331W) Direnç ile ilgili Doğu Asya'da bulunan *Culex tritaeniorhynchus* (Giles, 1901) (Diptera: Culicidae) popülasyonlarında tanımlanmıştır (Nabeshima vd., 2004; Alout vd., 2007a,b). Çalışmamızda *ace-1* G119 pozisyonunda dört kombinasyon bulundu: GGC (glisin) homozigot duyarlı, AGC (serin) homozigot dirençli, RGC (GGC/AGC) heterozigot dirençli ve izolösün ile serin, asparagin ARC (AGC) kodlayan farklı kodon kombinasyonları /AAC). Dört kombinasyon bulunmasına rağmen, homozigot duyarlı frekanslar baskındı (0.709). Homozigot dirençli frekanslar, test edilen popülasyonların yaklaşık yarısı kadar bulundu, ancak frekanslar oldukça düşük olarak bulunmuştur (0,079). Artvin, Hopa, Borçka, Bafra ve Osmancık dışındaki tüm popülasyonlarda heterozigot dirençli genotipler tespit edildi. İzolösün (ATC) veya asparagin/serin (AAC/AGC) kodlayan diğer türlerin frekansları oldukça düşük olarak saptanmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda *Cx. pipiens* ve diğer sivrisinek türlerinde, GGC kodonunun frekansının yüksek, AGC kodonunun frekansının düşük olduğunu bildirmişlerdir (Alout vd., 2007b; Dabire vd., 2014; Taşkın vd., 2016; Major vd., 2020). Sonuçlarımız Akdeniz ülkelerinde yapılan çalışmaların bulguları ile uyumludur (Osta vd., 2012; Kioulos vd., 2014). Bulunan yüksek mutasyon frekansları, Akdeniz Havzası

çevresindeki böcek öldürücü müdahalelerin geçmişini yansıtabilir ve muhtemelen seçim baskısının hala devam ettiğini işaret etmektedir. Taşkın ve arkadaşları (2016) aynı durumu Türkiye'nin Ege Bölgesi'nde anlatmışlardır. Ayrıca *Cx. pipiens* ve diğer sivrisinek türleri ile ilgili diğer çalışmalarda belirlenen ATC ve AAC kodonları için herhangi bir kayda rastlanmamıştır. Yeni kodon tipinin tür üzerindeki etkisinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu bakımdan insektisit direncine katkıları araştırılmalıdır. *ace-1* gen kombinasyonu F290V'de ikinci mutasyon çalışma alanında gözlenmiştir. Bu mutasyon tipleri Kıbrıs'ta *Cx. pipiens* popülasyonlarında belirlenmiştir. (Alout vd., 2007b; Alout vd., 2009). G119S mutasyonu tüm dünyada tanımlanmış olmasına rağmen, F290V Yunanistan, Fas, Tunus ve Türkiye gibi Akdeniz ülkelerinde nadiren kaydedilmiştir (Alout vd., 2007b; Kioulous vd., 2014; Ben Cheikh vd., 2019; Taşkın vd., 2016; Arich vd., 2021). Bu çalışmada organofosfat/karbamat direncine neden olan F290 mutasyon noktasında iki farklı kodon kombinasyonu tanımlanmıştır ve bu kombinasyonlar TTT kodonu (duyarlı tip) ve valini kodlayan GTT kodonu (dirençli tip) olmuştur. TTT kodonunun tüm popülasyonlardaki sıklığı yüksek ve değeri 0,842 idi. GTT kodonu popülasyonlarda sadece heterozigot olarak saptanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar, Türkiye'nin Ege Bölgesi'nde elde edilen sonuçlarla korelidir (Taşkın vd., 2016). Tüm *ace* mutasyonları için, incelenen popülasyonlar aşırı heterozigot eğilimi göstermektedir. Bazı yazarlar tarafından da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Taşkın vd., 2016; Arich vd., 2021).

Sonuçlarımız, insektisit direnciyle ilgili farklı derecelerde hedef bölge mutasyonunun varlığını ortaya çıkarmıştır. Hedef bölge mutasyonları alanda heterozigotluk göstermektedir ve mutasyonların derecesi alanda hala düşük görülmektedir. Bu durum, insektisit direncinin doğası gereği gelecekte arazide yapılacak kontrol uygulamaları için sorunlara neden olacaktır. Elde edilen direnç frekansları ile yapılan AMOVA analizlerinde yapay sahalar ile tarım arazileri arasındaki direnç farklarının düşük olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, popülasyonlar arasında önemli farklılıklar vardı. Bu durum, insektisit direncinin alan bazında farklılık göstermediğini (insan ve tarım alanlarının değiştirilmesiyle inşa edilmiş/değiştirilmiş veya geçici yetiştirme alanları) ve insektisit direncinin, alanlarda insektisit kullanılıp kullanılmadığına bağlı olarak farklılık gösterebileceğini ifade etmektedir.

KAYNAKÇA

- Akiner, M. M. (2009). Sivrisineklerde direnç tespiti ve direnç gelişimini sağlayan enzimatik mekanizmaların araştırılması. Doktora Tezi. *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara 109 s.
- Akiner, M. M., ve Ekşi, E. (2015). Evaluation of insecticide resistance and biochemical mechanisms of *Culex pipiens* L. in four localities of east and middle mediterranean basin in Turkey. *International Journal of Mosquito Research*, 2(3), 39-44.
- Akiner, M. M., Çağlar, S. S., ve Şimşek, F. M. (2013). Yearly changes of insecticide susceptibility and possible insecticide resistance mechanisms of *Anopheles maculipennis* Meigen (Diptera: Culicidae) in Turkey. *Acta tropica*, 126(3), 280-285.
- Akiner, M. M., Öztürk, M., Başer, A. B., Günay, F., Hacıoğlu, S., Brinkmann, A., Emanet, N., Alten, B., Özkul, A., Nitsch, A., Linton, Y. M., ve Ergünay, K. (2019). Arboviral screening of invasive Aedes species in northeastern Turkey: West Nile virus circulation and detection of insect-only viruses. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(5), e0007334.
- Aldemir, A. (2003). Ankara-Gölbaşı'nda Sivrisineklere Karşı Entegre Mücadele. Doktora Tezi. *Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, Türkiye, 188 s.
- Alout, H., Berthomieu, A., Cui, F., Tan, Y., Berticat, C., Qiao, C. L., ve Weill, M., (2007a). Different amino-acid substitutions confer insecticide resistance through acetylcholinesterase 1 insensitivity in *Culex vishnui* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) from China. *Journal of Medical Entomology*, 44(1), 463e469.
- Alout, H., Berthomieu, A., Hadjivassilis A., ve Weill, M.(2007b). A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(1), 41-47.
- Alout, H., Djogbénou, L., Berticat, C., Chandre, F., ve Weill, M. (2008). Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetylcholinesterase 1 biochemical properties. *Biochemistry and Molecular Biology*, 150(3), 271-277.
- Alout, H., Labbe, P., Berthomieu, A., Pasteur N., ve Weill, M. (2009). Multiple duplications of the rare ace-1 mutation F290V in *Culex pipiens* natural populations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(1), 884-891.
- Alten, B. (1991). Türkiye Sivrisineklerinin Morfolojik Özellikleri, Sağlık Önemleri, Biyolojileri, Biyo-Ekolojileri ve Dağılımları”, H.Ü. Mühendislik Fakültesi,

"Kentlerde Ev Zararlıları ile Mücadele" Semineri. Seminer Özel kitabı, 6-43, 25-26, Beytepe-Ankara.

- Alten, B., ve Çağlar, S.S. (1998). Vektör Ekolojisi ve Mücadelesi. T.C. Sağlık bakanlığı, Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü., Bizim Büro Basımevi, Ankara. 242 s.
- Aranda, C., Eritja, R., Schaffner, F., ve Escosa, R. (2000). *Culex (Culex) torrentium* Martini (Diptera: Culicidae) a new species from Spain. *Journal of the European Mosquito Control Association European Mosquito Bulletin*, 8, 7-9.
- Arcan, P., Topciu, V., Rosiu, N., ve Csaky, N. (1974). Isolation of Tahyna virus from *Culex pipiens* mosquitoes in Romania. *Acta Virologi*, 18 (2), 175.
- Ari, A. (1972). Studies on activity and ecology of arboviruses in Turkey. *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 32(1), 134-143.
- Arich, S., Assaid, N., Taki, H., Weill, M., Labbé P., ve Sarih, M. H.(2021). Distribution of insecticide resistance and molecular mechanisms involved in the West Nile vector *Culex pipiens* in Morocco. *Pest Management Science*, 77(3), 1178-1186.
- Awolola, T. S., Oduola, A. O., Oyewole, I. O., Obansa, J. B., Amajoh, C. N., Koekemoer, L. L., ve Coetzee, M. (2007). Dynamics of knockdown pyrethroid insecticide resistance alleles in a field population of *Anopheles gambiae* ss in southwestern Nigeria. *Journal of Vector Borne Diseases*, 44(3), 181-188.
- Bahnck, C. M., ve Fonseca, D. M. (2006). Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex (Culex) pipiens* L.(Diptera: Culicidae) and hybrid populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(2), 251-255.
- Balenghien, T., Vazeille, M., Grandadam, M., Schaffner, F., Zeller, H., ve Reiter, P. (2008). Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile Virus. *Vector-Borne Zoonotic Disaesae*, 8(5), 589-596.
- Becker, N., Petri, D., Zgomba, M., Boase, C., Dahl, C., Lane, J., ve Kaiser, A. (2003). *Mosquitoes and Their Control*, Kluwer Academic Press, NY. 302 pp.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Dahl, C., Madon, M., ve Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and Their Control*, 2nd Edition. Springer Heidelberg Dordrecht London New York, ISBN: 0-306-47360-7, 498 s., 345-411.
- Ben Cheikh, R., Berticat, C., Berthomieu, A., Pasteur, N., ve Ben Cheikh, H. (2019). Genes conferring resistance to organophosphorus insecticides in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Tunisia. *Journal of Medical Entomology*, 46, 523–530.
- Bkhache, M., Tmimi, F. Z., Charafeddine, O., Filali O. B., Lemrani M., ve Labbé P. (2019). G119S ace-1 mutation conferring insecticide resistance detected in the

- Culex pipiens* complex in Morocco. *Pest Management Science*, 75 (1), 286-291.
- Boşgelmez, A., Çakmakçı, L., Alten, S. B., Kaynaş, S., Işık, K., Sümbül, H., ve Savaşçı, S. (1995). Sivrisineklere Karşı Entegre Mücadele II. T.C. Turizm Bakanlığı Yatırımlar Genel Müdürlüğü Altyapı Dairesi Başkanlığı, 1, 541.
- Bravo-Barriga, D., Parreira, R., Almeida, A. P. G., Calado, M., Blanco-Ciudad, J., ve Serrano-Aguilera, F. J. (2016). *Culex pipiens* as a potential vector for transmission of *Dirofilaria immitis* and other unclassified Filarioidea in Southwest Spain. *Veterinary Parasitology*, 223: 173-80.
- Brugman, V. A., Hernandez-Triana, L. M., Medlock, J. M., Fooks, A. R., Carpenter, S., ve Johnson, N. (2018). The role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in virus transmission in Europe. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(2), 23.
- Bursalı, F. (2013). Akdeniz ve Ege Bölgelerinde *Anopheles maculipennis* Kompleksinde *kdr* Mutasyonuna Dayalı İnsektisit Direncinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye 89 s., 20-24, 57-64.
- Camp, J. V., Kolodziejek, J., ve Nowotny, N. (2019). Targeted surveillance reveals native and invasive mosquito species infected with Usutu virus. *Parasites ve Vectors*, 12(1), 46.
- Campbell, N. A., ve Reece Jane, B. (2006). Biyoloji. Yayın no:381, 6. Baskı, ISBN:975-8982-85-0 (E. Gündüz, A. Demirsoy, İ. Türkan, Çev.). Ankara: Palme Yayıncılık, 1209 s., 428-461.
- Carpenter, S. J., ve La Casse, W. J. (1974). Mosquitoes of North America (North of Mexico). University of California Press, Berkeley, California. 284-285pp.
- Ceianu, C. S., Unqureanu, A., Nikolescu, G., Cernescu, C., Nitescu, L., Tardei, G., Petrescu, A., Pitigoi, D., Martin, D., ve Ciulacu-Purcarea, V. (2001). West Nile virus surveillance in Romania: 1997-2000. *Viral Immunology*, 14(1), 251-262.
- Chandrasiri, P. G. K., Fernando, S. D., ve De Silva, B. N. K. (2020). Insecticide resistance and molecular characterization of knockdown resistance (*kdr*) in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Sri Lanka. *Journal of Vector Ecology*, 45(2), 204-210.
- Ciota, A. T., Drummond, C. L., Drobnack, J., Ruby, M. A., Kramer, L. D., ve Ebel, G. D. (2011). Emergence of *Culex pipiens* from overwintering hibernacula. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27(1), 21-9.
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., ve Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315-335.

- Çağlar, S. S., Skavdis, G., Özer, N., Alten, B., Şimşek F. M., Akiner, M. M., Kaynaş, S., Kuyucu, A. C., ve Vontas, J. (2008). Study of the Resistance in Commonly Used Insecticides, of Natural Mosquito Populations, in the Province of Thrace (Greece and Turkey). TÜBİTAK TBAG Final Project Report 105T531. Ankara, 114 pp.
- Dabire, R. K., Namountougou, M., Diabaté, A., Soma, D. D., Bado, J., Toé, H. K., ve Combarry, P. (2014). Distribution and frequency of *kdr* mutations within *Anopheles gambiae* sl populations and first report of the ace-1 G119S mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso (West Africa). *PloS One*, 9(7), e101484.
- Darsie Jr, R. F., ve Ward, R. A. (2005). Identification and Geographical Distribution of the Mosquitoes of North America, North of Mexico. University Press of Florida, Gainesville, Florida. 79-115pp.
- Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., ve Williamson, M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, 59(3), 151-162.
- Demirtaş, R. (2017). Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde yayılan *Culex pipiens* kompleks türlerinin moleküler olarak belirlenmesi. Yüksek Lisans tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 46 s.
- Diaz-Badillo, A. B. G., Bolling, G. Perez-Ramirez, C. G., Moore, J. P., Martinez-Munoz, A. A., Padilla-Viveros, M., ve de Lourdes Munoz, M. (2011). The distribution of potential West Nile virus vectors, *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), in Mexico City. *Parasites and Vectors*, 4(1), 1-12.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., ve Zhorov, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50, 1-17.
- Donnelly, M. J., Corbel, V., Weetman, D., Wilding, C. S., Williamson, M. S. W., ve Black, C. (2009). Does *kdr* genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes?. *Trends in Parasitology*, 25(5), 213-219.
- Edi, C. V., Koudou, B. G., Jones, C. M., Weetman, D., ve Ranson, H. (2012). Multiple-insecticide resistance in *Anopheles gambiae* mosquitoes, Southern Côte d'Ivoire. *Emerging Infectious Diseases*, 18(1), 1508-1511.
- Eldridge, B.F. (2005). Biology of disease vectors, Mosquitoes, the Culicidae (Edt, W.C. Marquardt), Elsevier Academic Press, Second Edition, 785p.
- Ergunay, K., Aydogan, S., Menemenlioglu, D., Sener, B., Lederer, S., Steinhagen, K., ve Us, D. (2010b). Investigation of West Nile virus in central nervous system

- infections of unknown etiology in Ankara, Turkey. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 44(2), 255-262.
- Ergunay, K., Günay, F., Kasap, O. E., Oter, K., Gargari, S., Karaoglu, T., ve Alten, B. (2014). Serological, molecular and entomological surveillance demonstrates widespread circulation of West Nile virus in Turkey. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), e3028.
- Ergünay, K., Saygan, M. B., Aydoğan, S., Menemenlioğlu, D., Turan, H. M., Özkul, A., ve Us, D. (2010a). West Nile virus seroprevalence in blood donors from Central Anatolia, Turkey. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(8), 771-775.
- Failloux, A. B., Bouattour, A., Faraj, C., Günay, F., Haddad, N., Harrat, Z., ve Robert, V. (2017). Surveillance of arthropod-borne viruses and their vectors in the Mediterranean and Black Sea regions within the MediLabSecure Network. *Current Tropical Medicine Reports*, 4(1), 27-39.
- Farajollahi, A., Fonseca, D. M., Kramer, L. D., ve Kilpatrick, A. M. (2011). Bird biting” mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1577-1585.
- Foster, W. A., ve Walker, E. D. (2002). Mosquitos (Culicidae). In: Mullen G, Durden L, editors. Medical and Veterinary Entomology. Academic Press, San Diego, California. 261-317pp.
- Fradin, S. (1998). Mosquitoes and Mosquito Repellents: A Clinician's Guide by Mark. *Annals of Internal Medicine*, 128, 931-940.
- Fros, J. J., Miesen, P., Vogels, C. B., Gaibani, P., Sambri, V., ve Martina, B. E. (2015). Comparative Usutu and West Nile Virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe. *One Health*, 1, 31-36.
- Gomes, B., Sousa, C. A., Novo, M. T., Freitas, F. B., Alves, R., ve Côrte-Real, A. R. (2009). Asymmetric introgression between sympatric molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal. *BMC Ecology and Evolution*, 9(1), 262.
- Grigoraki, L., Puggioli, A., Mavridis, K., Douris, V., Montanari, M., Bellini, R., ve Vontas, J. (2018). Author correction: striking diflubenzuron resistance in *Culex pipiens*, the prime vector of West Nile Virus. *Scientific Reports*, 8(1), 1-8.
- Günay, F., Alten, B., Simsek, F., Aldemir, A., ve Linton, Y. M. (2015). Barcoding Turkish *Culex* mosquitoes to facilitate arbovirus vector incrimination studies reveals hidden diversity and new potential vectors. *Acta Tropica*, 143, 112-120.

- Günay, F. (2015). Türkiye Sivrisinek Faunası Üzerine DNA Barkodlama Yöntemiyle Moleküler Analizler. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 120 s.
- Harbach, R. E. (2012). *Culex pipiens*: Species versus species complex – Taxonomic history and perspective. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 28(4), 10-23.
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., ve Ranson, H. (2004). The molecular basis insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(7), 653-665.
- Hubálek, Z. (2008). Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitology Research*, 103(1), 29-43.
- Kalaycioglu, H., Korukluoglu, G., Ozkul, A., Oncul, O., Tosun, S., Karabay, O., ve Altas, A. B. (2012). Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro Surveillance*, 17(21), 20182.
- Kasai, S., Weerasinghe, I. S., ve Shono, T. (1998). P450 monooxygenase are an important mechanism of permethrin resistance in *Cx. quinquefasciatus* Say larvae. *Archives Insect Biochemistry and Physiology*, 37(1), 47-56.
- Kioulos, I., Kampouraki, A., Morou, E., Skavdis, G., ve Vontas, J. (2014). Insecticide resistance status in the major West Nile virus vector *Culex pipiens* from Greece. *Pest Management Science*, 70(4), 623-627.
- Lalubin, F., Delédevant, A., Glaizot, O., ve Christe, P. (2013). Temporal changes in mosquito abundance (*Culex pipiens*), avian malaria prevalence and lineage composition. *Parasites ve Vectors*, 6(1), 307.
- L'Ambert, G., Ferré, J. B., Schaffner, F., ve Fontenille, D. (2012). Comparison of different trapping methods for surveillance of mosquito vectors of West Nile Virus in Rhône Delta, France. *Journal of Vector Ecology*, 37(2), 269-275.
- Lol, J. C., Castellanos, M. E., Liebman, K. A., Lenhart, A., Pennington, P. M., ve Padilla, N. R. (2013). Molecular evidence for historical presence of knock-down resistance in *Anopheles albimanus*, a key malaria vector in Latin America. *Parasites and Vectors*, 6(1), 1-7.
- Major, K. M., Weston, D. P., Lydy, M. J., HuffHartz, K. E., Wellborn, G. A., Manny, A. R., ve Poynton, H. C. (2020). The G119S ace-1 mutation confers adaptive organophosphate resistance in a nontarget amphipod. *Evolutionary Applications*, 13(4), 620-635.
- Marshall, E. (2000). A renewed assault on an old and deadly foe. *Science*, 290(1), 428-430.

- Martinet, J. P., Ferté, H., Failloux, A. B., Schaffner, F., ve Depaquit, J. (2019). Mosquitoes of north-western Europe as potential vectors of arboviruses: A review. *Viruses*, 11, 1059.
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F., Bergé, J. B., Devonshire, A. L., ve Pauron, D. (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* ss. *Insect Molecular Biology*, 7 (2), 179-184.
- Massouli, E. J., Sussman, J. L., Doctor, B. P., Soreq, H., Velan, B., Cygler, M., Rotundo, R., Shafferman, A., Silman, I., ve Taylor, P. (1992). "Recommendations for Nomenclature in Cholinesterases, 285-288". In: Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions (Eds. A. Shafferman ve B. Velan). Plenum Press, New York, USA, 293 pp.
- Meco, O. (1977). West Nile arbovirus antibodies with hemagglutination inhibition (HI) in residents of Southeast Anatolia. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 11(1), 3-17.
- Medlock, J., Balenghien, T., Alten, B., Versteirt, V., ve Schaffner, F. (2018). Field sampling methods for mosquitoes, sandflies, biting midges and ticks: VectorNet project 2014-2018. EFSA Supporting Publications, 15(6): 1435E.
- Merdivenci, A.(1984). Türkiye Sivrinekleri (Yurdumuzda varlığı bilinen sivrineklerin biyo – morfolojisi, biyo – ekolojisi, yayılımı ve sağlık önemleri)", İstanbul Üniversitesi, İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. Yayın No: 3215-136.
- Moutailler, S., Krida, G., Schaffner, F., Vazeille, M., ve Failloux, A. B. (2008). Potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean region. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(6), 749-754.
- Nabeshima, T., Mori, A., Kozaki, T., Iwata, Y., Hidoh, O., Harada, S., Kasai, S., Severson, D. W., Kono Y., ve Tomita, T. (2004). An amino acid substitution attributable to insecticide-resistance in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(1), 794e801.
- Osta, M. A., Rizk, Z. J., ve Labbé, P. (2012). Insecticide resistance to organophosphates in *Culex pipiens* complex from Lebanon. *Parasites and Vectors*, 5(1), 1-6.
- Önen, Ö., Güvendi, G., ve Beşeren, H. (2016). Organoklorlu Pestisitlerin Yüksek Omurgalı Böbreği Üzerindeki Histopatolojik Etkileri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2), 26-35.
- Özcel, M., ve Daldal, N.(1997). Parazitolojide Artropod hastalıkları ve Vektörler. Türkiye Parazitoloji Derneği yayın no:13. ISBN 975-483-376-1, İzmir, Türkiye, 526 s., 1-46.

- Özdemir, A. (2006). *Limnodrilus profundicola* (Verril 1871) kolinesteraz ve etoksirezorufin o-deetilaz aktivitelerinin biyomarkör olarak kullanılmasının araştırılması. Yüksek lisans tezi. Pamukkale Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye, 94 s.
- Özkul A., Yildirim, Y., Pinar, D., Akcalı, A., Yılmaz, V., ve Colak, D. (2006). Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiology and Infection*, 134(4), 826-829.
- Öztürk, M. (2018). Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Yayılan *Culex pipiens* kompleks Türlerinde Biyokimyasal İnsektisit Direnci. Yüksek Lisans Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 67 s., 1-19.
- Pages, N., Huber, K., Cipriani, M., Chevallier, V., Conraths, F. J., ve Goffredo, M. (2009). Scientific review on mosquitoes and mosquitoborne diseases. *EFSA Supporting Publications*, 6(8), 7E.
- Papa, A., Xanthopoulou, K., Gewehr, S., ve Mourelatos, S. (2011). Detection of West Nile Virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(8), 1176-1180.
- Pchelkina, A. A., ve Seledtsov, I. I. (1978). Experimental studies of the interrelationships of the Tahyna virus with mosquitoes. *Meditinskaya Parazitologiya*, 47(4), 59-63.
- Ponce, G., Sanchez, I. P., García, S. M., Torrado, J. M., Lozano-Fuentes, S., Lopez-Monroy, B., ve Flores, A. E. (2016). First report of L1014F *kdr* mutation in *Culex quinquefasciatus* in Mexico. *Insect Science*, 23(1), 829- 834.
- Rezza, G. (2014). West Nile virus infections in South-eastern Europe and in the Eastern Mediterranean area. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases Special Issue*, 1(1), 10-16.
- Rinkevich, F. D., Du, Y., ve Dong, K. (2013). Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106(3), 93-100.
- Robert, V., Günay, F., Le Goff, G., Boussès, P., Sulesco, T., ve Khalin, A., (2019). Distribution chart for Euro-Mediterranean mosquitoes (western Palaearctic region). *Journal of the European Mosquito Control Association*, 37, 1-28.
- Roberts, D. R., ve Andre, R. G. (1994). Insecticide resistance issues in vector-borne disease control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 5(1), 21-34.
- Savage, H. M., Ceianu, C., Nicolescu, G., Karabatsos, N., Lanciotti, R., ve Vladimirescu, A. (1999). Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular

- characterization of a virus isolate from mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(4), 600-611.
- Schaffner, F., Guy, A., Bernard, G., Jean-Paul, H., Rhaïem, A., Brunhes, J., (2001). Les moustiques d'Europe: Logiciel d'identification et d'enseignement [The Mosquitoes of Europe: An Identification and Training Program]. Paris (FRA); Montpellier: IRD ; EID, 1 CD ROM (Didactiques). ISBN 2-7099-1485-9.
- Scott, J. G., Yoshimizu, M. H., ve Kasai, S.(2015). Pyrethroid resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 120(1), 68-76.
- Shaikovich, E. V., ve Vinogradova, E. B. (2014). The discovery of a hybrid population of mosquitoes of the *Culex pipiens* L. complex (Diptera, Culicidae) on the Kos Island (Greece) by means of molecular markers. *Entomological Review*, 94(1), 35-39.
- Shaikovich, E.V. ve Vinogradova, E. B. (2004). Differentiation between the urban mosquito *Culex pipiens pipiens*, *F. molestus* and *Culex torrentium* (Diptera: Culicidae) by the molecular genetic methods. *Parazitologiya*, 38, 406–412.
- Shi, L., Hu, H., Ma, K., Zhou, D., Yu, J., ve Zhong, D. (2015). Development of resistance to pyrethroid in *Culex pipiens pallens* population under different insecticide selection pressures. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(8), e0003928.
- Smith, J. L., ve Fonseca, D. M. (2004). Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(4), 339-345.
- Snow, K. (1990). Mosquitoes Naturalist's Handbooks" 14, England, 66 pp.
- Taşkın, B. G., Dogaroglu, T., Kilic, S., Dogac, E., ve Taskin, V.(2016). Seasonal dynamics of insecticide resistance, multiple resistance, and morphometric variation in field populations of *Culex pipiens*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 129(1), 14-27.
- Tmimi, F. Z., Faraj, C., Bkhache, M., Mounaji, K., ve Failloux, A. B.(2018). Insecticide resistance and target site mutations (G119S *ace-1* and L1014F *kdr*) of *Culex pipiens* in Morocco. *Parasites ve vectors*, 11(1), 1-9.
- Turell, M. J. (2012). Members of the *Culex pipiens* complex as vectors of viruses. *J American Mosquito Control Association*, 28(4), 123-126.
- Vilibic-Cavlek, T., Savic, V., Petrovic, T., Toplak, I., Barbic, L., ve Petric, D. (2019). Emerging trends in the epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in southern Europe. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 437.

- Vinogradova, E. B. (2000). *Culex pipiens* Mosquitoes: Taxonomy, Distribution, Ecology, Physiology, Genetics, Applied importance and Control. Pensoft Publishers, Sofia, Bulgaria. 36-58pp
- Vogels, C. B. F., Hartemink, N., ve Koenraadt, C. J. M. (2017). Modelling West Nile Virus transmission risk in Europe: effect of temperature and mosquito biotypes on the basic reproduction number. *Scientific Reports*, 7(1), 5022.
- Wang, Y., Yu, W., Shi, H., Yang, Z., ve Ma, Y. (2015). Historical survey of the *kdr* mutations in the populations of *Anopheles sinensis* in China in 1996-2014. *Malaria Journal*, 14(1), 1-10.
- Wang, Z. M., Li, C. X., Xing, D., Yu, Y. H., Liu, N., Xue, R. D., Dong, Y. D., ve Zhao, T. Y. (2012). Detection and widespread distribution of sodium channel alleles characteristic of insecticide resistance in *Culex pipiens* complex mosquitoes in China. *Medical and Veterinary Entomology*, 26(2), 228-232.
- Weill, M. G., Lutfalla, K., Mogensen, F., Chandre, A., ve Berthomieu, C. (2003). Berticat Comparative genomics: insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, 423(6936), 136-137.
- Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Berthomieu, A., ve Marquine, M. (2004). The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology*, 13(1), 1-7.
- Whalon, M. E., Mota-sanchez, D., ve Hollingworth, R. M. (2008). "Analysis of Global Pesticide Resistance in Arthropods, 5-31". In: Global Pesticide Resistance in Arthropods (Eds. M. E. Whalon, D. Mota-sanchez ve R. M. Hallington). CAB international, Cambridge, MA, UK, 166 pp.
- Wirth, M. C., ve Georgiou, G. P. (1996). Organophosphate resistance in *Culex pipiens* from Cyprus. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12(1), 112-118.
- Woodbridge, A. F., ve Walker, E. D. (2002). Mosquitoes (Culicidae). pp. 203-262. In Mullen and Durden (Ed), *Medical and Veterinary Entomology*, Academic Press, San Diego, CA.
- Yazici, Z., Albayrak, H., Ozan, E., ve Gumusova, S. (2012). The first investigation of west nile virus in horses using real time rt-PZR in middle black sea region in Turkey. *Journal of Arthropod Borne Diseases*, 6(2), 151-5.
- Yu, F. H., ve Catterall, W. A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4(3), 1-7.
- Zakhia, R., Mousson, L., Vazeille, M., Haddad, N., ve Failloux, A. B. (2018). Experimental transmission of West Nile virus and Rift Valley Fever virus by *Culex pipiens* from Lebanon. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(1), e0005983.

Zhong, D., Chang, X., Zhou, G., He, Z., Fu, F., Yan, Z., Zhu, G., ve Xu, T.(2013). Relationship between knockdown resistance, metabolic detoxification and organismal resistance to pyrethroids in *Anopheles sinensis*. *PLoS One*, 8(2), e55475.

