

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ALMAN HAMAM BÖCEĞİ (*Blattella germanica*)
ANKARA POPÜLASYONLARINDA PERMETRİN DİRENCİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Zeynep YAŞAR ARIKAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

ALMAN HAMAM BÖCEĞİ (*Blattella germanica*) ANKARA POPÜLASYONLARINDA PERMETRİN DİRENCİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Zeynep YAŞAR ARIKAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nursel GÜL

Bu tez çalışmasında Alman hamam böceği (*Blattella germanica*) Ankara popülasyonlarında bir piretroid grubu insektisit olan permetrine karşı direnç düzeyinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada laboratuvarında yetiştirilen duyarlı popülasyon ile Ankara'nın 4 farklı noktasından toplanan yerel popülasyonlar (Altındağ, Etimesgut, Hacettepe, Keçiören) kullanıldı. Biyoassay çalışmaları permetrinin farklı dozları ve aynı miktardaki permetrinin etkinliğini arttırmak için piperonil bütoksit (PBO) eklenerek tarsal kontakt metoduyla gerçekleştirildi. Böceklerdeki *kdr* (knock down resistance) mutasyonu varlığı duyarlı, Altındağ ve Hacettepe popülasyonlarına ait 110 örnekte PZR, jel elektroforezi ve sekanslama çalışmalarıyla araştırıldı. Biyoassay çalışmaları sonuçlarına göre yerel popülasyonların permetrin aktif maddesine karşı duyarlı popülasyona göre dirençli olduğu belirlendi. Yerel popülasyonlardaki LD₅₀ düzeyinde direnç seviyelerinin duyarlı popülasyona göre Altındağ popülasyonunun 26,03 kat, Etimesgut popülasyonunda 13,89 kat, Hacettepe popülasyonunda 5 kat ve Keçiören popülasyonunda 11,58 kat yüksek olduğu görüldü. Uygulama dozuna PBO eklenmesinin Alman hamamböceği popülasyonlarında permetrin direnç katsayılarını LD₅₀ düzeyinde Altındağ popülasyonunda 7,74 kat, Etimesgut popülasyonunda 6,82 kat, Hacettepe popülasyonunda 7,12 kat, Keçiören popülasyonunda 7,01 kat düşürdüğü görüldü. Duyarlı popülasyonda *kdr* genine rastlanmazken, Altındağ popülasyonunda 5 bireyde (%16.6), Hacettepe popülasyonunda 2 bireyde (%5) bu mutasyonun olduğu belirlendi.

Yapılan çalışmada Türkiye'de ilk defa Alman hamam böceklerinde *kdr* mutasyonunun olduğu ortaya konuldu. Çalışma sonuçları ileride hamam böceklerine karşı insektisit dozlarında belirlenmesinde *kdr* mutasyonunun varlığı çalışmalarına temel kaynak olacağı ve literatürdeki bilgi eksikliğini tamamlayabileceği düşünüldü.

Aralık 2023, 84 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Blattella germanica*, permetrin, PBO, insektisit direnci, genetik

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PERMETHRIN RESISTANCE IN GERMAN COCKROACH (*Blattella germanica*) POPULATIONS FROM ANKARA

Zeynep YAŞAR ARIKAN

Ankara University
Graduate School of Nature and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nursel GÜL

In this thesis, the objective was to determine the resistance level of the German cockroach (*Blattella germanica*) population in Ankara against the pyrethroid group insecticide permethrin. In the study, a sensitive population grown in the laboratory and local populations collected from 4 different points of Ankara (Altındağ, Etimesgut, Hacettepe, Keçiören) were used. Bioassay studies were carried out using the tarsal contact method with different doses of permethrin and the addition of piperonyl butoxide (PBO) to increase the effectiveness of the same amount of permethrin. The presence of the *kdr* (knock down resistance) mutation in insects was investigated in 110 samples from susceptible strain, Altındağ and Hacettepe populations by PCR, gel electrophoresis and sequencing studies. According to the results of bioassay studies, it was determined that local populations were resistant to the active substance permethrin compared to the sensitive population. It was observed that the resistance levels for LD₅₀ in local populations were 26.03 fold in the Altındağ population, 13.89 fold in the Etimesgut population, 5 fold in the Hacettepe population and 11.58 fold in the Keçiören population compared to the susceptible population. The addition of PBO to the application dose reduced the resistance coefficients of permethrin in German cockroach populations at LD₅₀ level by 7.74 fold in the Altındağ population, 6.82 fold in the Etimesgut population, 7.12 fold in the Hacettepe population, and 7.01 fold in the Keçiören population. While the *kdr* mutation was not found in the susceptible population, this mutation was found to be present in 5 individuals (16.6%) in the Altındağ population and in 2 individuals (5%) in the Hacettepe population.

For the first time in Turkey, the presence of *kdr* mutation in German cockroaches was revealed in this study. The results of the study were considered to be a fundamental source for future studies on the determination of insecticide doses against cockroaches with the presence of *kdr* mutation and could fill the knowledge gap in the literature.

December 2023, 84 pages

Key Words: *Blattella germanica*, permethrin, PBO, insecticide resistance, genetic

TEŞEKKÜR

Doktora alıőmam boyunca yol gsterici olan, bilgi ve tecrbeleriyle alıőmama yn veren, ilgi ve desteğiyle beni yreklendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Nursel GL'e,

Tez çalıőmama ait tüm süreçlerin yürütülmesini sağlayan Hacettepe Üniversitesi Pestisit Araştırma ve Referans Laboratuvarı Müdürü Prof. Dr. S. Levent Turan'a,

Tez konunun belirlenmesinde fikirleriyle katkı sunan, örneklemin temini, örneklemin kültüre edilmesi ve biyoassay çalışmalarının yürütülmesi süreçlerinde destek olan eőim Dr. Öęr. Üyesi Kalender ARIKAN'a,

Tez çalıőmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Öęr. Gör. Hakan ESKİZENGİN'e,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, maddi ve manevi desteęini benden esirgemeyen, eęitimim süresince hep yanımda olan sevgili annem, babam ve kardeőlerime,

Varlığı ve sevgisiyle hep yanımda olan canım oğlum İlkan ARIKAN'a,

teşekkür ederim.

Zeynep YAŞAR ARIKAN
Ankara, Aralık 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Kuramsal Temeller	4
1.1.1 Alman hamam böceği	4
1.1.2 Sentetik piretroidler ve permetrin	7
1.1.3 Piretroidlerin etki mekanizması	10
1.1.4 Piperonil bütoksit (PBO) ve sinerjizm	12
1.1.5 Direnç ve <i>kdr</i> direnci	13
2. MATERYAL VE METOD	19
2.1 Örneklerin Toplanması	19
2.2 Biyoassay Çalışmaları	21
2.2.1 Biyoassay çalışmalarda kullanılan kimyasallar	21
2.2.2 Uygulama dozlarının hazırlanması ve direnç testlerinin yapılması	21
2.2.3 Piperonilbütoksit (PBO) ile yapılan sinerjist çalışmaları	25
2.3 <i>kdr</i> Mutasyonu ile İlgili Çalışmalar	25
2.3.1 DNA izolasyonu	27
2.3.2 PZR ve jel elektroforezi	28
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	31
3.1 Bioassay Çalışmalarına Ait Bulgular	31
3.2 Piperonilbütoksit (PBO) ile İlgili Çalışma Bulguları	42
3.3 Permetrin ve PBO ile Yapılan Biyoassay Çalışmalarının Karşılaştırılması	52
3.4 Moleküler Çalışmalara Ait Bulguları	59
4. TARTIŞMA	64
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	84

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
⁰ C	Santigrad derece
α	Alfa
β	Beta
cm ²	Santimetre kare
dk	Dakika
g	Santrifüj dönme kuvveti
kg	Kilogram
kDa	kilodalton
m ²	Metrekare
μ l	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
Na ⁺	Sodyum iyonu
Na _v	Sodyum kanalı
S	segment (bölüm)

Kısaltmalar

DDT	Dicholoro-Diphenyl-Trichloroethane
DNA	Deoksiribonükleikasit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EPA	Environmental Protection Agency (Çevre Koruma Ajansı)
EST	Esteraz
GABA	γ -aminobütirik asit
<i>kdr</i>	Knock-down resistance (bayılma direnci)
LD ₅₀	Lethal Doz 50 (Popülasyonun yüzde 50'sini öldüren doz)
OP	Organofosfatlar

PBO Piperonyl Butoxide
PZR Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA Ribonükleikasit
UV Ultra viyole
TAE Tris-asetat-EDTA
WHO World Health Organization

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Alman hamam böceği (<i>Blattella germanica</i>) yaşam döngüsü.....	5
Şekil 1.2 Alman hamam böceği (<i>Blattella germanica</i>) farklı yaşam evreleri.....	6
Şekil 1.3 Permetrinin moleküler yapısı.....	9
Şekil 1.4 Voltaj kapılı sodyum kanalının transmembran topolojisi.....	12
Şekil 2.1 Hamam böceklerinin elle ve şarjlı süpürgeyle toplanması.....	20
Şekil 2.2 Arazi çalışmalarında toplanan hamam böcekleri.....	20
Şekil 2.3 İnsektaryumda bulunan Alman hamam böceği yetiştirme kapları.....	21
Şekil 2.4 Hazırlanan dozların uygulandığı seramik yüzeyler uygulanması ve popülasyon içinden denemelerde kullanılacak bireylerin seçilmesi.....	23
Şekil 2.5 Biyoassay çalışmalarının Alman hamam böceği popülasyonlarına uygulanması.....	23
Şekil 2.6 Uygulama dozlarının 24 saatlik bekletilme ortamı.....	24
Şekil 2.7 Uygulama dozlarının 24 saatlik bekletilme kabı.....	24
Şekil 2.8 Bioassay çalışmaları sonucunda moleküler çalışmalar için ayrılmış bireyler.....	26
Şekil 2.9 Alman hamam böceği ile yapılan PZR çalışmaları.....	27
Şekil 2.10 Jel elektroforezinde yürütülen PZR ürünleri için kullanılan ladder.....	29
Şekil 2.11 <i>kdr</i> mutasyonuna ait baz dizisi.....	30
Şekil 3.1 Popülasyonlara ait 250 mg/m ² dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları.....	37
Şekil 3.2 Popülasyonlara ait 125 mg/m ² dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları.....	38
Şekil 3.3 Popülasyonlara ait 25 mg/m ² dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları.....	38
Şekil 3.4 Popülasyonlara ait 5 mg/m ² dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları.....	39
Şekil 3.5 Popülasyonlara ait 1 mg/m ² dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları.....	39
Şekil 3.6 Popülasyonlara ait 0.25 mg/m ² dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları.....	40
Şekil 3.7 Uygulama dozlarına ait 24 saat sonunda ölen birey sayıları.....	40
Şekil 3.8 Popülasyonlara ait 25mg/m ² permetrin/25mg/m ² PBO dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları.....	48
Şekil 3.9 Popülasyonlara ait 25mg/m ² permetrin/12.5mg/m ² PBO dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları.....	49

Şekil 3.10 Popülasyonlara ait 25mg/m ² permetrin/6.25mg/m ² PBO dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları.....	49
Şekil 3.11 Popülasyonlara ait 25mg/m ² permetrin 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları	50
Şekil 3.12 Permetrin ve PBO ile yapılan çalışmalarda ölüm yüzdelerindeki değişim....	52
Şekil 3.13 LD ₅₀ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının karşılaştırılması	54
Şekil 3.14 LD ₈₀ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının karşılaştırılması	54
Şekil 3.15 LD ₉₀ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının karşılaştırılması	55
Şekil 3.16 LD ₉₅ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının karşılaştırılması	55
Şekil 3.17 LD ₉₉ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının karşılaştırılması.	56
Şekil 3.18 LD ₅₀ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının log ₁₀ tabanında dönüştürülmüş seviyeleri	57
Şekil 3.19 LD ₈₀ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının log ₁₀ tabanında dönüştürülmüş seviyeleri	57
Şekil 3.20 LD ₉₀ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının log ₁₀ tabanında dönüştürülmüş seviyeleri	58
Şekil 3.21 LD ₉₅ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının log ₁₀ tabanında dönüştürülmüş seviyeleri	58
Şekil 3.22 LD ₉₅ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının log ₁₀ tabanında dönüştürülmüş seviyeleri	59
Şekil 3.23 Duyarlı, Altındağ, Hacettepe popülasyonlarına <i>kdr</i> geni PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri	60
Şekil 3.24 CA3 örneğinde heterozigot değişiklik	60
Şekil 3.25 BH1 örneğinde homozigot değişiklik	61
Şekil 3.26 AA9 örneğinde homozigot değişiklik.....	61
Şekil 3.27 AA7 örneğinde homozigot değişiklik.....	61
Şekil 3.28 BH4 örneğinde homozigot değişiklik.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Alman hamam böceği (<i>Blattella germanica</i>) sistematigi	4
Çizelge 1.2 Alman hamam böceği (<i>Blattella germanica</i>) voltaj kapılı sodyum kanallarına ait mutasyonlar	17
Çizelge 2.1 Çalışmalarda kullanılan Alman hamam böceği popülasyonların toplandığı yerler	19
Çizelge 2.2 Alman hamam böceklerine uygulanan permetrin dozları	22
Çizelge 2.3 Sinerjist çalışmaları için belirlenen dozlar	25
Çizelge 2.4 Alman hamam böceği <i>kdr</i> ilişkili genin çoğaltılması için kullanılan eski ve yeni primerler	26
Çizelge 3.1 Duyarlı popülasyonda permetrin ile yapılan bioassay çalışmaları verileri	32
Çizelge 3.2 Altındağ popülasyonunda permetrin ile yapılan bioassay çalışmaları verileri	33
Çizelge 3.3 Etimesgut popülasyonunda permetrin ile yapılan bioassay çalışmaları verileri	34
Çizelge 3.4 Hacettepe popülasyonunda permetrin ile yapılan bioassay çalışmaları verileri	35
Çizelge 3.5 Keçiören popülasyonunda permetrin ile yapılan bioassay çalışmaları verileri	36
Çizelge 3.6 Permetrin dozlarıyla elde edilen probit analiz sonuçları	41
Çizelge 3.7 Alman hamam böceği Duyarlı(D), Altındağ(A), Etimesgut(E), Hacettepe(H), Keçiören (K) popülasyonlarında Permetrin ile yapılan bioassay çalışmalarından elde edilen direnç katsayıları.	42
Çizelge 3.8 Duyarlı popülasyon PBO ile yapılan bioassay çalışmalarının sonuçları	43
Çizelge 3.9 Altındağ popülasyonu PBO ile yapılan bioassay çalışmalarının sonuçları	44
Çizelge 3.10 Etimesgut popülasyonu PBO ile yapılan bioassay çalışmalarının sonuçları	45
Çizelge 3.11 Hacettepe popülasyonu PBO ile yapılan bioassay çalışmalarının sonuçları	46
Çizelge 3.12 Keçiören popülasyonu PBO ile yapılan bioassay çalışmalarının sonuçları	47
Çizelge 3.13 Permetrin+PBO dozlarıyla yapılan biyoassay çalışmalarına ait probit analizi verileri	51

Çizelge 3.14 <i>Blattella germanica</i> Duyarlı(D), Altındağ(A), Etimesgut(E), Hacettepe(H), Keçiören (K) popülasyonlarında Permetrin+PBO ile yapılan bioassay çalışmalarından elde edilen direnç katsayıları.....	51
Çizelge 3.15 Permetrin ve Permetrin+PBO ile yapılan biyoassay çalışmalarının LD değerleri ve değişim oranları	53
Çizelge 3.16 Uygulama dozlarına göre Duyarlı (D) popülasyonda <i>kdr</i> mutasyonu tespiti.....	62
Çizelge 3.17 Uygulama dozlarına göre Hacettepe(H) popülasyonu <i>kdr</i> mutasyonu tespiti.....	62
Çizelge 3.18 Uygulama dozlarına göre Altındağ (A) popülasyonu <i>kdr</i> mutasyonu tespiti.....	62
Çizelge 3.19 Çalışmadaki PZR ve sekanslama verileri	63

1. GİRİŞ

Kentleşme, insan nüfusu artışının ve sanayileşmenin bir ürünüdür. Gelişmekte olan ülkelerde olduğu kadar sanayileşmiş ülkelerde de kentleşme insanları birçok eklem bacaklı (Arthropoda) haşereden uzaklaştırdığı gibi bazı türlerle de yakın ilişkiler kurmasına neden olmuştur (Schal ve Hamilton 1990). Bu türler arasında popülasyonları belli bir seviyenin üzerine çıkan, ekonomik kayıplara neden olan, insan sağlığını tehdit eden veya bazı alanlarda (ev, depo gibi) bulunmaları rahatsızlık yaratan organizmalar zararlı tür veya vektör olarak nitelendirilmektedir (Omkar 2018). Avrupa Gıda Güvenliği Dairesi (EFSA 2023) vektörü bulaşıcı bir ajanı enfekte bir hayvandan bir insana veya başka bir hayvana aktaran canlı bir organizma olarak tanımlamaktadır. Başlıca vektörler olarak sivrisinek, hamam böceği, kene, pire ve karasinek türleri sayılabilir. Alman hamam böceği, *Blattella germanica* (L.) (Blattodea: Blattellidae), insan yaşam alanlarına yakın en yaygın zararlı türlerden biridir (WHO 1998). Biyolojik vektör olarak Alman hamam böceği, ağırlıklı olarak bakterileri (Örn. *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), mantarları (Örn. *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*) ve parazitleri (Örn. *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*) taşımaktadır. Dolayısıyla salgın hastalıklara neden olmaktadır (Graczyk vd. 2005, Kassiri vd. 2018) ve alerjik reaksiyonlar gibi ciddi solunum rahatsızlıklarına yol açmaktadır (Weber 1984, Arlian 2002).

Günümüzde Alman hamam böceği mücadelesinde yerleşkelerde yaygın olarak kullanılan kimyasallar arasında piretroid grubu insektisitler de yer alır. Piretroid grubu pestisitlerin başlıcaları permetrin, sipmetrin ve deltametrin'dir. Piretrodiler, piyasada hamam böcekleri, diğer vektör ve zararlı böceklerin mücadelesinde kullanılmak üzere katı, sıvı ve aerosol formülasyonlar halinde satılmaktadır. Piretroid grubu insektisitler, piretrum çiçeklerinden ekstrakte edilen doğal piretrinler ve bunların sentetik türevlerinden meydana gelir (Nasirian 2017, Zhang ve Zhang 2018). Yaygın olarak kullanılmalarının nedeni, mahsulün zarar görmesini ve hastalık bulaşmasını hızla durdurmakla birlikte hedef dışı organizmalara karşı düşük seviyedeki toksitesidir (Ujihara 2019). Bununla birlikte, insektisitlerin uzun süreli aşırı kullanımı ekolojik kontaminasyona, artan haşere direncine ve mahsul verimliliğinin düşmesine neden olur. İsektisitlerin çoğu, DDT,

organofosfatlar (OP'ler), piretroidler ve neonikotinoidler gibi sinir zehirleridir. Voltaj duyarlı sodyum kanalları böcek sinir sisteminin önemli bir bileşenidir. Piretroidler ve DDT, voltaj duyarlı sodyum kanallarına müdahale ederek böcekleri kontrol edebilir, voltaj duyarlı sodyum kanallarını açık tutma süresini uzatarak sinir sistemi hasarına neden olur ve sonuçta böceğin ölümüne yol açar (Liu vd. 2023).

Böceklerde DDT ve piretroidlere karşı nöronal duyarlılığı azaltan piretroid direncinin ana mekanizmalarından biri, knock down direnç (*kdr*) mekanizmasıdır (Soderlund ve Bloomquist 1990). Knock down durumu DDT ve piretroidlere maruz kalan böceğin ilk anda felçli duruma geçerek sırt üstü düşmesi veya paraliz olması olarak tanımlanmaktadır (Martins ve Valle 2012). *kdr* mutasyonunun, voltaj kapılı sodyum kanalında yapısal değişikliklere yol açan para (paralise) tip sodyum kanalı genindeki mutasyon ve mutasyonlardan kaynaklandığı belirlenmiştir. Bu mutasyon para tipi sodyum kanalını kodlayan genin II. alanının 6. segmentinde (S6) meydana gelen bir mutasyonu (TTG'den TTC'ye değişimi) içerir. Bu değişim böcekte ilgili gende 1014. pozisyondaki lösin aminoasidinin fenilalanin aminoasidiyle (L1014F) değişimine neden olur (Miyazaki vd. 1996). İlk kez kara sinekte (*Musca domestica*) gösterilen *kdr* mutasyonu, küresel olarak neredeyse tüm tıbbi ve tarımsal açıdan önemli eklem bacaklı zararlılarda tespit edilmiştir (Busvine 1951, Milani 1954, Soderlund 2012, Rinkevich vd. 2013). Şimdiye kadar, 50'den fazla sodyum kanalı mutasyonu, çeşitli eklem bacaklılarda (arthropoda) piretroid direnci ile ilişkilendirilmiştir. *Kdr* mutasyonlarının tanımlanması saha popülasyonlarındaki direnç alellerinin sıklığını hızlı bir şekilde değerlendirmek için moleküler belirteçler sağlar (Silver vd. 2014).

Hamam böceklerinde dirence neden olan mutasyonlar, insektisitlerin etki mekanizmasına bağlı olarak enzim üretimine veya böcek sinir sistemindeki reseptörlerde değişikliğe neden olabilirler. Direnç izleme çalışmaları, hamam böceği popülasyonlarının insektisitlere karşı gösterdiği tepkiler hakkında değerli bilgiler sağlayarak, direnç yönetimi yaklaşımının etkili bir bileşeni olabilir. Saha popülasyonlarındaki direnç değişikliklerinin saptanması, sinerjistlerin kullanımı, çeşitli insektisitlerin dönüşümlü kullanımı ve azaltılmış insektisit uygulaması dahil olmak üzere alternatif kontrol önlemlerine duyulan ihtiyacı gösterebilir.

Diğer eklem bacaklı (arthropoda) türleri ile birlikte hamam böceği türlerinin de kullanılan pestisitlere karşı hızla direnç kazandığı birçok çalışmada belirtilmiştir (Zlotkin 1999, Vais 2001, Dong 2007). Direnç, aşırı pestisit kullanımını da beraberinde getirmekte ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. En önemlisi aşırı pestisit kullanımı ekosistemi, doğrudan ve dolaylı yollar ile de insan sağlığı olumsuz etkilemektedir. İnsektisitlere karşı direncin ortaya çıkarılması ve bu direncin kırılmasına yarayacak yardımcı maddelerin kullanımı pestisit kullanımından kaynaklı ekonomik, ekolojik ve sağlık konularında oluşacak zararları azaltacaktır. Ülkemizde hamam böceği saha popülasyonlarında kullanılan insektisitlere karşı direnç mekanizmasının anlaşılmasıyla ilgili az sayıda çalışma vardır. Bu nedenle bu çalışma ülkemizdeki yaygın vektörlerden biri olan Alman hamam böceğinin permetrine karşı mevcut direnç durumu genetik ve fizyolojik yönden ortaya konuldu. Çalışmaya başlarken Alman hamam böceğiyle mücadelesinde bazı sorunlar göz önünde bulunduruldu. Bu sorunlar:

- Piretroid grubu insetisitlerden olan permetrin Ankara ilindeki farklı Alman hamam böceği popülasyonları üzerinde etkin midir?
- Ankara ilindeki farklı Alman hamam böceği popülasyonlarının permetrine karşı fizyolojik direnç seviyesi nedir?
- Piperonil bütoksit (PBO) sinerjisti Alman hamam böceği popülasyonlarının permetrine karşı direnç seviyesini düşürmeye katkı sağlıyor mu?
- Ankara ilindeki farklı Alman hamam böceği popülasyonlarında *kdr* mutasyonu var mı?
- Permetrine karşı oluşan fizyolojik direnç ile genetik direnç arasında bir ilişki var mıdır?

Bu sorunlar dikkate alınarak yapılan çalışmada Alman hamam böceğinin duyarlı ve yerel popülasyonlarında hem biyoassay hem de moleküler çalışmalarla incelendi. Yapılan bu çalışmanın sonuçları doğrultusunda Alman hamam böceğinin Ankara popülasyonlarındaki genetik direnç durumu ilk kez ortaya konularak permetrinin uygulama şekli ve dozları belirlendi.

1.1 Kuramsal Temeller

1.1.1 Alman hamam böceği

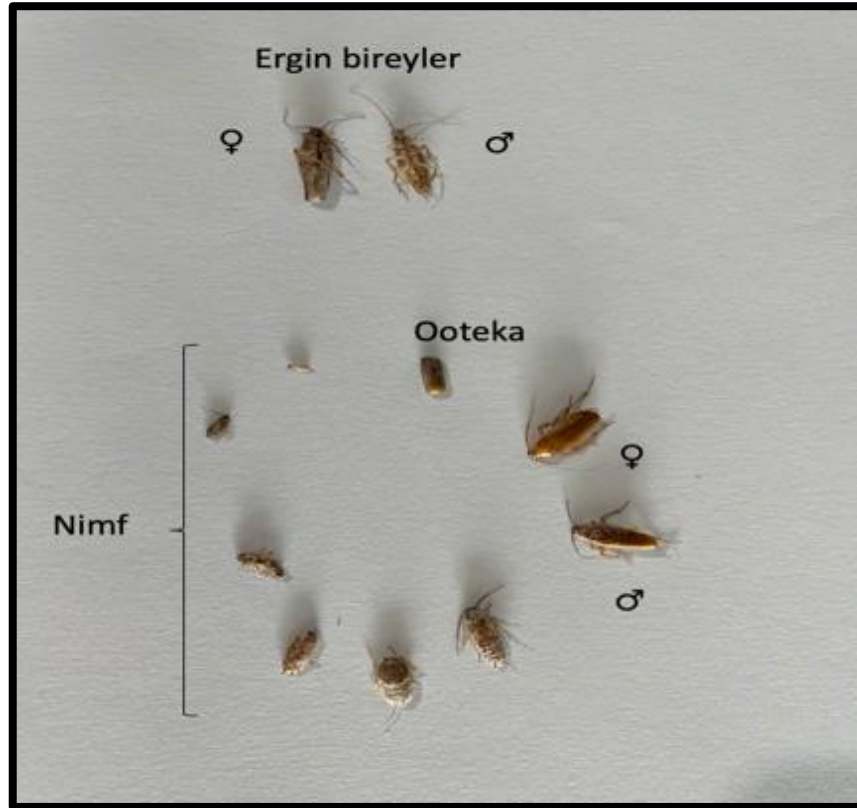
Yeryüzünde 5000 hamam böceği türünden çok azı kentsel alanlarda yaşamaktadır. Çoğu insan hamam böceklerini tam anlamıyla şehir zararlıları olarak görüyor. Alman hamam böceği kentsel alanlardaki en yaygın hamam böceği türüdür. Alman hamam böceğinin muhtemelen Güney Asya kökenli olduğunu, 18. yüzyılda Avrupa’da görüldüğü buradan tüm dünyayı istila ettiği tespit edilmiştir. Alman hamam böceğinin yayılması, ulaşım ağının gelişmesi, özellikle de sömürge ticaretinden ve daha soğuk iklimlerde iç mekân ısıtmasının iyileştirilmesiyle kolaylaştırılmıştır. Popülasyon genetiği çalışmalarıyla, Alman hamam böceğinin yeni bir yere yerleştirildikten sonra yerel genişleme yoluyla hızla yayıldığı tespit edilmiştir. Bu yerel genişleme, muhtemelen daha az besin gerektiren vücut boyutları, daha kısa nesil süreleri ve özellikle pestisit direnci açısından daha hızlı evrimi nedeniyle diğer kentsel hamam böceği türlerinin Alman hamam böceğiyle yer değiştirmesiyle sonuçlanmıştır (Tang 2019).

Çizelge 1.1 Alman hamam böceği (*Blattella germanica*) sistematığı

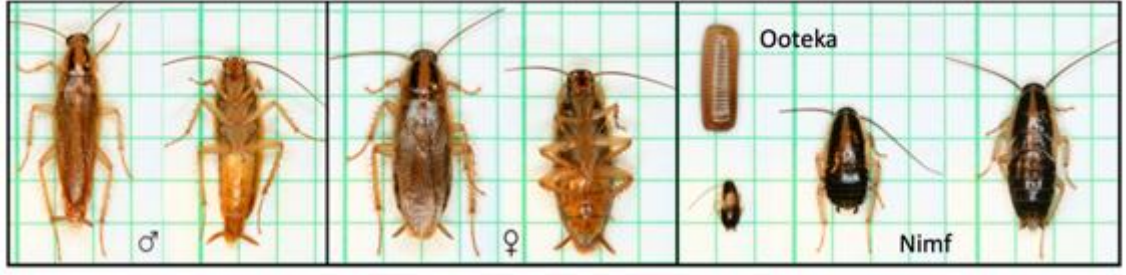
Alem	Animalia
Şube	Arthropoda
Alt şube	Hexapoda
Sınıf	Insecta
Alt sınıf	Pterygota
Takım	Blattodea
Familya	Blattellidae
Cins	<i>Blattella</i>
Tür	<i>Blattella germanica</i>

Alman hamam böceği (*Blattella germanica*) Blattaria takımı ve Blattellidae familyasına ait böcek türüdür (Foltz, 2001). Böcekler morfolojik olarak oval, sarımsı kahverengi, her zaman kanatlı olan, pronotum plakası üzerinde ortası açık renkli, yanlarda iki koyu bant

bulundururlar. Dişilerin ootekasından nimfler yumurta kanalında çıkar ve dişi bireyler bunları doğurarak yeryüzüne bırakır. Her ootekada 35-40 adet birey bulunur ve çift sıra halinde dizilmiştir. Ooteka yaklaşık 8mm uzunluğunda, 3 mm yüksekliğinde ve 2 mm genişliğindedir. Alman hamam böceği hemimetabolik bir böcektir. Yaşamlarında yumurta, nimf ve ergin evreleri bulunur. Alman hamam böceği uygun ekolojik koşullarda 6 nimf dönemi geçirir. Bir dişi, yaşamı boyunca toplam 200-250 yumurta ile 5-8 ootheka üretir. Ooteka teması veya insektisiteye maruz kaldıktan sonra dişiden ayrılırsa açılmaz. Nimf dönemi ootekanın açılmasıyla başlar ve yetişkinin ortaya çıkması ile sona erer. Nimflerin kanatları yoktur. Boyutları 13-14 mm arasındadır. Nimfler yetişkin olmadan önce 5-6 kez deri değiştirme evresi yaşar. Dişiler 140-280 gün, erkekler ise 90-140 gün yaşar. Tüm yaşam döngüsü (yumurtadan yumurtaya) yaklaşık 100 günde tamamlanır. Son deri değişiminde ortaya çıkan yetişkin tamamen kanatlıdır. Aktif büyüyen saha popülasyonlarının %80'i nimfler ve %20'si yetişkinlerden oluşur (Demirsoy 2006, Erdoğan ve Koçak 1989, Wang vd. 2021).



Şekil 1.1 Alman hamam böceği (*Blattella germanica*) yaşam döngüsü



Şekil 1.2 Alman hamam böceği (*Blattella germanica*) farklı yaşam evreleri (<https://www.hgsc.bcm.edu/arthropods/german-cockroach-genome-project>)

Alman hamam böceğinin hayatta kalmasını sınırlayan ana faktör soğuk havalardır. 15°C'nin altındaki sıcaklıklarda hamam böcekleri hayatta kalabilir ancak nimflerden yetişkinlere doğru gelişmeye devam etmez, bu türün hayatta kalması ve yumurta üretimi için sınırlayıcı faktördür. Kanatlar zaman zaman süzülme için kullanılır. Hareketleri koşucu bacaklarla sağlanmaktadır. Erginleri erkekler 10-13 mm, dişiler 11-14 mm uzunluğundadır. Erginlerin yaşam süresi bulunduğu yerin ekolojik koşullarına bağlı olarak (sıcaklık, nem, su ve besin) 3-5 ay arasında değişiklik göstermektedir. Her türlü besin maddesi ile beslenebilen gececi, omnivor ve kanibalist bir türdür. Çok çeşitli insan gıdaları, evcil hayvan yemi, meyve, deri ve hatta kitap ciltleri ile beslenir. En çok geceleri aktiftirler ve sık sık rahatsız edilmeyen çatlak ve yarıklarda yaşamayı tercih ederler. Gündüz saatlerinde Alman hamam böceği faaliyeti görmek, tipik olarak ciddi bir istila belirtisidir. Bir evde, çoğunlukla yiyecek ve suyun bulunduğu mutfak ve banyoda bulunurlar. Mutfakta, ocak ve buzdolabının etrafındaki ısı üreten alanlarda genellikle en fazla sayıda hamam böceği bulunurken, banyoda en çok lavabo, tuvalet ve küvet veya duş çevresinde bulunurlar. (Liang ve Schal 1993, Rust vd. 1995).

Alman hamam böceği nemli, gölgeli ve kirli kapalı ortamlarda yaşamayı tercih eder bu esnada çeşitli mikroorganizmalara maruz kaldıkları ve kolayca gıda kontaminasyonuna neden oldukları için tıp, veterinerlik ve halk sağlığı açısından önemli bir zararlıdır (Yang vd. 2019). Bu tür farklı ortamlara kolaylıkla uyum sağlar ve ev, hastane, yemekhane, fırın, restoran gibi ortamlarda kolaylıkla ürer. Ancak daha da önemlisi, Alman hamam böceği bakteri ve diğer patojenik ajanların önemli bir taşıyıcısı olan bir vektördür ve kendine özgü beslenme alışkanlıkları, dışkı atılımı, hızlı hareket etmesi ve konut ortamlarında yaşamaya uyum sağlaması nedeniyle bu patojenleri mekanik olarak insanlara

bulaştırabilir. Bu durum insan sağlığını tehlikeye atabileceği için bu türe ait popülasyonların izlenmesi ve kontrol altına alınması her zaman önemli olmuştur (Alexander vd. 1991, Mahjoob vd. 2010, Mengoni ve Alzogaray 2018).

1.1.2 Sentetik piretroidler ve permetrin

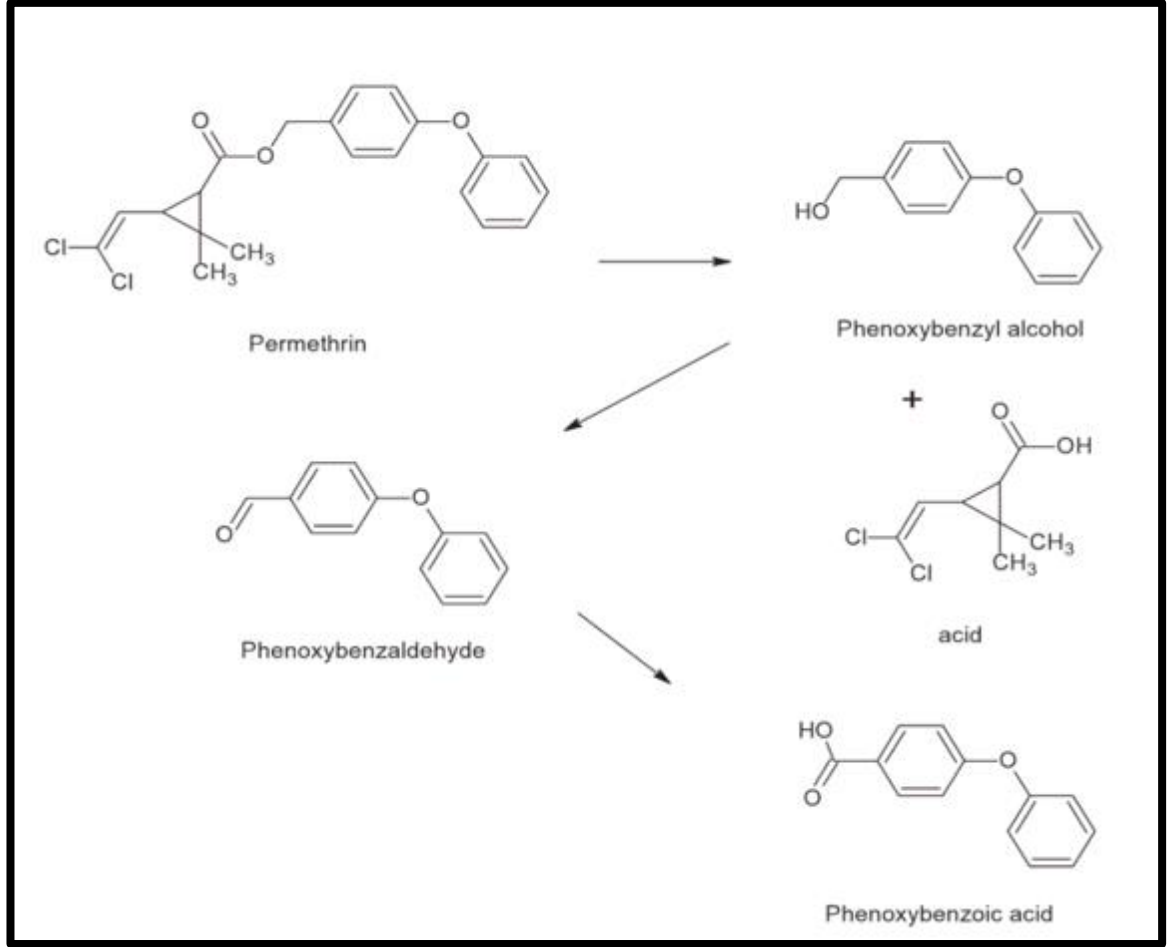
Halk sağlığı açısından önem taşıyan böceklerin mücadelesine yaygın olarak kullanılan dört ana insektisit grubu vardır. Bunlar organoklorinler, karbamatlar, organofosfatlar ve piretroidlerdir. Bu insektisitlerin tümü, sinirsel uyarısının sinaptik aralıkta veya akson boyunca yayılmasına etki ederek çalışır ve böceğin merkezi sinir sistemini hedef alır (Nauen 2007).

Sentetik piretroidler, 1940-1970 yılları arasında yoğun bir şekilde çalışılmış ve tetramethrin, resmethrin gibi piretroidler üretilmiştir. İnsektisidal aktivitelerinin yüksek olmasından dolayı günümüzde de çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Soderlund ve Bloomquist 1989). 1970'li yıllarda permetrin ve deltametrinin üretilmiştir. Piretroidler tarımsal alanlarda kullanıma elverişli olmaları ve yüksek fotostabilite özellikleri nedeniyle günümüzde de yaygın kullanılan bir insektisit sınıfıdır (Soderlund 2008).

Piretrinler *Tanacetum cinerariaefolium* bitkisinin çiçeklerinden elde edilen böcek öldürücü bileşiklerdir. Piretrum, aktif piretrin bileşiklerini içeren çiçeklerden elde edilir (Casida vd.1995, Proudfoot 2005). Piretroidler, belirgin zehirlenme semptomlarına, sinir sistemi üzerindeki etkilerine ve kimyasal yapılarına göre iki kategoriye (Tip I ve Tip II) ayrılır. Tip I piretroidler, Tip II piretroidlerden fenoksibenzil alkol kısmında bulunan bir α -siyano grubunun eksik olmasıyla ayırt edilirler. Tip I piretroidler ayrıca tek bir uyarana yanıt olarak tekrarlayan deşarjlara neden olurken, Tip II piretroidler hücresel uyarılabilirliğin baskılanmasıyla birlikte zar depolarizasyonuna neden olur (Narahashi 1986). Tip II piretroidler sadece öldürme etkinliğini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda sodyum kanalları üzerinde farklı bir etkiye sahiptir. Tip I piretroidler sodyum kanallarını aktive etme eğilimindeyken, Tip II piretroidler kanalların aktif durumunu uzatmaktadır (Lund ve Narahashi 1983).

Piretroidler böcekte hem periferik hem de merkezi sinir sistemini etkilemektedir. Piretroidler, böcekte tekrarlayan sinir deşarjlarını tetikleyerek felce neden olan, aksonlar boyunca elektriksel impuls iletimini etkileyen aksonik zehirlerdir (Ware ve Whitacre 2004). Piretroid grubu insektisitlerin en önemli özelliği az miktarda kullanılmalarına rağmen yüksek toksisiteye sahip olmalarıdır. Ayrıca hızlı knock-down etkileri çok önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Hem sıvı hem gaz kromatografisi ile analiz edilebilirler. Sinir hücrelerini bloke ederek zehirlilik etkisini gösterirler. Topikal veya besin olarak uygulanan formülasyonlarda kullanılabilirler. Pek çok piretroid memelilere karşı düşük toksisite göstermektedir (Elliot vd. 1977). Pek çok zararlı böceğin kontrolünde yaygın olarak kullanılan piretroidler hedef organizmaların direnç kazanmasından dolayı etkisiz hale gelmeye başlamıştır (Valles ve Yu 1996).

Bir Tip I piretroid olan Permetrin en sık kullanılan piretroidlerdendir. Permetrin [3-phenoxybenzyl (±) cis/trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxyla-te] halk sağlığı alanında, tekstil endüstrisinde, tarım alanlarında zararlılarla mücadelede yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir pestisitir (Casida vd.1983, Wang vd. 2016).



Şekil 1.3 Permetrinin moleküler yapısı (Hodgson, E. (2012). Biotransformation of individual pesticides: some examples. *Pesticide biotransformation and disposition*, 195-207)

Permetrin insanda hidroliz, esterleşme, oksidasyon ve konjugasyon yoluyla metabolize edilir. Bununla birlikte, permetrin, akut cilt maruziyetinde toksik olmayan bir etki gösterir ve gözde daha az toksisite sergiler (Bradberry ve Cage 2005, Toynton vd. 2009, Wylie vd. 2016).

Farklı grup pestisitlerle karşılaştırıldığında piretroidler hedef türlere karşı daha spesifiktir. Organofosfatlar, organoklorinler ve karbamatların LD₅₀ oranı (yani LD₅₀ sıçan/LD₅₀ böcek) <100 iken, piretroidlerin LD₅₀ oranı > 2000'dir (Katsuda 1999). Piretroidlerin memelilerde (fare, sıçan vb.) yüksek bir oral emilim oranı vardır, ancak dermal penetrasyon oranı düşüktür. Ve memelinin doğrudan oral dozu güvenli seviyenin (<1/10 LD₅₀) altında olduğunda, piretroid ve metabolitleri, sistemik absorpsiyondan

sonra herhangi bir doku veya organda büyük ölçüde birikmez (Kaneko 2010, Kaneko 2011). Ancak yüksek seviyelerde piretroidlere maruz kalmak, memeliler de dahil olmak üzere hedef olmayan türlere karşı nörotoksositeye neden olur. Fishel (2005), çoğu piretroidin kuşlar için toksik olmadığını ancak besin zinciri yoluyla piretroidlerden dolayı olarak etkilenebildiğini bildirmiştir. Çoğunlukla suda yaşayan omurgasızlarla beslenen su kuşları, özellikle piretroidlere karşı hassastır. Hedef dışı türlerdeki zehirlenme belirtileri böceklerde görülenlere benzerdir (Glomot 1982).

Sentetik piretroidlerin kolay degrade olması, memelilerde düşük toksisitesi ve hızlı etki göstermeleri nedeniyle yaygın bir şekilde kontrolsüzce kullanılmışlardır (Liu vd. 2010). Bu durum çevresel açıdan çeşitli problemler oluşturmaktadır. Yapılan birçok çalışmada, çevrede biriken piretroidler nedeniyle hedef olmayan sucul canlıların, arılar gibi diğer böceklerin ve mikroorganizmaların etkilendiğini göstermiştir. Ayrıca çevrede biriken piretroidler dolaylı yollardan insan sağlığını da tehdit etmektedir. Pestisit kalıntıları, insanların gıda zincirine girerek kronik toksisitenin oluşmasına neden olmaktadır (Gajendiran ve Abraham 2018, Ghazouani vd. 2020, Lu vd. 2019).

1.1.3 Piretroidlerin etki mekanizması

Sinir sistemi, hayvanların dış ve iç uyaranları algılamasını, algılanan bilgileri bütünleştirmesini ve işlemesini, hız ve koordinasyonla tepki vermesini sağlar. Sinir sistemlerindeki hızlı elektriksel ve kimyasal sinyaller nedeniyle bir hamamböceğini yakalamak zordur ve bir yusufluğu havadan kapmak neredeyse imkansızdır. Elektrik sinyalleri, aksonlar boyunca ve sinapslarda bir nörondan diğerine hızla yayılan aksiyon potansiyellerinden yani elektriksel impulslardan oluşur. Voltaj kapılı sodyum kanalı, akson boyunca aksiyon potansiyellerinin başlatılmasından ve yayılmasından sorumludur (Dong vd. 2014).

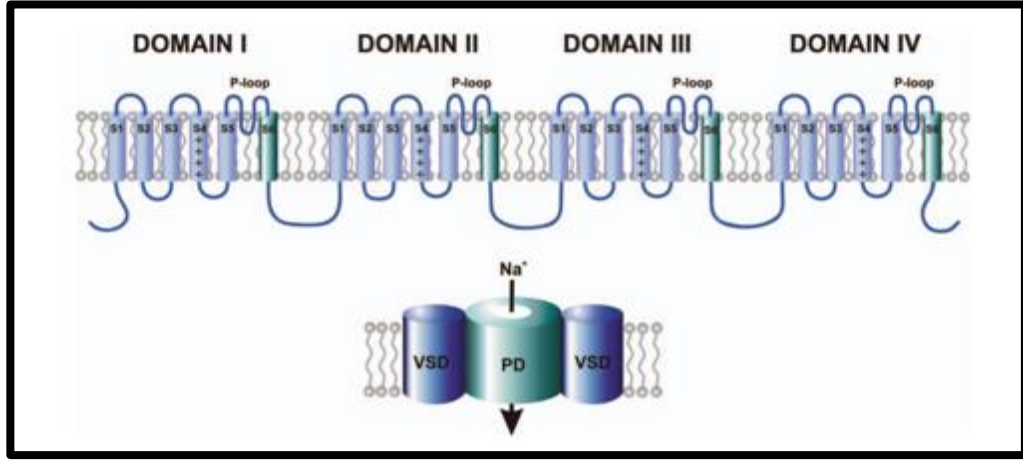
Piretroidlerin etki mekanizması, sodyum kanallarıyla etkileşim ve nöronlarda uzun süreli depolarizasyonun indüklenmesiyle gerçekleşmektedir. Piretroidler, sodyum kanallarının açık durumda olduğu süreyi uzatır. Sodyum kanalının açılıp kapanması normalde bir impuls geçtiğinde milisaniyeden daha kısa sürede gerçekleşmelidir. Bir piretroide maruz

kalmış zararlı böcekte kapanma geciktirilir. Kanalın kapalı tutulması geciktiğinde sodyum sızmaktadır. Buna bağlı olarak dinlenme potansiyeli elde edilemez ve impuls belirgin bir şekilde geçemez, ancak aksiyon potansiyeli eşğine ulaşmak için daha düşük bir potansiyel yükselişi gerekli olduğu için aksiyon potansiyelleri art arda gelmektedir (Stenersen 2004).

Piretroid grubu insektisitlerin birincil hedefi olan voltaj kapılı sodyum kanallarıdır. Voltaj kapılı sodyum kanalları uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin üretimi ve yayılması için gerekli olan integral transmembran proteinlerini içerir. Memeli sodyum kanalları, yaklaşık olarak gözenek oluşturucu bir 260 kDa α -alt biriminden oluşur. 33-36 kDa'lık bir veya iki aksesuar β -alt birimi (Goldin 2001). Sodyum kanalı proteininin genel organizasyonu omurgasızlar ve omurgalılar arasında benzerdir; α -alt birimi, her biri altı transmembran segmenti (S1-S6) içeren dört homolog alandan (I-IV) oluşur (Noda vd.1986). Dört alan, amino asit dizilerinin üç hücre içi veya hücre dışı döngüsüyle bağlanır. Memelilerde en az dokuz farklı sodyum kanalı α -alt birim geni tanımlanmıştır (Catterall 2000, Goldin vd. 2000). Böceklerde para tipi α -alt birim geni, fonksiyonel sodyum kanalını kodlayan tek gendir (Dong 2007).

Böcek sinir sisteminin *para* voltaj kapılı sodyum kanalı (Na_v) ilk olarak 1980'lerin sonunda meyve sineği *Drosophila melanogaster*'den klonlanmıştır ve adını bu canlıdaki X kromozomu üzerinde bulunan felç (paralise-para) lokusu içindeki konumundan almıştır. Böcek Na_v hücre içi bağlayıcılarla bağlanan 4 dahili homolog alandan (I-IV) oluşan memeli Na_v kanallarının α -alt birimi ile yapısal ve işlevsel olarak homologdur ve her bir alan 6 zar kapsayan segmentten meydana gelir (S1 – S6). Bu segmentler de hücre içi veya hücre dışı halkalarla birleştirilir. Akson zarı içinde, S5 ve S6 segmentleri, kanalın “voltajı algılayan” kısmını oluşturan S1–S4 segmentleri ile merkezi bir iyon ileten gözenek oluşturmak için bir araya gelir. S5 ve S6 arasındaki yeniden giren saç tokası halkaları (P-döngüleri), gözeneğin hücre dışı ucunda dar iyon seçici filtreyi oluşturur. Bir depolarizasyona yanıt olarak kanal, gözenekten seçici bir Na^+ akışına izin vermek üzere konformasyonel bir değişikliğe uğrar. Aktivasyonun voltaja bağlılığının, pozitif yüklü S4 segmentinin hareketinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bir depolarizasyon sırasında, Na^+ geçirgenliği hızla yükselir ve ardından, kanal inaktive edilmiş, iletken olmayan

durumlara dönüşürken azalır ve bu durumda, zar repolarize olana kadar ve kanal devre dışı kalana kadar kalır (Loughney 1989, Catteral 2000, Davies vd. 2007).



Şekil 1.4 Voltaj kapılı sodyum kanalının transmembran topolojisi

Direnç kazanan böceklerde sodyum kanallarının insektisit inhibisyonuna karşı duyarsızlığı, ilk olarak *Musca domestica*'da devrilen bir direnç olarak kaydedilmiştir (Farnham ve Sawicki 1976). Sivrisineklerde, sodyum kanalı içinde aynı bölgede hareket eden DDT ve piretroidler arasındaki çapraz dirençten çıkarılan *kdr* benzeri dirençten şüphelenildiğine dair birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar daha sonra Alman hamamböceğinde elektrofizyolojik ölçümlerle de doğrulanmıştır (Du vd. 2006, Chen vd. 2017, Liu vd. 2023).

1.1.4 Piperonil bütoksit (PBO) ve sinerjizm

Piretroid grubu aktif madde içeren formülasyonlarının toksisitesi, birlikte formüle edilen sinerjistler ile değerlendirilmelidir. Piperonil bütoksit (PBO), kullanılan en yaygın sinerjisttir. “Sinerjizm” terimi iki bileşiğin birlikte, bireysel faaliyetlerinin toplamından daha uyumlu bir aktivite gösterdiği durumlar için kullanılır. Sıklıkla bu bileşenlerden biri ya daha az toksiktir ya da hiç toksik değildir ve diğer bileşen ile kullanıldığında aktiviteyi belirgin bir şekilde arttırmaktadır (Perry vd. 2013).

Böcek mücadelesinde piretroid grubu insektisitlerin sık kullanımı zamanla hedef organizmada aktif maddeye karşı duyarlılığı düşürmektedir. Bu durumda aktif maddenin etkinliğini arttırmak amacıyla PBO gibi sinerjist görevi gören bazı organik bileşikler formülasyonlara eklemektedir (Gajendiran ve Abraham 2018).

PBO bir sitokrom P450 monooksijenaz inhibitörüdür. İnsektisit direncinin kırılmasında ticari formülasyonlarda kullanılır. Sinerjistler aktif madde etkinliğini artırır ve hedef organizmanın mücadelesine katkı sağlar (Rust vd. 1995, Zhu vd. 2016). En yaygın kullanılan ticari sinerjist olan PBO'nun kendi insektisidal aktivitesi yoktur, ancak enzim aktivitesini inhibe ederek ve aktif maddenin etkisini artırır. PBO, hedef organizmanın vücudunda detoksifikasyon sürecindeki enzimleri inhibe ederek çalışır. Sitokrom P450 olarak bilinen bu enzimler, insektisitlerin parçalanmasında ve böceğin vücudundan metabolite edilerek atılmasında önemli bir rol oynar. PBO, bu enzimleri inhibe ederek piretroid insektisitini etkili bir şekilde metabolize etmesini ve detoksifiye etmesini önler (Limoe vd. 2011, Dehkordi vd. 2017; Zimmer vd. 2017). Çalışmamızda sinerjist olarak kullandığımız PBO, Türkiye'de pestisit formülasyonları için sinerjist olarak kullanılan tek maddedir. Ülkemizde halk sağlığı zararlılarıyla mücadelesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Salehi vd. 2016; Çetin vd. 2019; Hu vd. 2020; Owuor vd. 2021, Öz ve Çetin 2022).

1.1.5 Direnç ve *kdr* direnci

Vektörler ve tarımsal zararlılarla mücadelede yoğun ve gereksiz kimyasal kullanımı çevre kirlenmesi, doğal dengenin bozulması ve zararlıların kısa sürede direnç kazanması gibi sonuçlar doğurmaktadır (Stumpf ve Nauen 2001). Direnç Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından “normal bir popülasyondaki bireylerin çoğunu öldürdüğü tespit edilen zehirli bir maddenin belirli bir dozuna karşı, aynı türün diğer popülasyonlarındaki bireylerin tolerans kazanması” olarak tanımlanmaktadır (WHO 1957). Bir zararlı böceğe karşı bir insektisit veya insektisit grubunun uzun süre devamlı olarak kullanılması halinde seleksiyon veya mutasyon yoluyla o böcekte aktif maddeye karşı direnç gelişebilir (Giray 1977).

Direnç zirai ve tıbbi bakımdan önemli zararlı eklem bacaklıların kontrol altına alınmasının önündeki en büyük engellerden biridir. Direnç artan uygulama dozları, ürün verimini düşürme, çevre kirliliği ve insan başta olmak üzere organizmalarda hastalıklarının ortaya çıkmasına neden olur (Scott vd. 1998). İnsektisit direncinde görülen bu mikro-evrim her geçen yıl birim alanda daha fazla kimyasal kullanımına yol açmaktadır. Bu da hedef olmayan türler üzerinde negatif etki ve çevresel kirlenme gibi ciddi ekolojik problemleri ortaya çıkarmaktadır (Kence 1988). Direnç gelişimi sonucunda zararlı mücadelesinde yüksek dozda ve sık insektisit uygulaması yapılmaktadır. Bu durum maddi açıdan kayıplara yol açmakla birlikte çevre kirliliği ve tozlaştırıcılar gibi hedef olmayan türlerin etkilenmesi gibi pek çok soruna yol açmaktadır. Direnç gelişiminin hızı; böceğin türüne ve üreme hızına, göç durumuna, yakınındaki hassas popülasyon varlığına ve pestisit uygulama dozuna bağlıdır (Demiröz 2015). Dirençli bireylerin çoğalması böceklerin kontrolünü zorlaştırmakta ve bunun sonucunda zararlının verdiği olumsuz etkileri artmaktadır. Direnç bazen insektisit uygulama sıklığının veya miktarının artırılması gibi yanlış uygulamalara yol açmaktadır (Tabashnik vd. 2014).

Bugüne kadar, insektisit direnç mekanizmalarının dört ana tipi belgelenmiştir: insektisit hedefli bölge genlerindeki nokta mutasyonları, detoksifikasyon enzimlerinin kodlama bölgelerindeki aşırı ekspresyon veya mutasyonlar, kütikül oluşumunda rol oynayan genlerdeki aşırı ekspresyon veya mutasyonlar ve davranış değişiklikleri (Whalon vd. 2008, Ranson vd. 2011). Bugüne kadar açıklanan ana mekanizmalar, insektisitlerin hedef aldığı bölgelerdeki nokta mutasyonunu ve/veya daha etkili detoksifikasyon mekanizmalarını içermektedir. Metabolik direnç olarak da bilinen ikincisi, esas olarak üç ana enzim ailesinin ekspresyonunda veya aktivitesinde bir artışa bağlı olarak ortaya çıkar: esterazlar (EST), glutatyon-S-transferazlar ve sitokrom P450 enzim süper ailesi (Beaty ve Marquadt 1996, Hemingway ve Ranson 2000, Hemingway vd. 2004, Li vd. 2007, Braga ve Valle 2007, Russell vd. 2011). Bu enzimlerin doğal popülasyonlardaki aktivitesinin ölçülmesi, dünya çapında insektisit direnç mekanizmalarının izlenmesinde önemli bir adımdır ve kullanılan insektisitlere duyarlılıkta önemli değişiklikleri önlemek için kontrol etkinliğinin gözetimi ile birlikte yürütülmelidir (Brogdon 1989, Brogdon ve McAllister 2004, Polson vd. 2011).

Alman hamam böceği insektisit direncinin gelişimi, bu zararlının popülasyonlarının kontrolünde önemli bir sorundur (Limoe 2011). Alman hamam böceği dünyanın farklı yerlerinde 42 aktif bileşen için direnç raporları ile insektisitlere en dayanıklı böcek türlerinin yer aldığı “İlk 20” listesinde yedinci sırada yer almaktadır (Whalon vd. 2008).

Alman hamam böceğinde *kdr* mutasyonunun, voltaj kapılı sodyum kanalı proteinlerinde amino asit değişimine neden olmaktadır. Bu durum piretroid duyarlılıklarını önemli ölçüde azaltmaktadır. Alman hamam böceği insektisit direnci, kendi genetik özelliklerinin yanı sıra akılcı olmayan ve düzensiz insektisit kullanımı ile ortaya çıkar. Bu nedenle geniş spektrumlu insektisitler kullanılırken daha fazla özen gösterilmelidir. Alman hamam böceğinin kullanılan insektisite karşı geliştirdiği direncin özellikleri, direncin seviyesi ve direncin mekanizmaları birlikte incelenmeli; uygulanan insektisit konsantrasyonu ve uygulama süresi bilimsel olarak makul aralıklarla kontrol edilmelidir. İsektisitlerin ve sinerjistlerin kullanımının yanı sıra diğer insektisitlerin rotasyonu ve karıştırılması da hedef zararlıyla mücadelede başarı elde etmeyi sağlayacaktır (Liu vd. 2023). Yüksek miktarda insektisit kullanımı hem etkin sonuç vermeyebilir hem de hedef olmayan canlıların olumsuz etkilenmesine ve doğanın kirlenmesine neden olabilir. Düzenli olarak yapılacak direnç çalışmaları ve veri kaydı zararlılarla mücadelede daha etkin sonuçların alınmasını sağlayacaktır. Böylelikle hedef olmayan organizmaların da olumsuz etkilenmesi en aza indirilecektir.

İsektisit direnci, direncin moleküler mekanizmaları ve rasyonel direnç yönetimi üzerine araştırmalar, vektör popülasyonlarında direncin gelişimini ve yayılmasını kontrol etmek için büyük önem taşımaktadır. Organofosfatlar ve karbamatlar için hedef bölge böcek asetilkolinesterazlarıdır. Piretroidler ve bir grup organoklorin (DDT ve analogları) için hedef bölge, sinir zarının Na⁺ kanalı düzenleyici proteinleridir. Organoklorinlerin (siklodienler) geri kalanı için, γ -aminobütirik asit (GABA) reseptörleridir. Üç ana direnç mekanizması türü; metabolik direnç (insektisitlerin hızlı detoksifikasyonuna veya sekestrasyonuna yol açan böcek enzim sistemlerindeki değişiklikler), hedef bölge direnci (böcek ilaçlarına bağlanmalarını önleyen insektisit hedef bölgelerinin değişiklikleri) ve kutiküler direnç (kalınlaşma veya değişiklik nedeniyle insektisitlerin penetrasyonunun azalması kutikülün kimyasal bileşimi) tarif edilmiştir (Karunaratne 2018).

DDT ve piretroidlere karşı direncin en yaygın şekli olan knock down direnci (*kdr*) ilk kez 1951'de Busvine tarafından karasineklerde keşfedilmiştir (Busvine 1951). *Kdr* faktörünün artık tüm piretroid ve piretrin sınıfının yanı sıra DDT ve analoglarına çapraz direnç kazandıran resesif bir alel olduğu bilinmektedir. Bu tür bir direnç artık birçok önemli haşere türünde rapor edilmiştir ve çoğu durumda, piretroidlere karşı çok daha fazla direnç sağlayan süper-*kdr* olarak adlandırılan ikinci bir resesif direnç özelliğine eşlik eder (Farnham 1987).

Kdr mutasyonları, böceklerde piretroidlere ve DDT'ye karşı azaltılmış nöron duyarlılığı sağlar (Soderlund ve Bloomquist 1990). *kdr* mutasyonları, piretroid bağlanmasını azaltarak ve sodyum kanallarının kapılma özelliklerini (kinetik veya voltaj bağımlılığı) değiştirerek piretroid etkilerini azaltır gibi görünmektedir (Silver vd. 2014). 1990'ların başlarında, birkaç grup genetik bağlantı analizi yürüttü ve *kdr* mutasyonlarının birkaç böcek türünde genlerle bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Soderlund ve Knipple 2003). Daha sonraki moleküler analizler, bu böceklerde *kdr* direnci ile ilişkili genlerdeki çoklu nokta mutasyonlarının tanımlanmasına sağlamıştır (Soderlund 2005). *Kdr* ile ilişkili mutasyonların piretroid direncine dahil olduğunu deneysel olarak doğrulamak için, bir dizi laboratuvar, mutant sodyum kanallarının piretroidlere duyarlılığını incelemek için *Xenopus oosit* ekspresyon sistemi kullanılmıştır. Bu durumda sodyum kanalı mutasyonunun *kdr* ve *kdr* tipi dirençten sorumlu olduğu doğrulanmıştır. En yaygın *kdr* mutasyonu, düşük seviyelerde piretroid direnci ile ilişkili alan II segment 6'da (IIS6) bir lösin (L) ile fenilalanin (F), histidin (H) veya serin (S) değişimidir. L'den F'ye mutasyon *kdr* Alman hamam böceği popülasyonlarında gösterilmiştir (Miyazaki vd. 1996, Smith vd. 1997, Dong 1997, Dong vd.1998, Zhao vd. 2000,).

Çizelge 1.2 Alman hamam böceği (*Blattella germanica*) voltaj kapılı sodyum kanallarına ait mutasyonlar

Mutasyon	Orijinal Numarası	Referans
L1014F	L993F	Miyazaki vd. 1996, Dong 2007
D59G E435K C785R L1014F P1999L	D58G E434K C764R L993F P1888L	Liu vd. 2000
F1020S	F999S	Pridgeon vd. 2002
L1014S	L996S	Liu vd. 2023

İnsektisit direnci, dünya çapında böcek vektör kontrolündeki sonuçları dışında önemli bir evrimsel fenomen olarak kabul edilir. İnsektisit direncinin gelişimi, doğrudan genetik, fizyolojik, davranışsal ve ekolojik faktörlere ve dolaylı olarak insektisit uygulamalarının hacmine ve sıklığına bağlıdır. Hamam böceklerinin çok sayıda yavru oluşturması ve besin ve çevre açısından pek çok ortama kolayca uyum sağlaması bakımından hamamböcekleri hızlı bir direnç mekanizmasına sahiptir. İnsektisit direnci, bir veya daha fazla dirençli aleli taşıyan bireylerde pre-adaptif bir fenomenle ilişkilendirilmiştir ve bu durum, takip eden insektisit uygulamalarının ardından zararlıların sayılarının artmasıyla tespit edilmiştir (Naqqsh vd. 2016, Zhu vd. 2016, Karunaratne vd. 2018). Piretroid direnci, zararlı popülasyonlarında piretroidlere karşı azaltılmış hassasiyet veya direnç gelişmesi anlamına gelir. Direnç zararlı organizmada genellikle voltaj kapılı sodyum kanallarında meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Bu mutasyonlar, piretroidlerin kanalları hedef almasını engelleyen veya etkisini azaltan değişikliklere neden olabilir. Piretroid direnci birikimsel bir süreçtir ve doğal seçim sonucunda ortaya çıkar. Seçim, dirençli bireylerin lehine işlediği için zamanla dirençli bireylerin sayısı artar. Yani insektisit direncinin gelişimi, bir hedef zararlıda potansiyel olarak düşük frekansta bulunan bir direnç geninin, bir insektisite maruz kalma yoluyla seçildiği ve daha sonra gen

frekansının arttırıldığı bir olgudur (Katsuda 2012). Böceklerdeki direncin evrimsel gelişimi sadece bu gen bölgelerinde değil aynı zamanda bu genlerin ifade bulduğu proteinler için de geçerli olduğu rapor edilmiştir (Rinkevich vd. 2013).

Alman hamam böceği, *Blattella germanica*, kozmopolit bir türdür ve pek çok nedenle bu zararlı ile mücadele devam etmektedir. Popülasyonlarındaki birey sayısı oldukça yüksektir. Piretroidler bu zararlı için uygulanan kimyasal mücadelede yaygın olarak kullanılan insektisitler arasındadır ve permetrin de bu mücadelede yaygın olarak tercih edilmiştir. Kimyasal mücadelede zararlının zamanla kullanılan insektisitlerin sürekli kullanılması sonucu böceğin insektisite karşı direnç kazanmasına neden olmaktadır (WHO 2006). Kullanılan insektisitlere karşı direnç kazanan türlerin direnç seviyelerinin belirlenmesi bu türlerle doğru mücadele yöntemlerinin izlemesinde son derece önemlidir. Direnç izleme, Alman hamam böceği popülasyonlarının insektisitlere verdiği yanıtlar hakkında değerli bilgiler sağlar. Mevcut popülasyonların direncindeki değişikliklerin saptanması, sinerjistlerin kullanımı, çeşitli insektisitlerin dönüşümlü kullanımı ve azaltılmış insektisit uygulaması dahil olmak üzere alternatif kontrol önlemlerine duyulduğu bildirilmiştir (Scott vd. 1998, Capel 1991).

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Örneklerin Toplanması

Bu tez çalışmasında kullanılan Alman hamam böceği örnekleri Ankara'nın çeşitli yerleşim bölgelerinden 2021 yılının Haziran-Ağustos aylarında toplandı. Örneklerin toplanması amacıyla Altındağ, Çankaya, Etimesgut, Keçiören ve Yenimahalle ilçelerinde bulunan 25 farklı noktaya hazırlanan tuzaklar yerleştirildi. Tuzaklar hazırlanırken pet şişe, vazelin, kağıt rulolar ve fıstık ezmesi kullanıldı (Gondhalekar ve Scharf 2012). Bazı bireyler şarjlı süpürge ve elle toplandı. Elde edilen bireyler popülasyon oluşturmak amacıyla Chang (2010)'ın çalışmasında belirtmiş olduğu $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, $\%50 \pm 10$ nem oranı ve 12saat ışık 12 saat karanlık foto-periyot koşullarında yetiştirildi. Popülasyonların kültüre alınması Hacettepe Üniversitesi Pestisit Araştırma ve Referans Laboratuvarı insektaryumunda gerçekleştirildi. Toplanan popülasyonlar plastik bidonlarda kültüre edildi. Hamam böceklerine yaşam alanı oluşturması amacıyla 8-10 adet kâğıt rulo bu bidonlara eklendi. Yetiştirme kaplarına un, mısır unu, süt tozu, pudra şekeri, irmik karışımı içeren besin karışımı ve su kaynağı eklendi. Bu tez çalışmasında toplam 5 popülasyon kullanıldı.

Çizelge 2.1 Çalışmalarda kullanılan Alman hamam böceği popülasyonlarının toplandığı yerler

Popülasyon	İlçe-Semt	Toplanan Yer
Altındağ	İskitler	Fırın
Duyarlı	HÜ Pestisit Araştırma ve Referans Laboratuvarı	Danimarka-WHO
Etimesgut	Etimesgut-Eryaman	Fırın
Keçiören	Etlik	Fırın
Hacettepe	HÜ Pestisit Araştırma ve Referans Laboratuvarı	Hastane



Şekil 2.1 Hamam böceklerinin elle ve şarjlı süpürgeyle toplanması



Şekil 2.2 Arazi çalışmalarında toplanan hamam böcekleri



Şekil 2.3 İnsektaryumda bulunan Alman hamam böceği yetiştirme kapları

2.2 Biyoassay Çalışmaları

2.2.1 Biyoassay çalışmalarda kullanılan kimyasallar

Bu tez çalışmasında uygulanan biyoassay çalışmalarında aktif madde olarak %95,5 saflıkta permetrin [(C₂₁H₂₀Cl₂O₃) (Dr. Ehrenstorfer GmbH)], sinerjist olarak %94 saflıkta Piperonil bütoksit [(PBO) (C₁₉H₃₀O₅) (Dr. Ehrenstorfer GmbH)] kullanıldı. Permetrin ve PBO'yu çözmek için Aseton (Merck Darmstadt) kullanıldı.

2.2.2 Uygulama dozlarının hazırlanması ve direnç testlerinin yapılması

Uygulamada kullanılacak olan permetrin dozları DSÖ'nün (2006) belirlediği etkin doz aralığı (125-250 mg/m²) dikkate alınarak, 6 doz olarak hazırlandı (Çizelge 2.2). DSÖ

standartlarına göre belirlenen miktarlarda permetrin, kalibre edilmiş hassas terazide (0.0001 hassasiyette) tartılarak aseton ile çözüldü (Limoe vd. 2011).

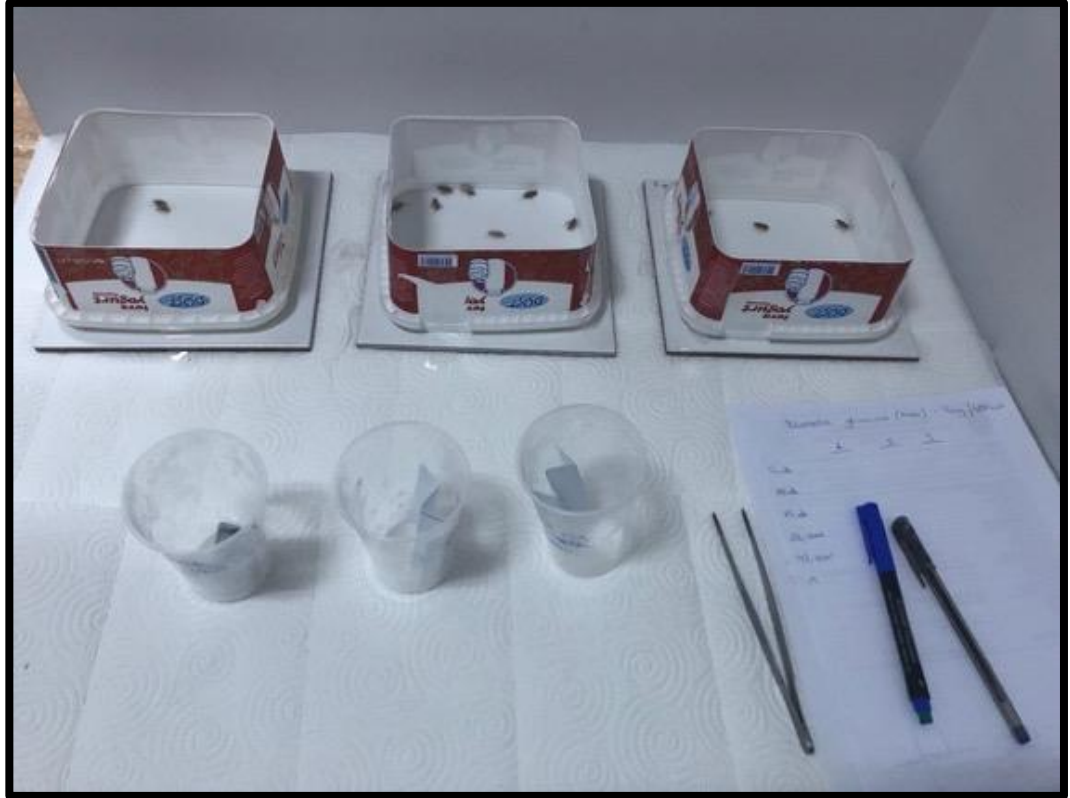
Çizelge 2.2 Alman hamam böceklerine uygulanan permetrin dozları

Sıra	DSÖ Dozu (mg/m ²)	Uygulama Dozu (mg/400cm ²)
1	250.0	100.0
2	125.0	50.0
3	25.0	10.0
4	5.0	2.0
5	1.0	0.4
6	0.25	0.1

Bioassay çalışmaları tarsal kontakt metoduyla gerçekleştirildi (WHO 1998, Cochran 1997, Ladonni 2001). Bunun için 20 cm x 20 cm (400 cm²) seramik yüzeyli karolar kullanıldı. Uygulama dozlarından 2 ml alınarak karolara yayıldı. Aseton uçurulduktan sonra her karo plastik kap ile çevrelendi. Her doz için 3 tekrarlı uygulama yapıldı. Doz başına her tekrar için 10 erkek birey seçildi toplamda 30 birey kullanıldı (Miyazaki vd. 1996). Seçilen bireyler uygulama yüzeyine bırakılır bırakılmaz kronometre çalıştırıldı. 5., 10. ve 15. dakikalardaki knock-down (baygın) bireyler kaydedildi. 15 dakika permetrine maruz bırakılan bireyler bekleme ortamına alındı 1. ve 24. saat sonundaki ölü bireylerin sayısı kaydedildi (Dong vd. 1998, Valles 2000, Limoe vd. 2007). Her doz uygulaması için kontrol grubu aynı popülasyonlardan 10'ar erkek birey ile sadece aseton uygulanmış seramik yüzeyli karo ile gerçekleştirildi. Elde edilen veriler probit analiziyle değerlendirildi (Finney 1972).



Şekil 2.4 Hazırlanan dozların uygulandığı seramik yüzeyler uygulanması ve popülasyon içinden denemelerde kullanılacak bireylerin seçilmesi



Şekil 2.5 Biyoassay çalışmalarının Alman hamam böceği popülasyonlarına uygulanması



Şekil 2.6 Uygulama dozlarının 24 saatlik bekletilme ortamı



Şekil 2.7 Uygulama dozlarının 24 saatlik bekletilme kabı

2.2.3 Piperonilbütoksit (PBO) ile yapılan sinerjist çalışmaları

PBO'nun permetrin insektisitine sinerjist etkisini değerlendirmek tüm popülasyonlarda 25 mg/m² olan dozu ile denemeler yapıldı. Permetrin ile yapılan biyoassay çalışmalarına ait yöntemler PBO deneylerinde de kullanıldı. Sinerjist çalışmalarında kullanılan uygulama dozları Çizelge 2.3'de gösterildiği gibidir. Seçilen erkek bireyler en düşük dozdan başlayarak sırayla denenmiş 5, 10, 15. dakikalarda knock down bireyler kaydedildi. 15 dakika permetrin ve PBO ya temas eden bireyler pet bardaklara alınarak, 1. ve 24. saat knock down verileri kaydedildi. Elde edilen veriler Probit analizinde değerlendirildi (Finney 1972).

Çizelge 2.3 Sinerjist çalışmaları için belirlenen dozlar

Dozlar	Permetrin (mg/m ²)	PBO (mg/m ²)	Permetrin /PBO Oranı
1	25	0	1:0
2	25	6.25	1:0.25
3	25	12.5	1:0.5
4	25	25	1:1

2.3 *kdr* Mutasyonu ile İlgili Çalışmalar

Permetrin ile yürütülmüş olan bioassay çalışmalarından sonra her doz denemesinde knock down olan ilk 5 birey ve son 5 birey moleküler çalışmalar için ayrıldı (Liu vd. 2000). Bu çalışmalarda mali yetersizlik nedeniyle 3 popülasyon [Duyarlı (hassas), Hacettepe (en az direnç gösteren) ve Altındağ (en yüksek direnç gösteren)]. Ayrılan örnekler 2 ml'lik ependorflara konulmuş ve numaralandırılıp -18⁰C'de saklanmıştır. Uygulanan dozlar için A (250 mg/m²), B (125 mg/m²), C (25 mg/m²) ve D (5 mg/m²); popülasyonlar için Duyarlı (D), Hacettepe (H), Altındağ (A) harfleri ile adlandırma yapılmıştır. Her bir popülasyonun uygulama dozuna ait örnekleri knock down oluş sırasına göre 1-10 sayılarıyla numaralandırılmıştır.



Şekil 2.8 Bioassay çalışmaları sonucunda moleküler çalışmalar için ayrılmış bireyler

Popülasyonlarda toplamda 110 birey kullanılarak, moleküler çalışmalar yapıldı. DNA ekstraksiyonu ve sonuçların değerlendirilmesi Gholizadeh vd. (2014) tarafından açıklanan yöntem kullanılarak yapıldı. *Kdr* direncini belirlemek için öncelikle Çizelge 2.4'te yer alan 1 ve 2 numaralı primerler tasarlandı. Bu primerlerden sonuç alınmadığı için aynı çizelgede yer alan 3 ve 4 numaralı yeni primerler tasarlanıp kullanıldı. Türe özgü primerler Gene Runner (versiyon 3.05, 1994, Hastings Software Inc., Hastings, NY) ve BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) yazılımı ile oluşturuldu (GenBank ID: U73583; Dong vd. 1998, Gholizadeh vd. 2014).

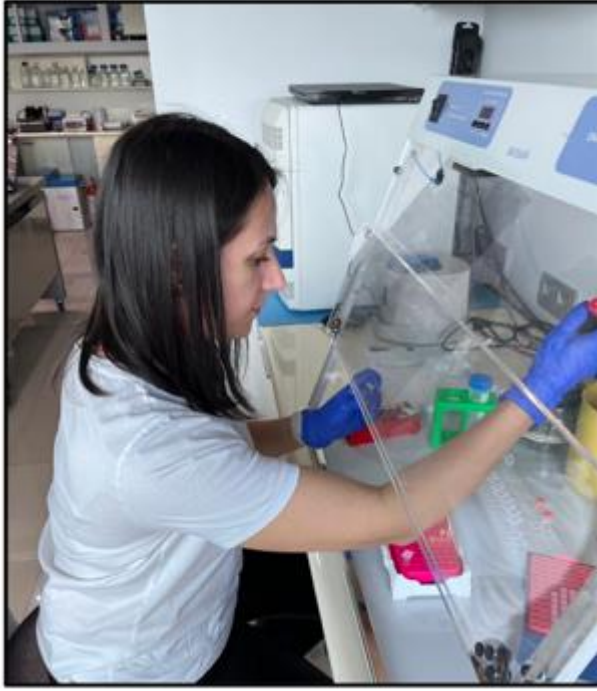
Çizelge 2.4 Alman hamam böceği *kdr* ilişkili genin çoğaltılması için kullanılan eski ve yeni primerler

	Primer	Primere ait dizi
1	<i>kdr</i> -F	GTGTTCCGAGTGTGTGTGG
2	<i>kdr</i> -R	TTCAGGGGTGACAATTCCTC
3	Yeni <i>kdr</i> -F	TGTTTCCGTTTGGCAGATAA
4	Yeni <i>kdr</i> -R	ATACGTTCCATTGGCTCTGC

kdr-F: forward *kdr* primeri, *kdr*-R: reverse *kdr* primeri

DNA izolasyon çalışmalarında EURx kiti (Kit for isolation of total DNA from human and animal tissues and bacteria) kullanıldı. İzolasyon çalışmaları, ürünün kullanım

kılavuzuna göre uygulandı. DNA İzolasyonu ve PZR için öncelikle hamam böcekleri homojenize edildi. Bunun için dondurucudan çıkarılan hamam böceklerinin baş kısımları kesilerek 1.5 ml'lik ependorf tüplerine konuldu. Deneylelerdeki işlem basamakları aşağıdaki sıralamaya göre uygulandı.



Şekil 2.9 Alman hamam böceği ile yapılan PZR çalışmaları

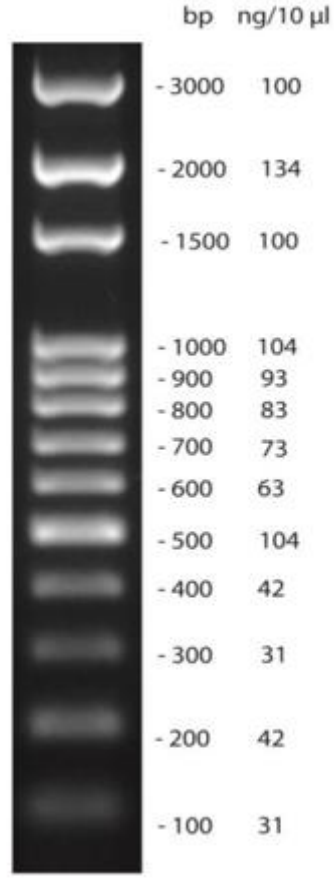
2.3.1 DNA izolasyonu

1. 50 µl Lyse T ependorfa eklendi. Örneğin başı antenleriyle birlikte alınarak ependorfa eklendikten sonra ezildi ve üzerine 300 µl Lyse-T eklendi.
2. 20 µl Proteinaz-K ve 2 µl RNAz A örneklere ekledi. Karışım vortekslendikten sonra 56⁰C de 1 saat inkübe edildi.
3. 350 µl Sol T eklendi ve 70⁰C 10 dk inkübe edildi.
4. 350 µl %100 lük etanol eklendi.
5. 12000 g 1 dk santrifüj edildi.
6. 600 µl süpernatant DNA binding spin kolona alındı.
7. 1 dk 11000 g de santrifüj edildi

8. Süpernatant atılmış ve Süpernatant atılmış ve 500 µl Wash TX2 eklenip 1 dk 11000 g de santrifüj edildi.
9. Alttaki tüp atılıp DNA spin kolonu yeni bir ependorfa yerleştirilmiştir ve DNA ya bağlanması için 50 µl Elution buffer eklendi.
10. 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve 1 dk 11000 g de santrifüj edilmiştir.
11. Elde edilen DNA -20 °C analiz edilene kadar saklandı.

2.3.2 PZR ve jel elektroforezi

1. Örnek başına PZR için 15.5 µl su, 5 µl PZR blend mix (solis biodyne) HOT FİREPolBel Master Mix, Forward ve reverse primer 1.25 µl ve DNA templete 2 µl alındı.
2. PZR koşulları 95°C 15 dk, 95°C 40 sn, 55 °C 40 sn, 72°C 45 sn, son 3 basamak 35 tekrar 72°C 5 dk olarak uygulandı. PZR bittikten sonra 8°C de PZR ürünü PZR cihazında kullanılmaya hazırlandı.
3. PZR ürünleri jel elektroforezinde yürütüldü. Agaroz jel için 1 gram Agar hassas terazide tartıldı ve 100 ml 1X TAE solüsyon ile karıştırılıp jel kıvamına gelinceye kadar ısıtıldı. 10X TAE (Tris, EDTA, Asetik asit) için 2.42 g Tris HCl, 18.61 g EDTA, 57.1 ml Asetik asit karıştırıldı ve seyreltilerek 1X'lik TAE elde edildi. Agar homojen olarak eridikten sonra içerisine 5 µl Etidyum bromür eklendi. Hazırlanan jel kasetlere döküldü ve tarak yerleştirilerek jelin donmasıyla beraber kuyucuklar oluşturuldu. İlk kuyucuya Ladder yüklendi ardından örnekler için sırayla PZR ürünleri diğer kuyucuklara yüklendi. Jele yükleme yapıldıktan sonra elektroforez tankı 100 volt akımda 60 dakikaya yürütüldü. Jel elektroforezinden sonra PZR ürünlerinin 700 bp aralığında olduğu görülmüştür. %1 lik 1 X TAE tampon 100 volt akımda 60 dk yürütüldü. Etidium bromür kullanılarak UV görüntüleme yapıldı. Çalışmamıza ait ilgili gen bölgesindeki mutasyonun 650 bp (baz çifti) aralığına geldiği tespit edilmiştir.



Şekil 2.10 Jel elektroforezinde yürütülen PZR ürünleri için kullanılan ladder

Agaroz jelde istenilen şekilde sonuç veren PZR ürünleri sekanslama çalışması öncesinde kullanılan solüsyonlardaki boyalardan arındırmak için saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi şu şekilde yapıldı: 30 µl bead (manyetik boncuk) PZR ürünü içeren işlem tüplerine yerleştirildi. Tüpler vorteksledikten sonra 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Manyetik platelere inkübe edilen işlem tüpleri yerleştirildi. Bu şekilde oda sıcaklığında 3 dk daha inkübe edilerek beadlerin tüplerin duvarına yapışması sağlandı. İşlem sonucunda süpernatant döküldü ve 200 µl %80.0'lik etanol ile 2 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi sonrasında alkol uçuruldu ve 25 µl distile su eklenerek saflaştırma işlemi tamamlandı.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1 Bioassay Çalışmalarına Ait Bulgular

Bu tez çalışmasında Alman hamam böceğinin Ankara popülasyonlarında permetrin aktif maddesine karşı direncini belirlemek amacıyla ilk 15 dk knock down birey sayılarının ve 24 saat sonundaki ölüm oranlarının belirlendiği biyoassay çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalarda elde edilen veriler çizelgelerle gösterildi. Bu verilere ve uygulama dozlarına göre probit analizi ile LD₅₀, LD₈₀, LD₉₀, LD₉₅ ve LD₉₉ değerleri belirlendi.

Uygulama dozlarında 250 mg/m² dozu 24 saat sonunda duyarlı popülasyonda %100 ölüm oranı oluşturdu. Yerel popülasyonlarda bu dozda 24 saat sonundaki ölüm oranları Altındağ popülasyonunda %76.7; Etimesgut popülasyonunda %80, Hacettepe popülasyonunda %100 ve Keçiören popülasyonunda %86.7 bulundu. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından permetrin için önerilen alt sınır uygulama dozu olan 125 mg/m² dozu 24 saat sonra duyarlı popülasyonda %100 (Çizelge 3.1), Altındağ popülasyonunda %70 (Çizelge 3.2), Etimesgut popülasyonunda 73.3 (Çizelge 3.3); Hacettepe popülasyonunda 93.3 (Çizelge 3.4); Keçiören popülasyonunda ise %76.7 oranında ölüm gerçekleşti (Çizelge 3.5). Bu dozun 1/5 oranında uygulanan 25 mg/m² dozunun 24 saat sonunda duyarlı popülasyonda %96.7, Altındağ popülasyonunda %46.7, Etimesgut popülasyonunda %53.3, Hacettepe popülasyonunda 66.7 ve Keçiören popülasyonunda %56.7 ölüm oranı tespit edildi. Biyoassay çalışmalarında kullanılan daha düşük dozlardaki 24 saat sonundaki ölüm oranlarının tüm popülasyonlarda daha düşük olduğu görüldü. Uygulama dozu azaldıkça tüm popülasyonlarda 24 saat sonundaki ölüm oranlarının azaldığı tespit edildi. Bu çalışma sonuçlarına göre permetrinin duyarlı popülasyona göre yerel popülasyonlarda daha düşük ölüm oranı oluşturduğu görüldü. Yerel popülasyonların permetrin aktif maddesine hassasiyet durumlarının sırasıyla Hacettepe, Keçiören, Etimesgut, Altındağ popülasyonları şeklinde olduğu belirlendi.

Çizelge 3.1 Duyarlı popülasyonda permetrin ile yapılan biyoassay çalışmaları verileri

Uygulama Dozları	Zaman		1. Tekrar (Birey sayısı)	2. Tekrar (Birey sayısı)	3. Tekrar (Birey sayısı)	Toplam (Birey sayısı)	Ölüm Yüzdesi
250 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	4	5	7	16	53.3
		10 dk	7	7	8	22	73.3
		15 dk	9	9	10	30	100.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		10	10	10	30	100.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		100.0	100.0	100.0		100.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
125 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	3	2	2	7	23.3
		10 dk	7	4	6	17	56.7
		15 dk	10	10	10	30	100.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		10	10	10	30	100.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		100.0	100.0	100.0		100.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	5	3	3	11	36.7
		10 dk	7	6	6	19	63.3
		15 dk	10	9	8	27	90.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		10	10	9	29	96.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		100.0	100.0	90.0		96.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	
5 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	0	1	1	3.3
		10 dk	2	3	4	9	30.0
		15 dk	6	6	5	17	56.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		6	8	8	22	73.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		60.0	80.0	80.0		73.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	
1 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	0	1	1	3.3
		10 dk	1	0	3	4	13.3
		15 dk	2	1	5	8	26.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		8	4	5	17	56.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		80.0	40.0	50.0		56.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	
0,25 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	1	0	0	1	3.3
		10 dk	3	1	1	5	16.7
		15 dk	2	1	0	3	10.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		4	4	5	13	43.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		40.0	40.0	50.0		43.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	

Çizelge 3.2 Altındağ popülasyonunda permetrin ile yapılan biyoassay çalışmaları verileri

Uygulama Dozları	Zaman (dk)		1.Tekrar (Birey sayısı)	2.Tekrar (Birey sayısı)	3.Tekrar (Birey sayısı)	Toplam (Birey sayısı)	Ölüm Yüzdesi
250 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	1	1	0	2	6.7
		10 dk	1	1	0	2	6.7
		15 dk	1	1	1	3	10.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		9	7	7	23	76.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		90.0	70.0	70.0		76.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	
125 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	1	0	0	1	3.3
		10 dk	0	1	0	1	3.3
		15 dk	1	0	2	3	10.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		8	6	7	21	70.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		80.0	60.0	70.0		70.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	0	0	0	0.0
		10 dk	0	0	0	0	0.0
		15 dk	1	1	1	3	10.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		5	5	4	14	46.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		50.0	50.0	40.0		46.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	
5 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	0	0	0	0.0
		10 dk	0	1	0	1	3.3
		15 dk	1	1	0	2	6.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		4	5	3	12	40.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		40.0	50.0	30.0		40.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
1 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	0	0	0	0.0
		10 dk	0	0	0	0	0.0
		15 dk	0	0	0	0	0.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		4	4	3	11	36.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		40.0	40.0	30.0		36.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	
0,25 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	0	0	0	0.0
		10 dk	0	0	0	0	0.0
		15 dk	0	0	0	0	0.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		1	1	2	4	13.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		10,0	10,0	4,0		13.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	

Çizelge 3.3 Etimesgut popülasyonunda permetrin ile yapılan biyoassay çalışmaları verileri

Uygulama Dozları	Zaman (dk)		1. Tekrar (Birey sayısı)	2. Tekrar (Birey sayısı)	3. Tekrar (Birey sayısı)	Toplam (Birey sayısı)	Ölüm Yüzdesi
250 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	1	1	1	3	10.0
		10 dk	2	2	1	5	16.7
		15 dk	3	4	3	10	33.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		9	8	7	24	80.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		90.0	80.0	70.0		80.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
125 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	1	0	1	2	6.7
		10 dk	2	1	1	4	13.3
		15 dk	2	1	3	6	20.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		8	7	7	22	73.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		80.0	70.0	70.0		73.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	1	0	0	1	3.3
		10 dk	1	1	0	2	6.7
		15 dk	2	1	2	5	16.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		6	5	5	16	53.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		60.0	50.0	50.0		53.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	
5 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	0	0	0	0.0
		10 dk	0	1	0	1	3.3
		15 dk	2	1	2	5	16.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		5	4	5	14	46.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		50.0	40.0	50.0		46.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	
1 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	0	0	0	0.0
		10 dk	0	0	0	0	0.0
		15 dk	1	2	1	4	13.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		4	5	4	13	43.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		40.0	50.0	40.0		43.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	
0,25 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	0	0	0	0.0
		10 dk	0	0	0	0	0.0
		15 dk	0	1	0	1	3.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		1	2	2	5	16.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		10.0	20.0	20.0		16.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	

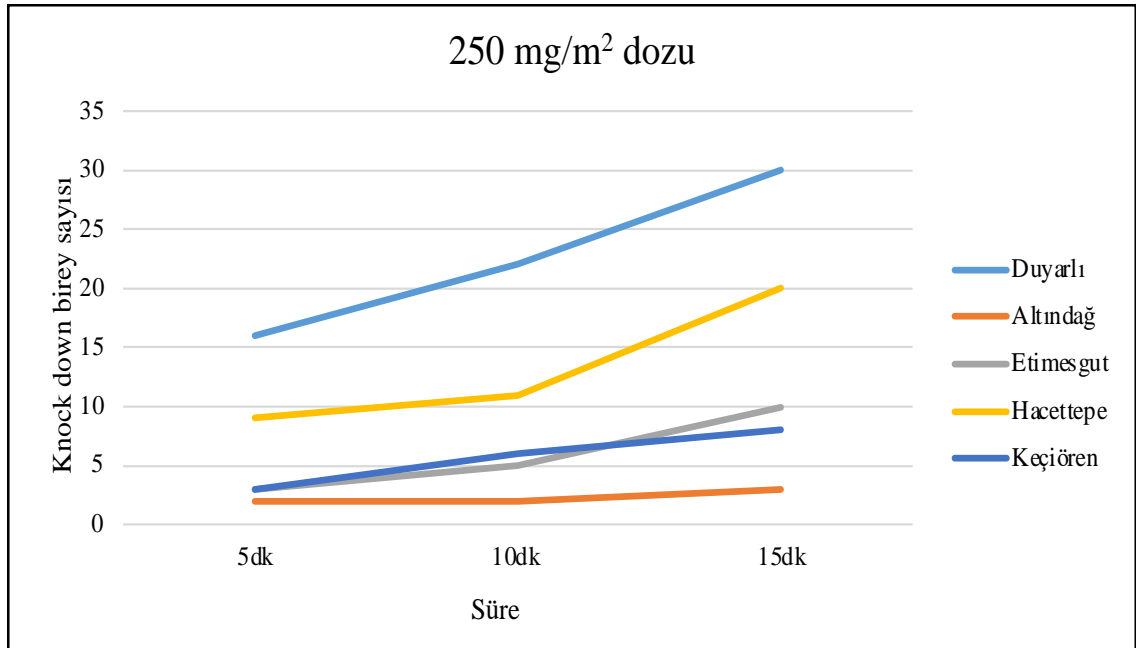
Çizelge 3.4 Hacettepe popülasyonunda permetrin ile yapılan biyoassay çalışmaları verileri

Uygulama Dozları	Zaman (dk)		1.Tekrar (Birey sayısı)	2.Tekrar (Birey sayısı)	3.Tekrar (Birey sayısı)	Toplam (Birey sayısı)	Ölüm Yüzdesi
250 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	4	3	2	9	30.0
		10 dk	5	4	2	11	36.7
		15 dk	8	6	6	20	66.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		10	10	10	30	100.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		100.0	100.0	100.0		100.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
125 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	1	0	1	3.3
		10 dk	2	3	2	7	23.3
		15 dk	4	4	5	13	43.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		9	9	10	28	93.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		90.0	90.0	100.0		93.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	1	1	1	3	10.0
		10 dk	0	1	2	3	10.0
		15 dk	2	4	3	9	30.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		6	7	7	20	66.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		60.0	70.0	70.0		66.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	
5 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	1	0	2	3	10.0
		10 dk	3	1	2	6	20.0
		15 dk	5	3	2	10	33.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		8	6	4	18	60.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		80.0	60.0	40.0		60.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
1 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	0	0	0	0.0
		10 dk	0	0	1	1	3.3
		15 dk	1	0	2	3	10.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		5	5	4	14	46.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		100.0	100.0	100.0		46.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	
0,25 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	1	0	1	3.3
		10 dk	1	2	1	4	13.3
		15 dk	1	2	0	3	10.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		2	2	1	5	16.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		100.0	100.0	100.0		16.7
	Toplam Birey		10	1	10	30	

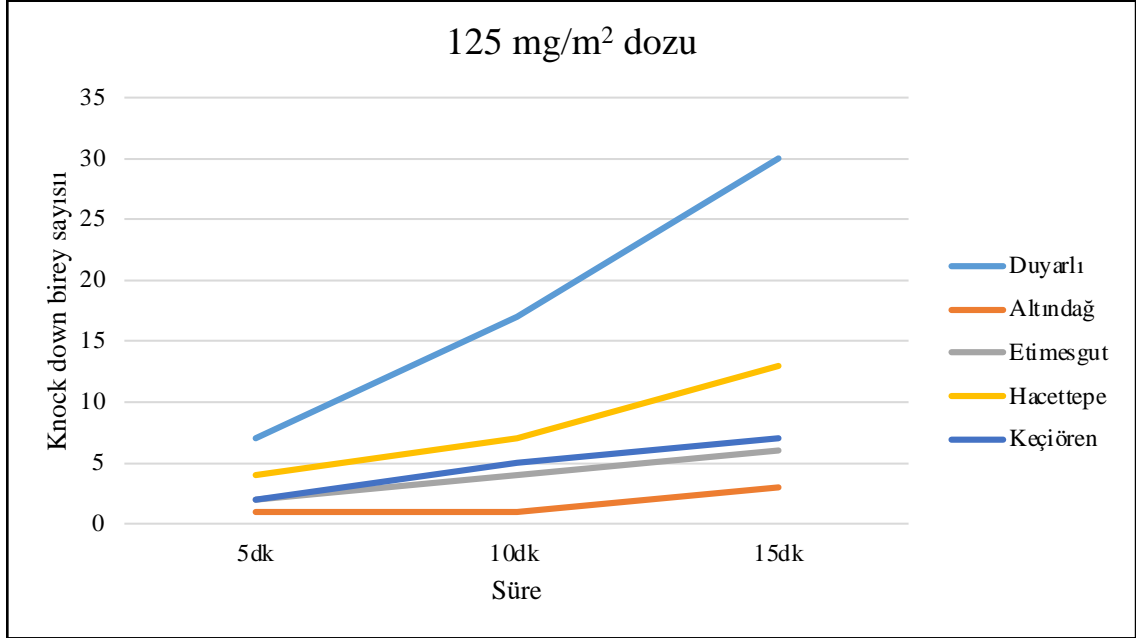
Çizelge 3.5 Keçiören popülasyonunda permetrin ile yapılan biyoassay çalışmaları verileri

Uygulama Dozları	Zaman		1.Tekrar (Birey sayısı)	2.Tekrar (Birey sayısı)	3.Tekrar (Birey sayısı)	Toplam (Birey sayısı)	Ölüm Yüzdesi
250 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	1	1	1	3	10.0
		10 dk	2	2	2	6	20.0
		15 dk	2	3	3	8	26.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		9	9	8	26	86.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		90.0	90.0	80.0		86.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	
125 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	1	0	1	2	6.7
		10 dk	2	2	1	5	16.7
		15 dk	2	2	3	7	23.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		7	8	8	23	76.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		70.0	80.0	80.0		76.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	1	1	2	6.7
		10 dk	2	1	1	4	13.3
		15 dk	3	2	2	7	23.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		6	6	5	17	56.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		60.0	60.0	50.0		56.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	
5 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	0	0	0	0.0
		10 dk	0	0	0	0	0.0
		15 dk	2	1	2	5	16.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		5	5	5	15	50.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		50.0	50.0	50.0		50.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
1 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	0	0	0	0.0
		10 dk	0	0	0	0	0.0
		15dk	2	1	2	5	16.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		5	5	5	15	50.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		50.0	50.0	50.0		50.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
0,25 mg/m ²	Knock down sayısı	5 dk	0	0	0	0	0.0
		10 dk	0	0	0	0	0.0
		15 dk	1	0	1	2	6.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		1	2	2	5	16.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		10.0	20.0	20.0		16.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	

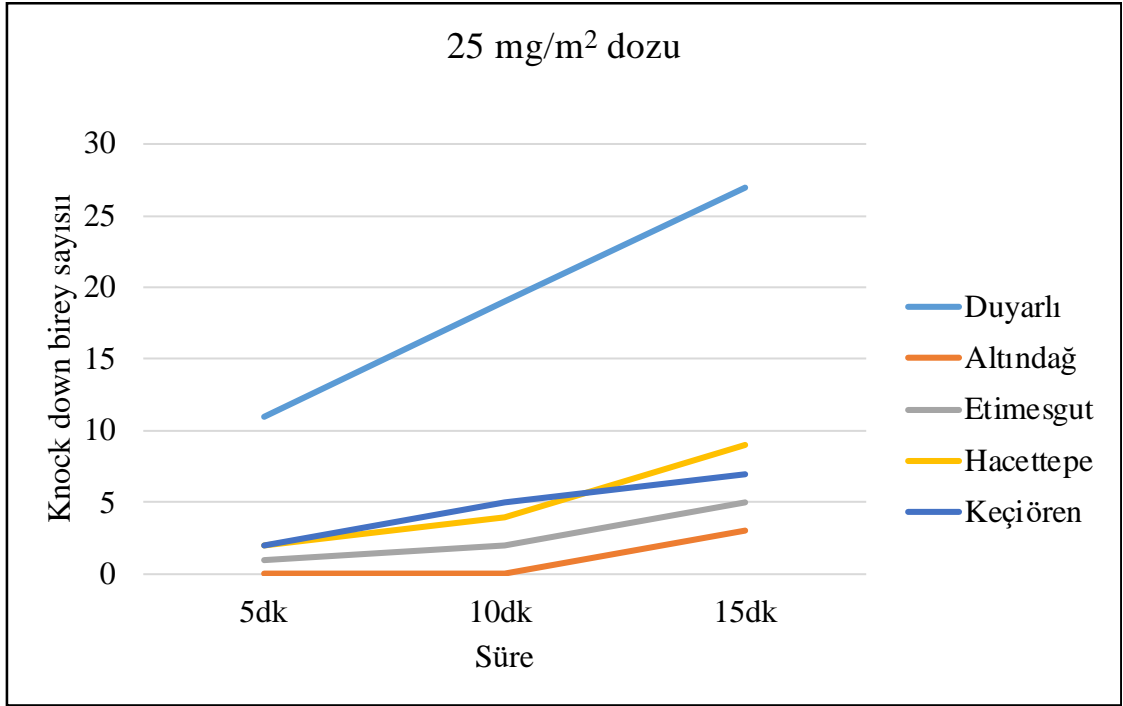
Biyoassay çalışmalarının sonuçları her popülasyonda 5, 10, 15 dk sonundaki knock down olan birey sayılarıyla oluşturulan grafiklerle de değerlendirildi. Buna göre en düşük uygulama dozu hariç tüm dozlarda duyarlı popülasyonda knock down olan birey sayısı doğrusal artış göstermediği belirlendi. En düşük uygulama dozunda duyarlı popülasyonda ters yönlü bir dönüş görüldü (Şekil 3.6). Bu durumun uygulama dozunun düşük olmasına bağlı olarak knock down bireylerin yeniden ayık duruma geçmesiyle oluştuğu tespit edildi. Yerel popülasyonlarda bu durum tersiymiş gibi görünse de tüm yerel popülasyonlarda ilk 10 dk hiç knock down birey olmaması, 15 dk sonunda 0-2 knock down birey olmasından kaynaklandığı belirlendi. Oluşturulan bu grafiklere göre de aktif maddeye kısa süreli maruziyetin oluşturduğu knock down sayısı oranı 24 saat sonundaki ölüm oranı ile doğru orantılı bulundu. En yüksek knock down oluşturan popülasyonun duyarlı popülasyon olduğu belirlendi. Yerel popülasyonlarda ise knock down birey sayısı en yüksek Hacettepe popülasyonunda gözlemlendi. Knock down birey sayıları diğer yerel popülasyonlarda ise yüksekten düşüğe sırasıyla Keçiören, Etimesgut, Altındağ popülasyonları şeklinde oldu.



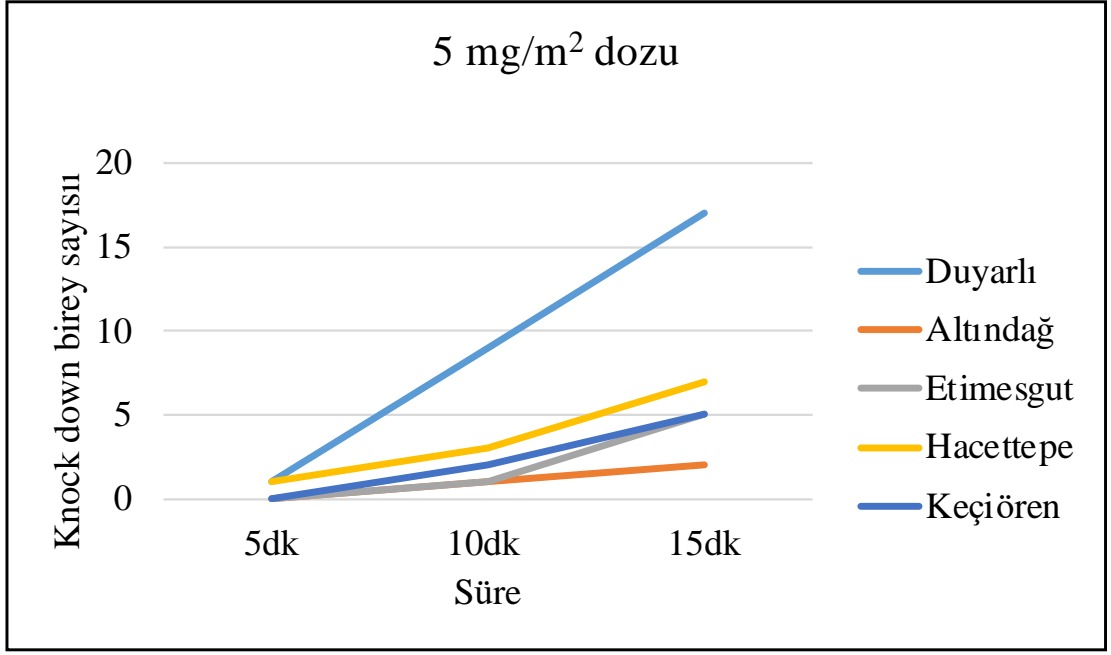
Şekil 3.1 Popülasyonlara ait 250 mg/m² dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları



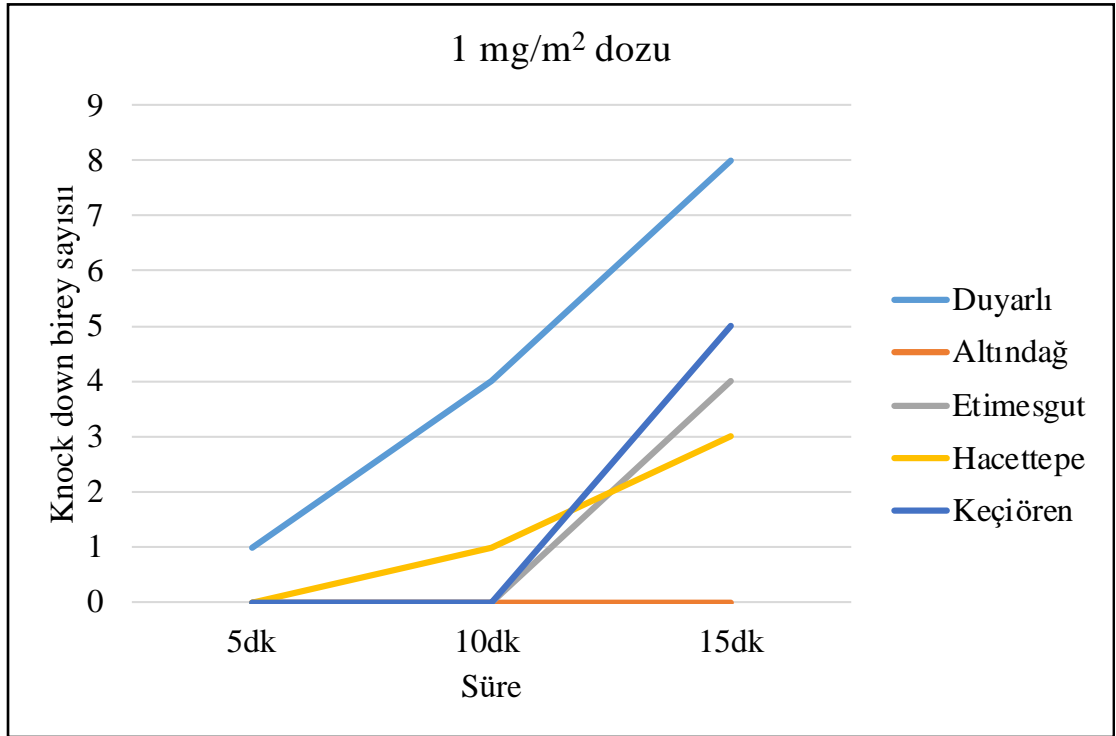
Şekil 3.2 Popülasyonlara ait 125 mg/m² dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları



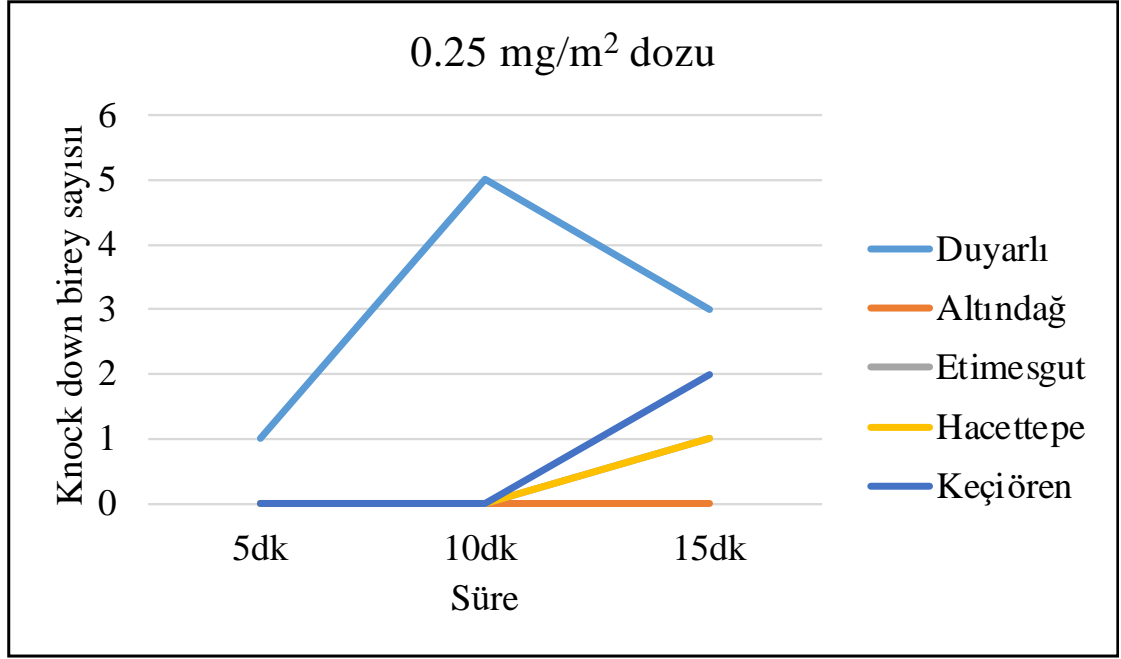
Şekil 3.3 Popülasyonlara ait 25 mg/m² dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları



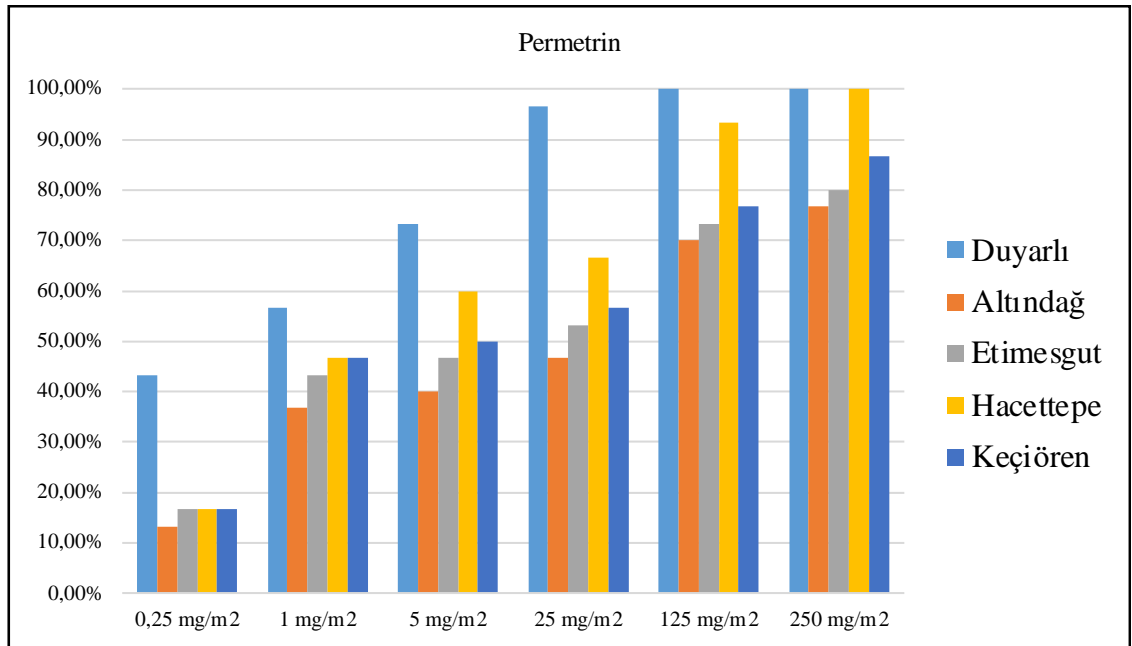
Şekil 3.4 Popülasyonlara ait 5 mg/m² dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları



Şekil 3.5 Popülasyonlara ait 1 mg/m² dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları



Şekil 3.6 Popülasyonlara ait 0.25 mg/m² dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları



Şekil 3.7 Uygulama dozlarına ait 24 saat sonunda ölen birey sayıları

Biyoassay çalışmalarındaki veriler ile probit analizi yapıldı ve her popülasyonun letal dozları (LD) hesaplandı. Buna göre LD₅₀ değeri yani popülasyonun %50'sini öldüren

medyan dozun (Tabashnik 2014) duyarlı popülasyonda 0.55 mg/m², Altındağ popülasyonunda 14.32 mg/m², Etimesgut popülasyonunda 7.64 mg/m², Hacettepe popülasyonunda 2.75 mg/m², Keçiören popülasyonunda 6.37 mg/m² olduğu bulundu.

Probit analizi sonucunda belirlenen LD değerlerine göre yerel popülasyonların duyarlı popülasyona göre direnç katsayıları tespit edildi (Çizelge 3.7). Direnç katsayısı yerel popülasyonların LD₅₀, LD₈₀, LD₉₀, LD₉₅, LD₉₉ değerleri, duyarlı popülasyonun LD₅₀, LD₈₀, LD₉₀, LD₉₅, LD₉₉ değerlerine bölünerek elde edildi (Pai vd. 2005, Chang vd. 2010, Tabashnik vd. 2014). Duyarlı popülasyon ile karşılaştırıldığında permetrin için LD₅₀ düzeyinde direnç katsayıları Altındağ popülasyonunda 26.03, Etimesgut popülasyonunda 13.89, Hacettepe popülasyonunda 2.75 ve Keçiören popülasyonunda 6.37 olduğu tespit edildi. Direnç katsayıları tüm LD seviyelerinde en yüksek Altındağ, sonra Etimesgut, Keçiören, Hacettepe popülasyonları sırası şeklinde olduğu görüldü. Bu durumun Çizelge 3.7’de gösterildiği gibi düşük dozlarda yerel popülasyonlardaki 24 saat sonundaki düşük ölüm oranından kaynaklandığı tespit edildi.

Çizelge 3.6 Permetrin dozlarıyla elde edilen probit analiz sonuçları (%95 güven aralığı)

	Duyarlı	Altındağ	Etimesgut	Hacettepe	Keçiören
LD₅₀	0.55	14.32	7.64	2.75	6.37
LD₈₀	4.30	546.79	328.19	32.61	157.83
LD₉₀	12.56	3669.58	2342.23	118.75	844.95
LD₉₅	30.41	17676.40	11870.37	345.21	3377.14
LD₉₉	159.65	337420.83	249238.80	2555.12	45421.79
Slope	0.97	0.53	0.52	0.79	0.60
Intercept	5.25	4.37	4.53	4.65	4.50
SD	1.03	1.85	1.91	1.25	1.64
SE	0.22	0.31	0.32	0.23	0.28
R²	0.92	0.92	0.92	0.92	0.95
Chi-test (χ^2) Sig	0.86	0.87	0.88	0.84	0.94
df	2	4	4	3	4

Çizelge 3.7 Alman hamam böceği Duyarlı(D), Altındağ(A), Etimesgut(E), Hacettepe(H), Keçiören (K) popülasyonlarında Permetrin ile yapılan bioassay çalışmalarından elde edilen direnç katsayıları

Popülasyon	A/D	E/D	H/D	K/D
LD ₅₀	26.03	13.89	5.00	11.58
LD ₈₀	127.16	76.32	7.58	36.70
LD ₉₀	292.16	186.48	9.45	67.27
LD ₉₅	581.26	390.34	11.35	111.05
LD ₉₉	2113.50	1561.15	16.00	284.50

Direnç katsayısı=LD X popülasyonu /LD Duyarlı popülasyon

3.2 Piperonilbütoksit (PBO) ile İlgili Çalışma Bulguları

Sinerjistler, günümüzde insektisitlerin etkinliğini arttırmak için, özellikle direncin ortaya çıktığı durumlarda kullanılmaktadır. Sinerjistler, hedef organizmada detoksifikasyon enzimi inhibitörü olarak işlev yapar. İnsektisit ile beraber kullanıldığında, dirençli bir zararlıya karşı, insektisidi daha düşük dozlarla uygulama olanağı sağlar (Bernard ve Philogène 1993). Bu tez çalışması kapsamında Alman hamam böceği üzerinde kullanılan permetrin etkinliğine katkısına bakmak için Piperonilbütoksit (PBO) sinerjist olarak kullanıldı. PBO için yapılan biyoassay çalışmalarına ait sonuçlar Çizelge 3.8, 3.9, 3.10, 3.11 ve 3.12’ de görüldüğü gibidir. Permetrin aktif maddesine farklı oranlarda PBO eklenerek yapılan biyoassay çalışmaları yürütüldü. Bu çalışmaların sonucuna göre 24 saat sonundaki ölüm oranlarının en yüksek 1:1 permetrin-PBO oranında olduğu görüldü. Daha sonra sırasıyla 1:0.5 oranında, 1:0.25 oranında olduğu ve en düşük ölüm oranının 1:0 yani hiç PBO eklenmeyen doz uygulamasında olduğu görüldü.

Aynı miktardaki permetrine farklı oranlarda PBO eklenerek gerçekleştirilen biyoassay çalışmalarında duyarlı popülasyonda %100 ölüm görüldü. Altındağ popülasyonunda 24 saat sonundaki ölüm oranlarına bakıldığında 1:1 oranlı uygulama dozunda %83.3; 1:0.5 oranlı uygulama dozunda %76.7; 1:0.25 oranlı uygulama dozunda % 53.3 ölüm oranı tespit edildi. Etimesgut popülasyonunda 24 saat sonundaki ölüm oranlarına bakıldığında 1:1 oranlı uygulama dozunda %90; 1:0.5 oranlı uygulama dozunda %80; 1:0.25 oranlı

uygulama dozunda %63.3 ölüm oranı tespit edildi. Hacettepe popülasyonunda 24 saat sonundaki ölüm oranlarına bakıldığında 1:1 oranlı uygulama dozunda %100; 1:05 oranlı uygulama dozunda %93.3, 1:0.25 oranlı uygulama dozunda % 73.3 ölüm oranı görüldü. Keçiören popülasyonunda 24 saat sonundaki ölüm oranlarına bakıldığında 1:1 oranlı uygulama dozunda %90; 1:05 oranlı uygulama dozunda %83.3, 1:0.25 oranlı uygulama dozunda % 63.3 ölüm oranı belirlendi. Permetrine farklı oranlarda PBO eklenmesinin 24 saat sonundaki ölüm oranlarını arttırdığı ve buna bağlı olarak permetrin etkinliğini arttırdığı görüldü.

Çizelge 3.8 Duyarlı popülasyon PBO ile yapılan biyoassay çalışmalarının verileri

Uygulama Dozları	Zaman		1.Tekrar (Birey sayısı)	2.Tekrar (Birey sayısı)	3.Tekrar (Birey sayısı)	Toplam (Birey sayısı)	Ölüm Yüzdesi
25 mg/m ² Permetrin + 25mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	5	5	7	17	56.7
		10 dk	8	8	8	24	80.0
		15 dk	10	9	10	30	100.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		10	10	10	30	100.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		100.0	100.0	100.0		100.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 12.5mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	4	4	5	13	43.3
		10 dk	7	5	7	22	73.3
		15 dk	10	10	10	30	100.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		10	10	10	30	100.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		100.0	100.0	100.0		100.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 6.25mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	5	4	3	12	40.0
		10 dk	7	7	7	21	70.0
		15 dk	10	9	10	29	96.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		10	10	10	30	100.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		100.0	100.0	100.0		100.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 0 mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	5	3	3	11	36.7
		10 dk	7	6	6	19	63.3
		15 dk	10	9	8	27	90.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		10	10	9	29	96.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		100.0	100.0	90.0		96.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	

Çizelge 3.9 Altındağ popülasyonu PBO ile yapılan biyoassay çalışmalarının verileri

Uygulama Dozları	Zaman		1.Tekrar (Birey sayısı)	2.Tekrar (Birey sayısı)	3.Tekrar (Birey sayısı)	Toplam (Birey sayısı)	Ölüm Yüzdesi
	Knock down sayısı						
25 mg/m ² Permetrin + 25mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	1	2	1	4	13.3
		10 dk	2	2	1	5	16.7
		15 dk	2	3	2	7	23.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		9	8	8	25	83.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		90.0	80.0	80.0		83.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 12.5mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	1	1	0	2	6.7
		10 dk	1	1	1	3	10.0
		15 dk	1	1	3	5	16.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		8	7	8	23	76.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		80.0	70.0	80.0		76.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 6.25mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	0	1	1	2	6.7
		10 dk	1	2	1	4	13.3
		15 dk	2	2	3	7	23.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		6	5	5	16	53.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		60.0	50.0	50.0		53.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 0 mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	0	0	0	0	0.0
		10 dk	0	0	0	0	0.0
		15 dk	1	1	1	3	10.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		5	5	4	14	46.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		50.0	50.0	40.0		46.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	

Çizelge 3.10 Etimesgut popülasyonu PBO ile yapılan biyoassay çalışmalarının verileri

Uygulama Dozları	Zaman		1.Tekrar (Birey sayısı)	2.Tekrar (Birey sayısı)	3.Tekrar (Birey sayısı)	Toplam (Birey sayısı)	Ölüm Yüzdesi
	Knock down sayısı						
25 mg/m ² Permetrin + 25mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	1	2	2	5	16.7
		10 dk	2	3	2	7	23.3
		15 dk	4	4	4	12	40.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		9	9	9	27	90.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		90.0	90.0	90.0		90.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 12.5mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	1	1	1	3	10.0
		10 dk	2	2	2	6	20.0
		15 dk	2	3	4	9	30.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		8	7	9	24	80.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		80.0	70.0	90.0		80.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 6.25mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	1	1	1	3	10.0
		10 dk	1	2	2	5	16.7
		15 dk	2	2	3	7	23.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		7	6	6	19	63.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		70.0	60.0	60.0		63.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 0 mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	1	0	0	1	3.3
		10 dk	1	1	0	2	6.7
		15 dk	2	1	2	5	16.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		6	5	5	16	53.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		60.0	50.0	50.0		53.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	

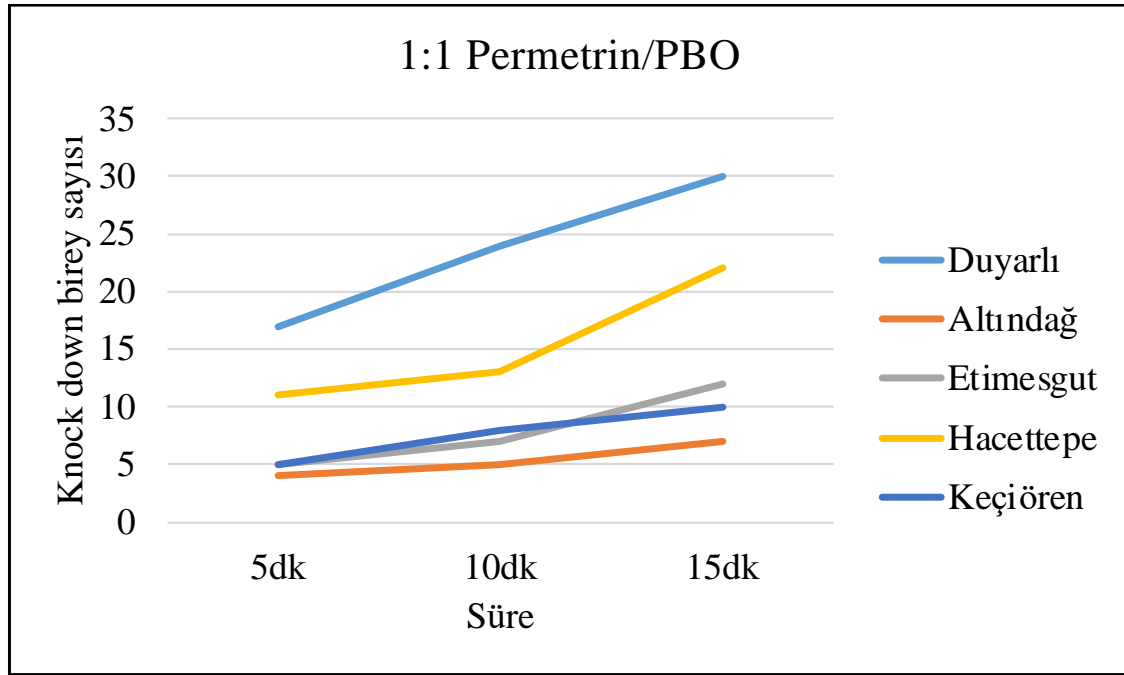
Çizelge 3.11 Hacettepe popülasyonu PBO ile yapılan biyoassay çalışmalarının verileri

Uygulama Dozları	Zaman		1.Tekrar (Birey sayısı)	2.Tekrar (Birey sayısı)	3.Tekrar (Birey sayısı)	Toplam (Birey sayısı)	Ölüm Yüzdesi
	Knock down sayısı						
25 mg/m ² Permetrin + 25mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	4	5	2	11	36.7
		10 dk	6	4	3	13	43.3
		15 dk	8	7	7	22	73.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		10	10	10	30	100.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		100.0	100.0	100.0		100.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 12.5mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	1	1	1	3	10.0
		10 dk	3	4	3	10	33.3
		15 dk	4	4	5	13	43.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		9	9	10	28	93.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		90.0	90.0	100.0		93.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 6.25mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	2	1	2	5	16.7
		10 dk	1	2	2	5	16.7
		15 dk	3	4	4	11	36.7
	24. Saat Ölüm Sayıları		7	7	8	22	73.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		70.0	70.0	80.0		73.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 0 mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	1	1	1	2	6.7
		10 dk	0	1	2	4	13.3
		15 dk	2	4	3	9	30.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		6	7	7	20	66.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		60.0	70.0	70.0		66.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	

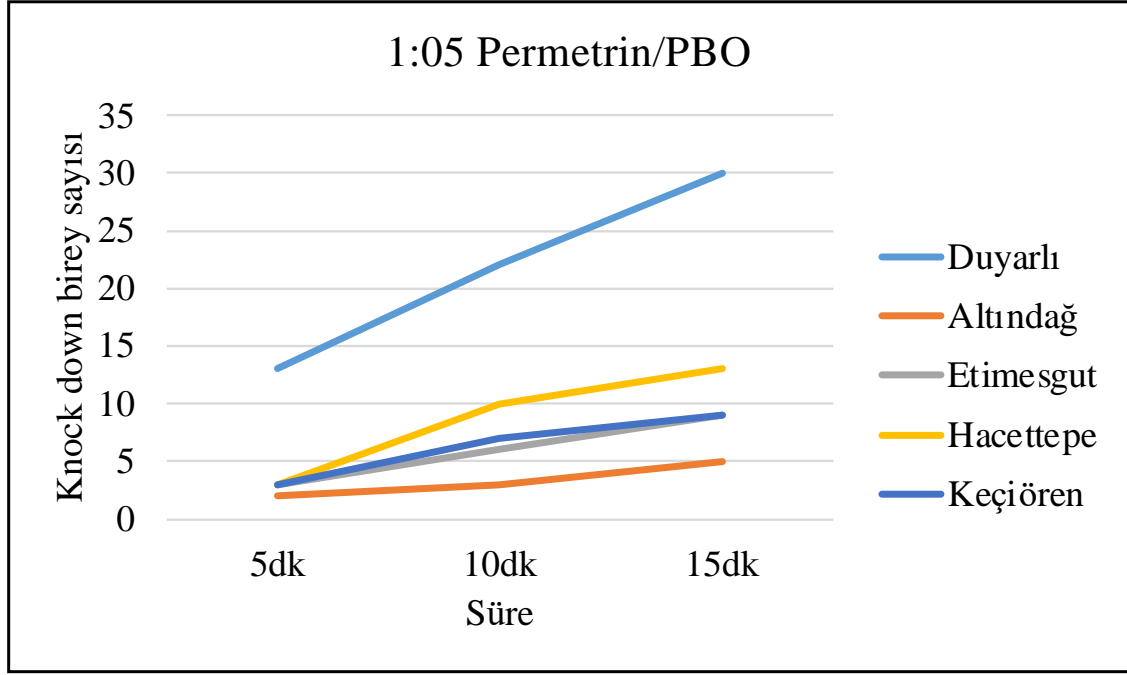
Çizelge 3.12 Keçiören popülasyonu PBO ile yapılan biyoassay çalışmalarının verileri

Uygulama Dozları	Zaman		1.Tekrar (Birey sayısı)	2.Tekrar (Birey sayısı)	3.Tekrar (Birey sayısı)	Toplam (Birey sayısı)	Ölüm Yüzdesi
25 mg/m ² Permetrin + 25mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	1	2	2	5	16.7
		10 dk	3	2	3	8	26.7
		15 dk	3	4	3	10	33.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		10	9	8	27	90.0
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		100.0	90.0	80.0		90.0
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 12.5mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	1	1	1	3	10.0
		10 dk	2	3	2	7	23.3
		15 dk	3	2	4	9	30.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		8	8	9	25	83.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		80.0	80.0	90.0		83.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 6.25mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	1	1	2	4	13.3
		10 dk	2	2	2	6	20.0
		15 dk	3	4	2	9	30.0
	24. Saat Ölüm Sayıları		7	6	6	19	63.3
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		70.0	60.0	60.0		63.3
	Toplam Birey		10	10	10	30	
25 mg/m ² Permetrin + 0 mg/m ² PBO	Knock down sayısı	5 dk	0	1	1	2	6.7
		10 dk	2	1	1	4	13.3
		15 dk	3	2	2	7	23.3
	24. Saat Ölüm Sayıları		6	6	5	17	56.7
	24. Saat Ölüm Yüzdesi (%)		60.0	60.0	50.0		56.7
	Toplam Birey		10	10	10	30	

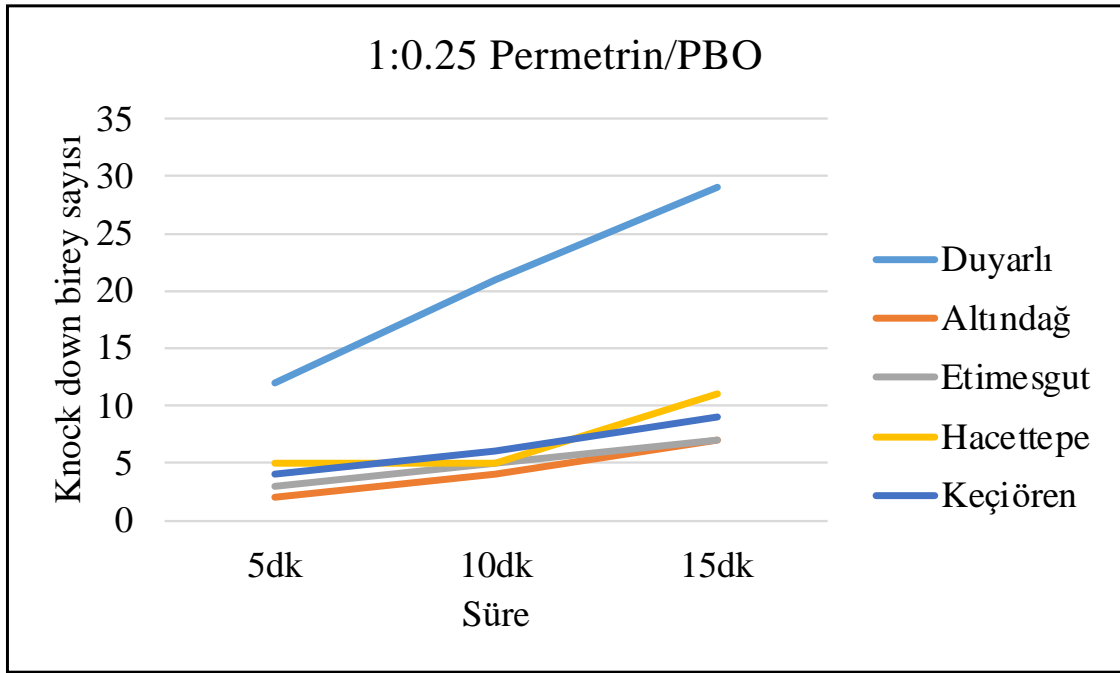
Permetrin aktif maddesine PBO eklenmesiyle hazırlanan uygulama dozlarıyla yapılan biyoassay çalışmalarına göre her popülasyonda 5, 10, 15 dk sonundaki knock down olan birey sayıları grafiklerle değerlendirildi. Buna göre tüm uygulama dozlarında duyarlı popülasyondaki uygulama süre arttıkça knock down olan birey sayısı artmıştır ve grafiklerde doğrusallık göstermiştir. Yerel popülasyonlarda da uygulama süresi arttıkça knock down birey sayısı artmıştır. Bu verilere göre knock down birey sayısı duyarlı popülasyondan sonra en yüksek Hacettepe popülasyonunda, sonra sırasıyla Keçiören, Etimesgut ve Altındağ popülasyonlarındadır. Permetrine PBO eklenmesiyle oluşturulan dozlara kısa süreli maruziyetin oluşturduğu knock down birey sayılarının 24 saat sonundaki ölüm oranı ile uyumlu görüldü (Şekil 3.8).



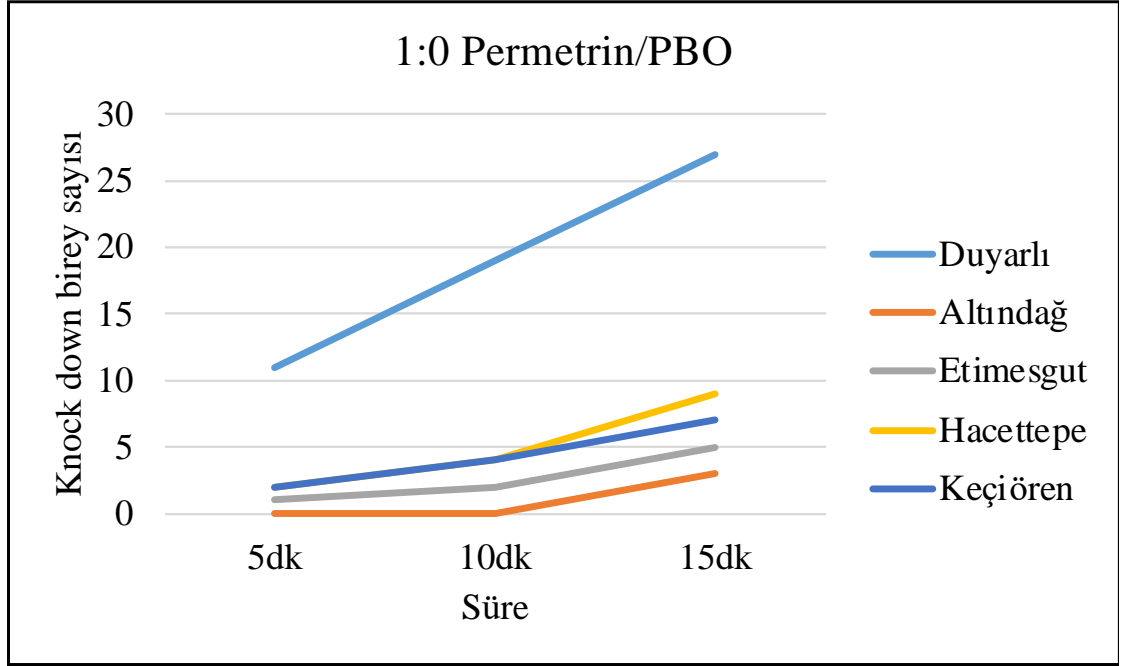
Şekil 3.8 Popülasyonlara ait 25 mg/m² permetrin/ 25 mg/m² PBO dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları



Şekil 3.9 Popülasyonlara ait 25 mg/m² permetrin/12.5 mg/m² PBO dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları



Şekil 3.10 Popülasyonlara ait 25 mg/m² permetrin/ 6.25mg/m² PBO dozu 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları



Şekil 3.11 Popülasyonlara ait 25 mg/m² permetrin 5, 10 ve 15. dakikalara ait knock down sayıları

Permetrin aktif maddesine PBO eklenerek uygulanan dozlara ait veriler probit analiziyle değerlendirildi. Buna göre her popülasyonun letal dozları (LD) hesaplandı ve LD değerlerine göre direnç katsayıları tespit edildi (Çizelge 3.14). Direnç katsayısı hesaplaması permetrin ile yapılan biyoassay çalışmalarında olduğu gibi yerel popülasyonların LD değerlerinin duyarlı popülasyonun LD değerlerine bölünmesiyle elde edildi. PBO eklenerek uygulanan permetrin dozlarına ait LD₅₀ düzeyinde direnç katsayıları Altındağ popülasyonunda 1088.23, Etimesgut popülasyonunda 658.82, Hacettepe popülasyonunda 226.95 ve Keçiören popülasyonunda 534.11 olduğu tespit edildi. Direnç katsayıları tüm LD düzeylerinde en yüksek Altındağ, sonra Etimesgut, Keçiören, Hacettepe popülasyonları sırası şeklinde olduğu belirlendi.

Çizelge 3.13 Permetrin+PBO dozlarıyla yapılan biyoassay çalışmalarına ait probit analizi verileri (%95 güven aralığı)

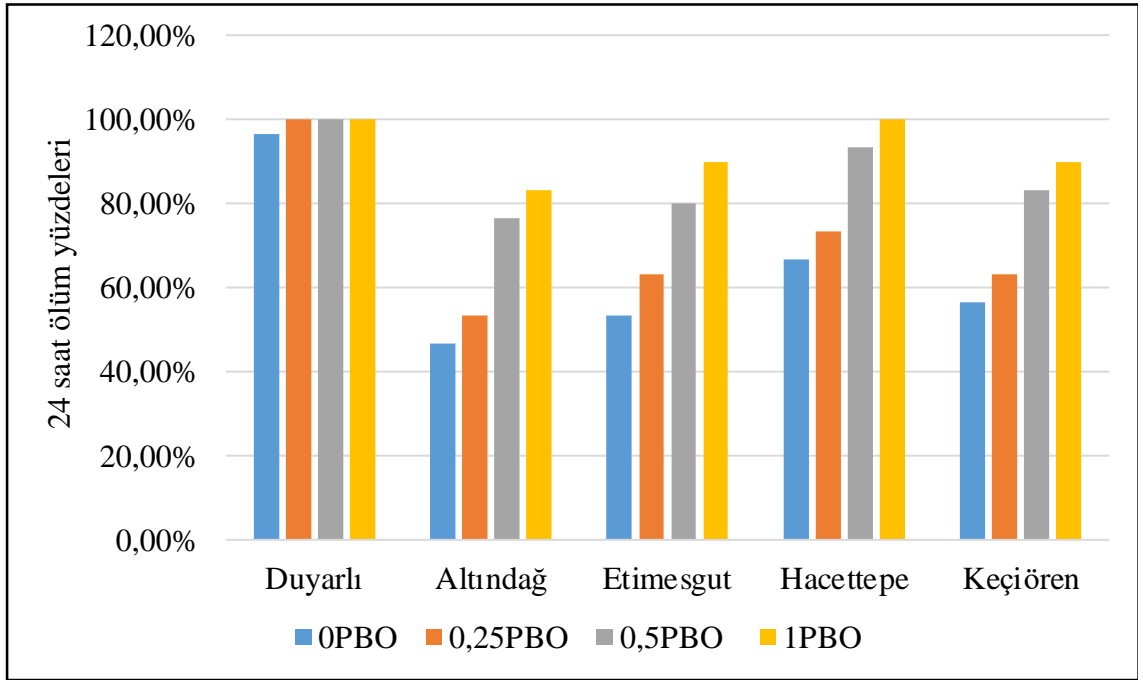
	Duyarlı	Altındağ	Etimesgut	Hacettepe	Keçiören
LD₅₀	0.00170	1.85	1.12	0.38583	0.908
LD₈₀	0.12491	24.16	12.18	4.61	10.74
LD₉₀	1.18212	92.39	42.34	16.87	39.07
LD₉₅	7.56	279.64	118.44	49.24	113.53
LD₉₉	245.88	2231.63	815.61	367.10	839.28
Slope	0.457	0.759	0.821	0.826	0.789
Intercept	6.250	4.799	4.961	5.331	5.040
SD	2.188	1.317	1.217	1.211	1.267
SE	0.715	0.277	0.267	0.295	0.281
R²	0.867	0.821	0.859	0.673	0.822
Chi-test (χ^2) Sig	0.972	0.843	0.911	0.746	0.900
df	1	2	2	1	2

Çizelge 3.14 *Blattella germanica* Duyarlı(D), Altındağ(A), Etimesgut(E), Hacettepe(H), Keçiören (K) popülasyonlarında Permetrin+PBO ile yapılan bioassay çalışmalarından elde edilen direnç katsayıları

Popülasyon	A/D	E/D	H/D	K/D
LD₅₀	1088.23	658.82	226.95	534.11
LD₈₀	187.14	97.51	36,90	85.98
LD₉₀	78.15	35.81	14.27	33.05
LD₉₅	36.98	15.66	6.51	15.01
LD₉₉	9.07	3.31	1.49	3.41

Direnç katsayısı=LD X popülasyonu /LD Duyarlı popülasyon

3.3 Permetrin ve PBO ile Yapılan Biyoassay Çalışmalarının Karşılaştırılması



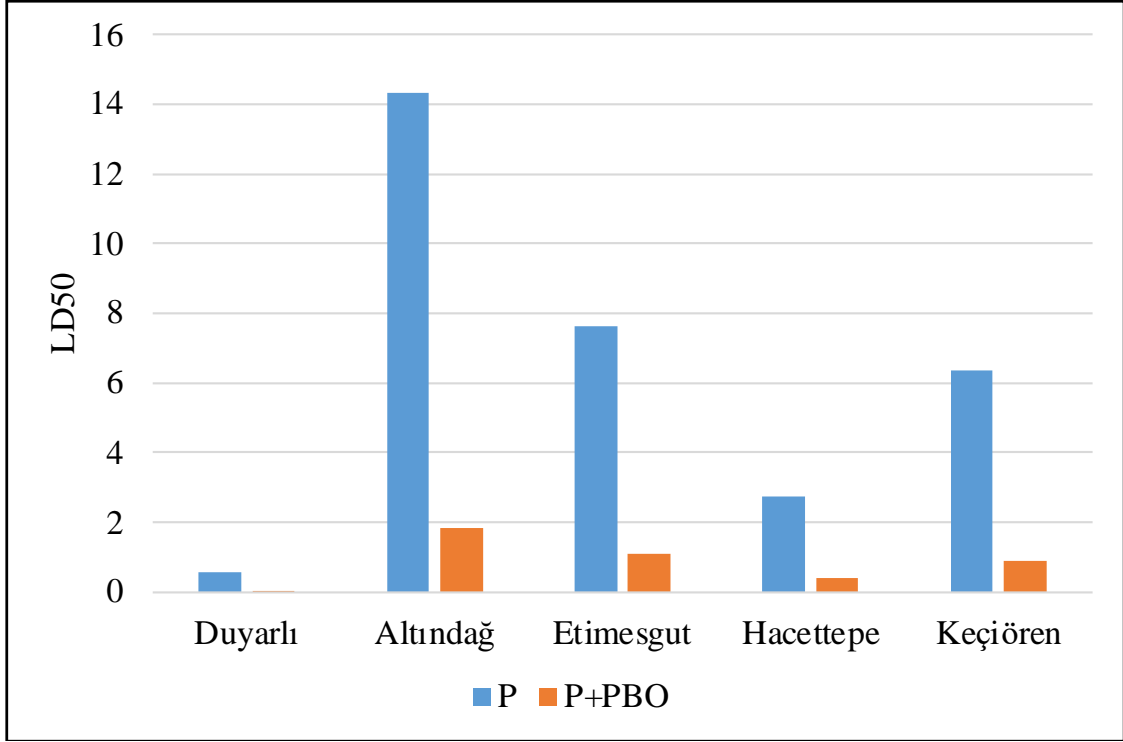
Şekil 3.12 Permetrin ve PBO ile yapılan çalışmalarda ölüm yüzdelerindeki değişim

Piperonil bütositin sinerjistik olarak eklenmesiyle yapılan biyoassay çalışmaları sonucunda yerel popülasyonlarda LD₅₀, LD₈₀, LD₉₀, LD₉₅, LD₉₉ değerleri sadece permetrin ile yapılan uygulama dozuna göre düşüş göstermiştir. LD₅₀, LD₈₀, LD₉₀, LD₉₅, LD₉₉ değerleriyle oluşturulan grafiklerde duyarlı popülasyonda ortaya çıkan LD değerleri düşük olduğundan grafikte iki farklı uygulamada düşük fark görülmektedir. Bu durum duyarlı popülasyonun sadece permetrinin ve PBO eklenen permetrin dozlarının tümüne karşı hassas olmasından kaynaklandığı tespit edilmiştir.

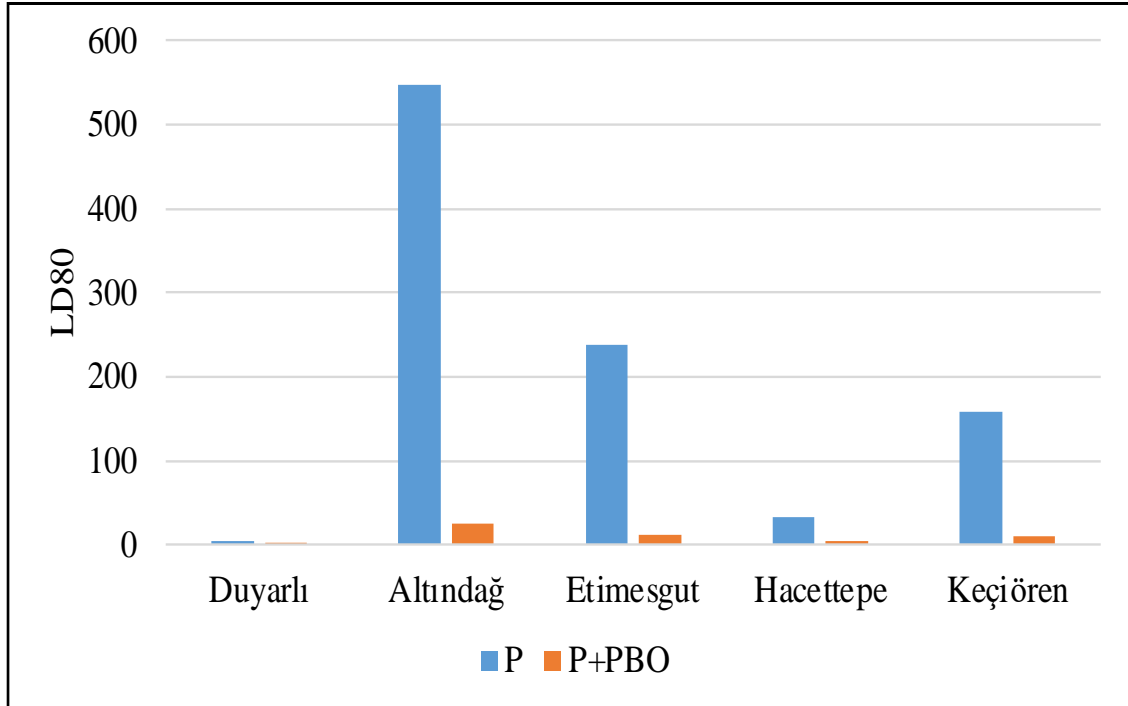
Çizelge 3.15 Permetrin ve Permetrin+PBO ile yapılan biyoassay çalışmalarının LD değerleri ve değişim oranları

Popülasyon		LD ₅₀	LD ₈₀	LD ₉₀	LD ₉₅	LD ₉₉
Duyarlı	P	0.55	4.30	12.56	30.41	159.65
	P+PBO	0.00170	0.12491	1.18212	7.56	67.88
	Değişim Oranı	323.52	34.42	10.62	4.02	2.35
Altındağ	P	14.32	546.79	3669.58	17676.40	334420.83
	P+PBO	1.85	24.16	92.39	279.64	2231.63
	Değişim Oranı	7.74	22.63	39.71	63.21	149.85
Etimesgut	P	7.64	328.19	2342.23	11870.37	249238.80
	P+PBO	1.12	12.18	42.34	118.44	815.61
	Değişim Oranı	6.82	26.94	55.31	100.22	305.58
Hacettepe	P	2.75	32.61	118.75	345.21	2555.12
	P+PBO	0.38583	4.61	16.87	49.24	367.10
	Değişim Oranı	7.12	7.07	7.03	7.01	6.96
Keçiören	P	6.37	157.83	844.95	3377.14	45421.79
	P+PBO	0.908	10.74	49.07	113.53	839.28
	Değişim Oranı	7.01	14.69	17.21	29.74	54.11

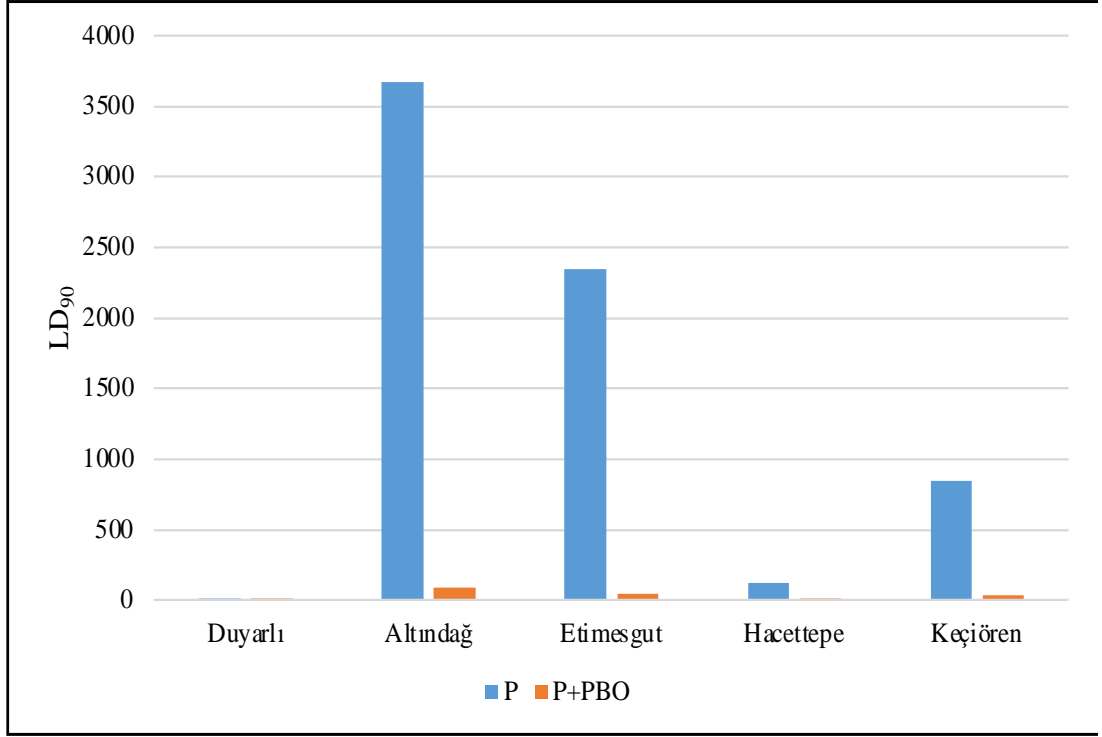
P:Permetrin, P+PBO:Permetrin+PBO karışımı



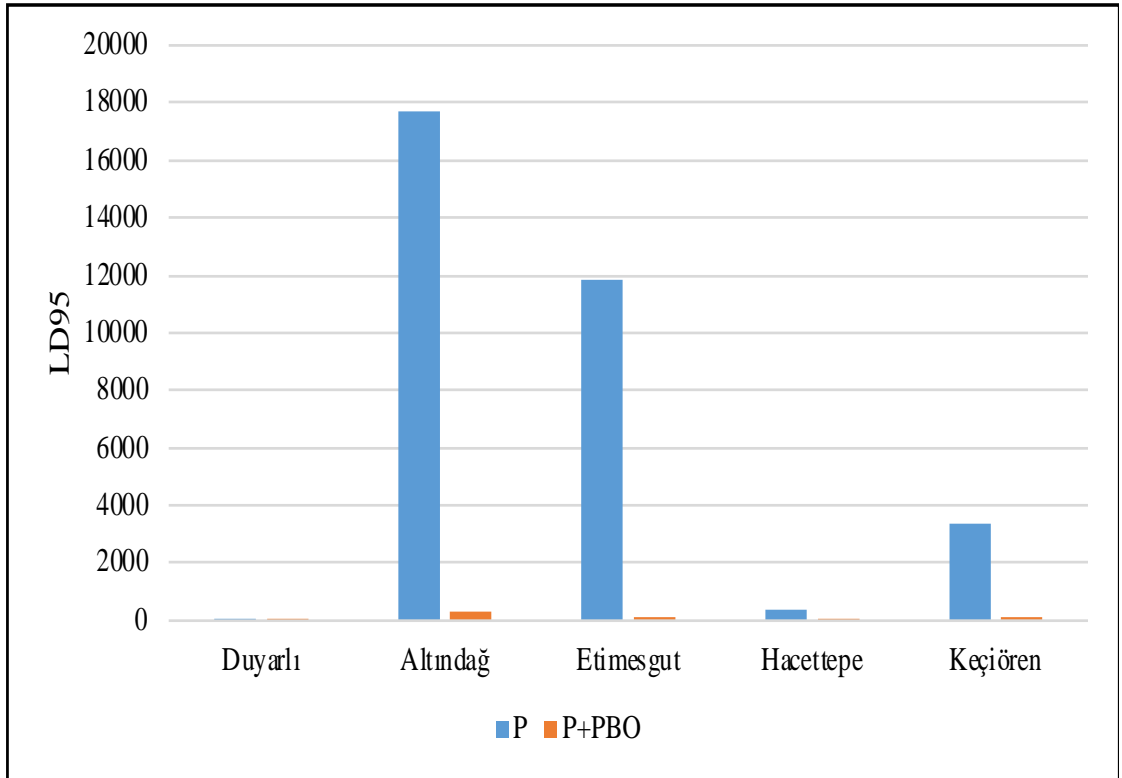
Şekil 3.13 LD₅₀ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının karşılaştırılması



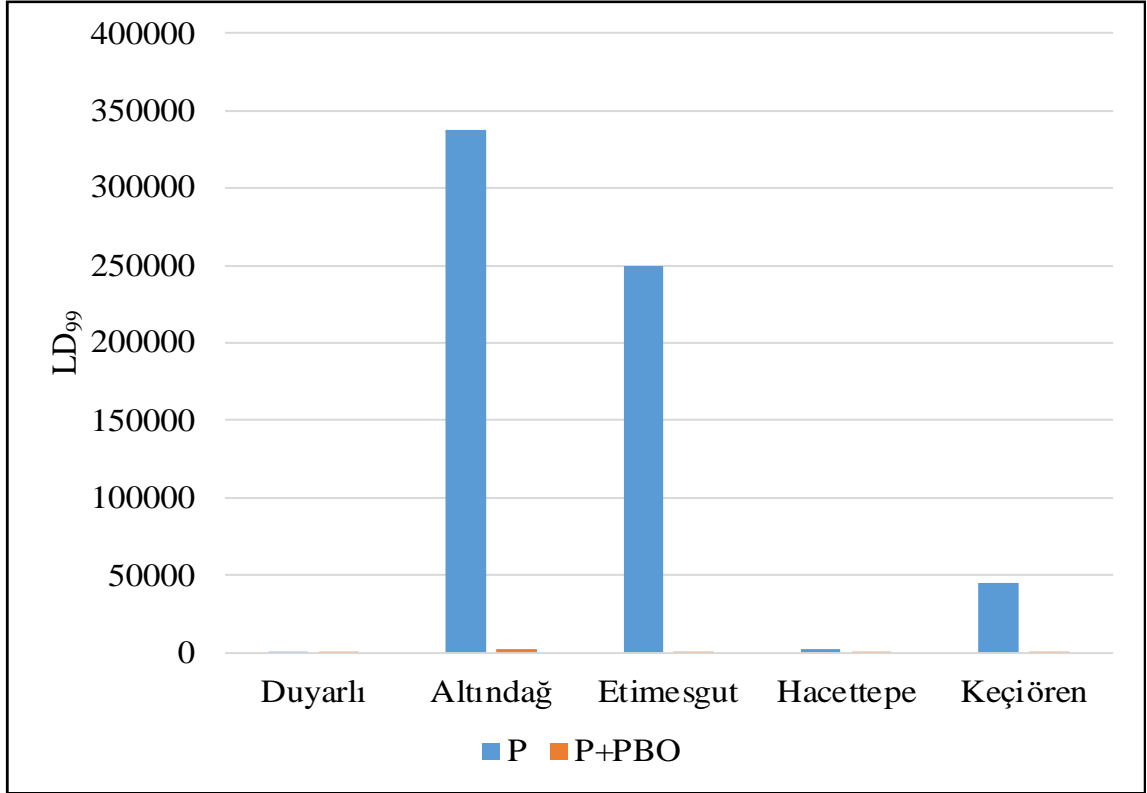
Şekil 3.14 LD₈₀ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının karşılaştırılması



Şekil 3.15 LD₉₀ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının karşılaştırılması

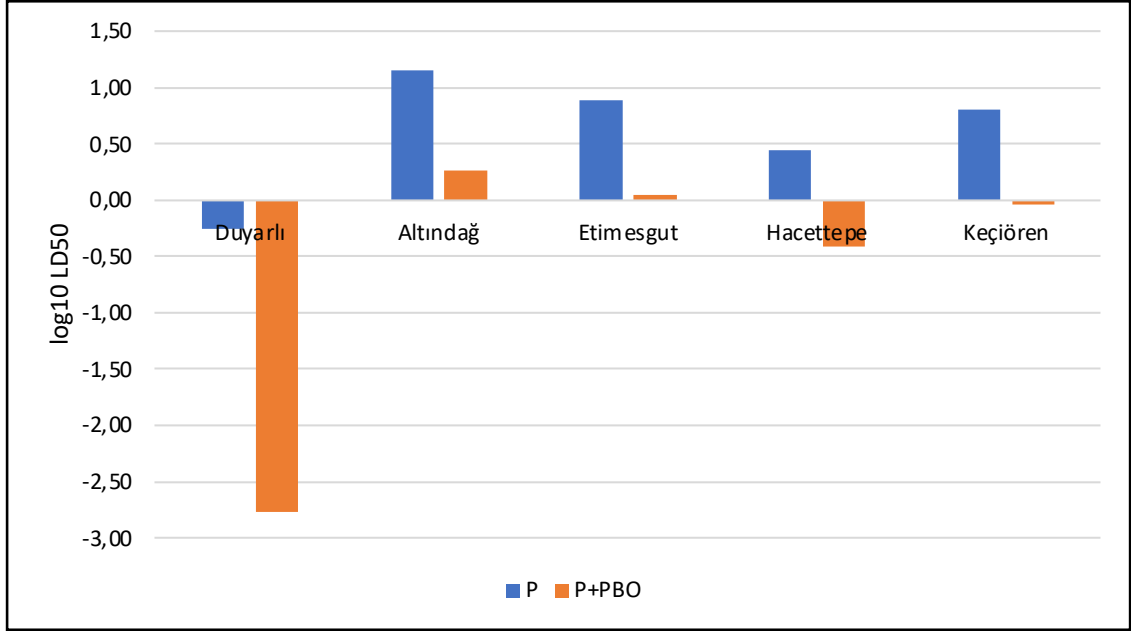


Şekil 3.16 LD₉₅ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının karşılaştırılması

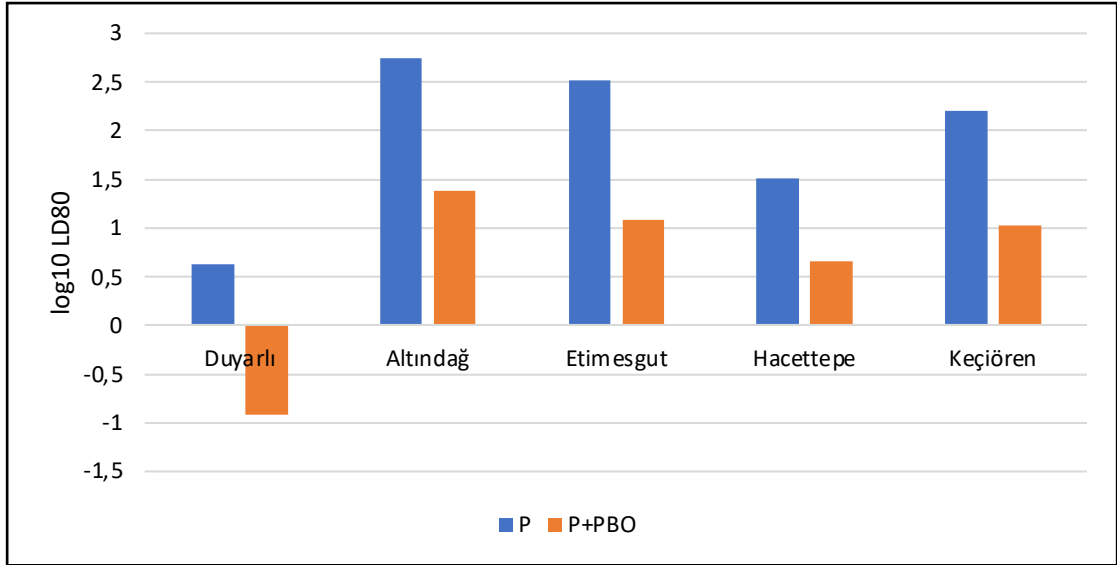


Şekil 3.17 LD₉₉ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının karşılaştırılması.

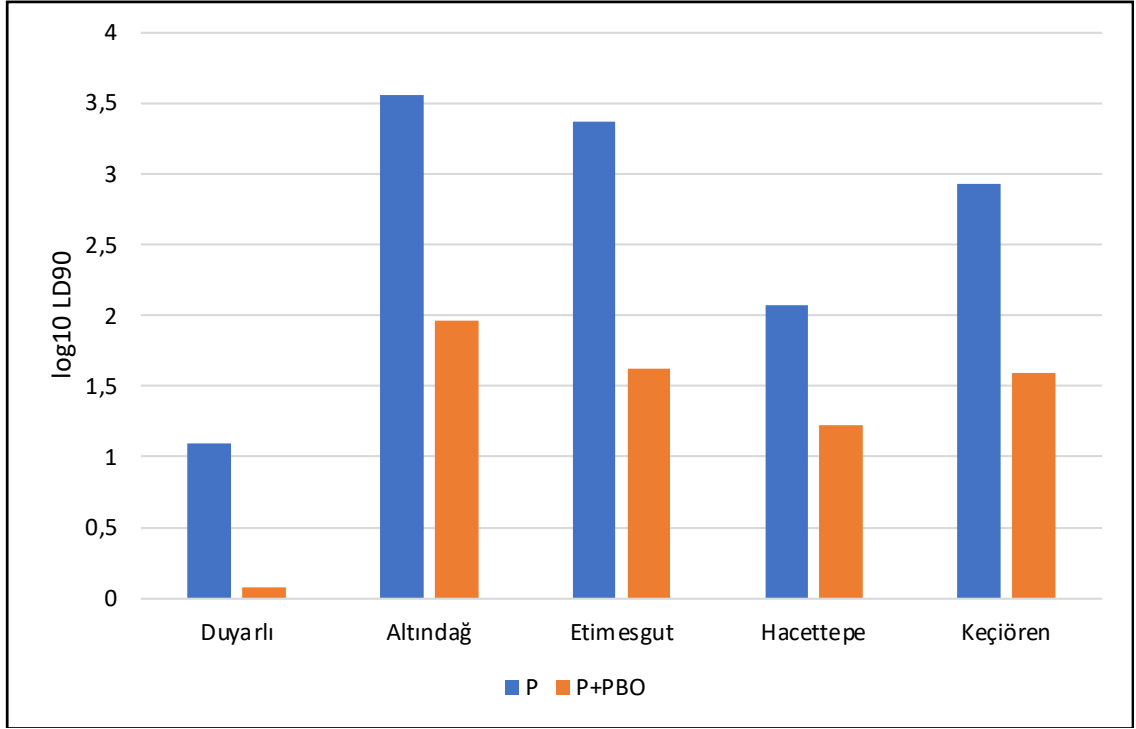
LD₅₀, LD₈₀, LD₉₀, LD₉₅, LD₉₉ verileriyle düzenlenen grafiklerde permetrin ve permetrin+PBO değerleri arasında çok yüksek farklar meydana gelmiştir. Bu grafiklerdeki verileri değerlendirebilmek LD₅₀, LD₈₀, LD₉₀, LD₉₅, LD₉₉ değerleri log₁₀ tabanında düzenlenerek yeniden grafikler oluşturulmuştur. Şekil 3.18’de log₁₀ tabanında LD₅₀ değerinin duyarlı ve Hacettepe popülasyonlarında eksi yönlü olması ve Şekil 3.19’da duyarlı popülasyonda log₁₀ tabanında LD₈₀ değerinin eksi yönlü olması bu popülasyonlardaki knock down birey sayılarının yerel popülasyonlara göre yüksek olmasına bağlı olarak LD değerlerinin düşük çıkmasından kaynakladığı görüldü.



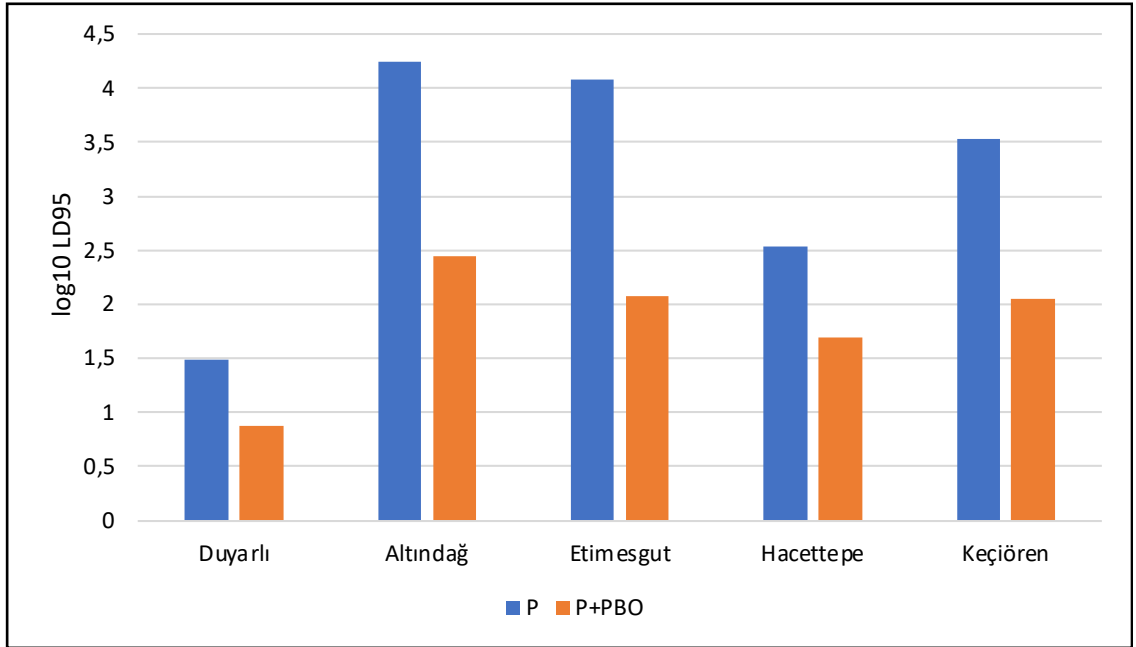
Şekil 3.18 LD₅₀ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının log₁₀ tabanında dönüştürülmüş seviyeleri



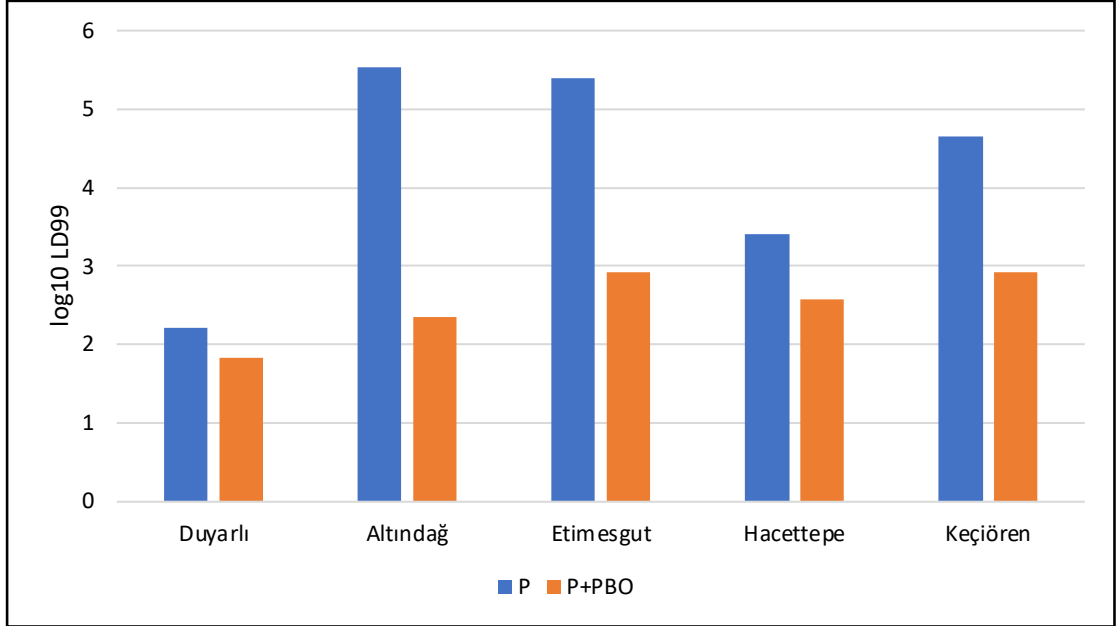
Şekil 3.19 LD₈₀ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının log₁₀ tabanında dönüştürülmüş seviyeleri



Şekil 3.20 LD₉₀ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının log₁₀ tabanında dönüştürülmüş seviyeleri



Şekil 3.21 LD₉₅ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının log₁₀ tabanında dönüştürülmüş seviyeleri



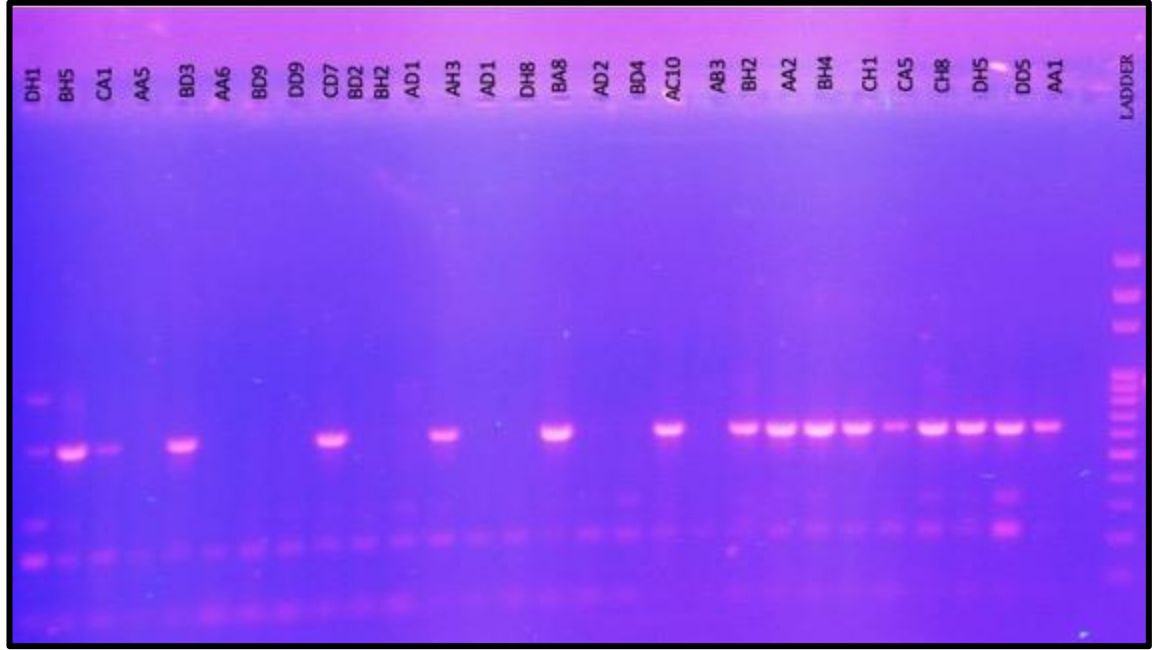
Şekil 3.22 LD₉₅ düzeyinde Permetrin ve Permetrin+PBO çalışmalarının log₁₀ tabanında dönüştürülmüş seviyeleri

Permetrin aktif maddesiyle yapılan biyoassay çalışmalarında direnç katsayıları LD₅₀'den LD₉₉'a doğru artış gösterirken, PBO'nun farklı oranları eklenerek yapılan biyoassay çalışmalarında direnç katsayıları LD₅₀'den LD₉₉'a doğru düşüş göstermektedir. Bu durumun nedeninin PBO kullanımının duyarlı popülasyonda knock down birey sayılarını arttırmamasından kaynaklandığı tespit edilmiştir.

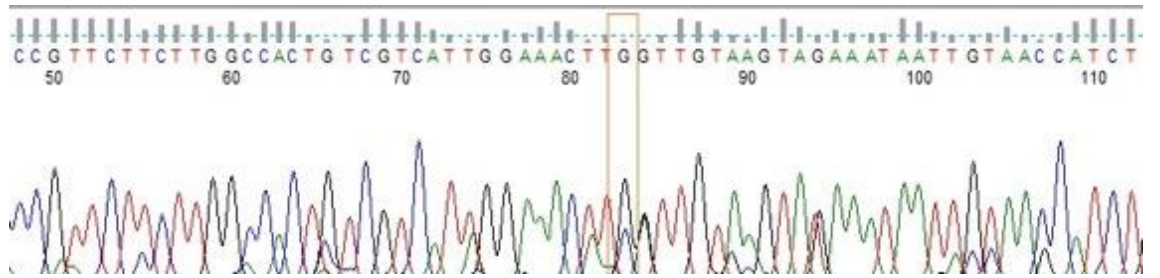
3.4 Moleküler Çalışmalara Ait Bulguları

Knock Down Resistance (kdr) direncin belirlenmesi ve karakterizasyonu direnç yönetimi stratejilerinin geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır (Shah vd. 2002; Wang vd. 2009). Bu tez çalışmasında Alman hamam böceğinin sodyum kanallarındaki mutasyonlar moleküler düzeyde incelenerek, Ankara'dan toplanan Alman hamam böceği popülasyonlarında *kdr* direnci mutasyonu varlığına bakılmıştır. *kdr* mutasyonunun 1014 pozisyonundaki lösin aminoasitinin fenilalanin değişiminin G/G bazlarının yerine G/C değişiminden kaynaklandığı bildirilmiştir (Gholizadeh vd. 2014). Duyarlı, Altındağ ve Hacettepe popülasyonlarından alınan bireylerde *kdr* mutasyonuna bakmak için G/C bazlarının değişimine bakıldı. Yapılan PZR, jel elektroforezi ve sekanslama çalışmaları

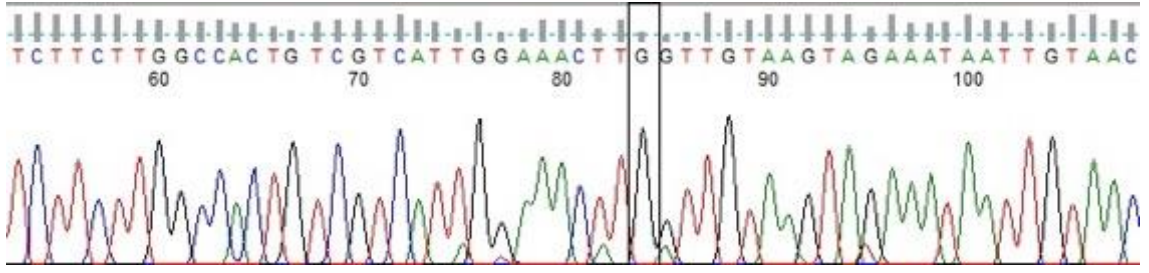
sonucunda duyarlı popülasyonda *kdr* mutasyonuna ya da herhangi bir baz değişimine rastlanmadı. Altındağ popülasyonunda 5 bireyde, Hacettepe popülasyonunda 2 bireyde *kdr* mutasyonu olduğu görüldü.



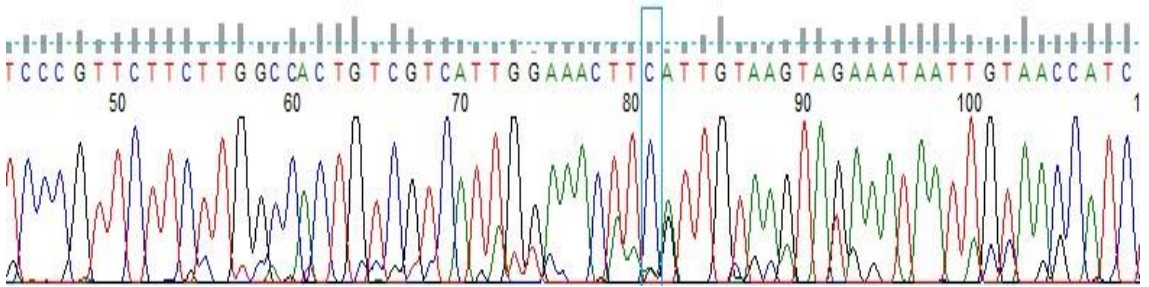
Şekil 3.23 Duyarlı, Altındağ, Hacettepe popülasyonlarına *kdr* geni PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri



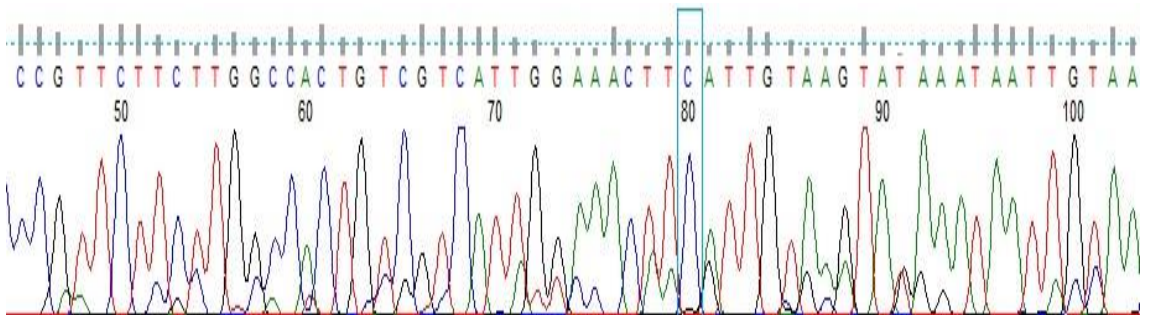
Şekil 3.24 CA3 örneğinde heterozigot değişiklik



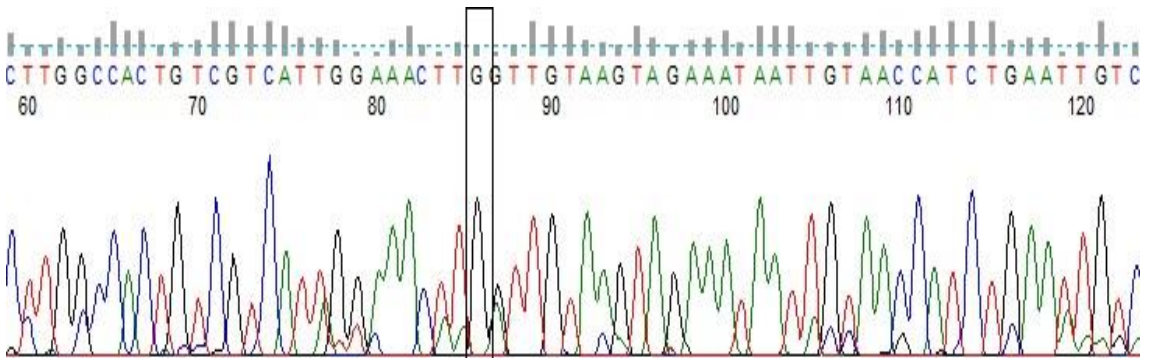
Şekil 3.25 BH1 örneğinde homozigot değişiklik



Şekil 3.26 AA9 örneğinde homozigot değişiklik



Şekil 3.27 AA7 örneğinde homozigot değişiklik



Şekil 3.28 BH4 örneğinde homozigot değişiklik

Çizelge 3.16 Uygulama dozlarına göre Duyarlı (D) popülasyonda *kdr* mutasyonu tespiti

Bireyler	250 mg/m ²	125 mg/m ²	25 mg/m ²	5 mg/m ²
D1	X	G/G	G/G	-
D2	X	-	-	G/G
D3	G/G	-	G/G	-
D4	G/G	X	-	-
D5	-	G/G	-	G/G
D6	-	G/G	X	-
D7	-	-	G/G	-
D8	-	-	X	G/G
D9	-	-	X	-
D10	-	-	X	G/G

Çizelge 3.17 Uygulama dozlarına göre Hacettepe(H) popülasyonu *kdr* mutasyonu tespiti

Bireyler	250 mg/m ²	125 mg/m ²	25 mg/m ²	5 mg/m ²
H1	G/T	G/G	X	
H2	G/G	X	G/G	T/T
H3	X	X	G/C	X
H4	X	G/G	G/G	-
H5	-	G/G	G/G	T/T
H6	-	G/G	G/G	-
H7	-	G/G	X	-
H8	-	X	G/C	-
H9	-	G/G	X	C/C
H10	-	G/G	G/G	-

Çizelge 3.18 Uygulama dozlarına göre Altındağ (A) popülasyonu *kdr* mutasyonu tespiti

Bireyler	250 mg/m ²	125 mg/m ²	25 mg/m ²
A1	G/C	G/G	G/G
A2	G/C	C/C	G/G
A3	G/C	G/G	G/C
A4	-	G/G	G/G
A5	-	X	G/C
A6	-	G/G	G/G
A7	C/C	G/G	C/C
A8	G/G	G/G	X
A9	C/C	X	X
A10	G/G	G/G	G/G

Deneylemler sırasında moleküler çalışmalarda bazı örneklerde PZR ürünleri elde edilemedi, PZR ürünleri nanodrop ile DNA varlığı tespit edilmesine rağmen jel görüntüsü elde edilemedi. Bazı örneklerde PZR ürünleri elde edilmesine rağmen sekanslama çalışmasında pik elde edilemedi. Bu sonuçlarla birlikte yerel popülasyonlarda %10 oranında *kdr* mutasyonu tespit edildi. *kdr* mutasyonu Hacettepe popülasyonunun %5'inde, Altındağ popülasyonunun ise % 16.6'sında tespit edildi (Çizelge 3.19).

Çizelge 3.19 Çalışmadaki PZR ve sekanslama verileri

Popülasyon	<i>kdr</i> mutasyonu bulunan birey sayısı	<i>kdr</i> mutasyonu bulunmayan birey sayısı	Başka bir mutasyon taşıyan birey sayısı	PZR sonucu elde edilememiş birey sayısı	Sekanslama sonucu elde edilememiş birey sayısı	Toplam
Duyarlı	0	12	0	21	7	40
Hacettepe	2	13	4	12	9	40
Altındağ	5	14	4	3	4	30
Toplam	7	39	8	36	20	110

4. TARTIŞMA

Böceklerin doğal seçim yoluyla insektisitlere karşı direnç geliştirebildiği yaygın olarak bilinmektedir. Bazı böcekler, seçim baskısı olarak insektisitlere maruz kaldıklarında kendilerini toksik etkilerden koruyan genetik varyasyonlara sahip olabilirler. Bu böceklerin hayatta kalma ve nesillerini devam ettirme şansı daha yüksektir ve kendilerini bu insektisitlerin öldürme etkisinden koruyan genlerini nesillerine aktarırlar. Bu durumda, popülasyondaki dirençli bireylerin oranı zamanla artar ve bu da tüm popülasyonun insektisitlere karşı dirençli hale gelmesine neden olur. Bu tez çalışmasında Dünya Sağlık Örgütünden (DSÖ) elde edilen duyarlı popülasyon ile Ankara ilinden toplanan 4 farklı Alman hamam böceği popülasyonunun permetrin insektisidine direnci biyoassay çalışmaları ve moleküler çalışmalarla araştırıldı.

Cochran (1995), Alman hamam böceği saha popülasyonlarının piretroidler dahil olmak üzere farklı insektisit sınıflarına karşı direnç gösterdiğini bildirmiştir. Lee vd. (1996), Malezya'daki Alman hamam böceğinin sahadan toplanan popülasyonlarında piretroidlere karşı farklı seviyelerde direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir. Scharf vd. (1997), Indiana'da sahadan toplanan Alman hamam böceği popülasyonlarında LD₅₀ seviyesinde sipermetrine karşı 80 kat direnç geliştirildiği tespit edilmiştir. Wu vd. (1998), Indiana'dan toplanan Alman hamam böceği popülasyonlarında bir sentetik piretroid olan fenvalarte karşı LD₅₀ seviyesinde 825 kat direnç olduğunu bildirmişlerdir. Valles vd. (2000), Florida'dan toplanan Alman hamam böceğinin saha popülasyonlarında LD₅₀ seviyesinde sipermetrine karşı 93 kat direnç olduğunu bildirmiştir. Choo vd. (2000) Singapur'da deltametrin direnci ve Wei vd. (2001) Alabama'da permetrin ve deltametrin direnci gelişmesi nedeniyle Alman hamam böceğinin saha popülasyonlarında mücadelenin başarı oranının düşük olduğunu bildirmişlerdir. Pai vd. (2005), Alman hamam böceğinin Tayvan'daki hastanelerden ve evlerden toplanan popülasyonlarında sipermetrine olan direnç seviyesini; Limoe vd. (2007) İran'da permetrin için direnç seviyesini belirlemişlerdir. Ahmad vd. (2009) Endonezya'dan toplanan popülasyonlarla yaptığı çalışmada permetrin ve sipermetrin direncinin yüksek olduğunu bunun sinerjist kullanımı ile bile kırılmadığını bildirmişlerdir. Chai ve Lee (2010), Singapur'dan toplanan 22 Alman hamam böceği popülasyonunun farklı insektisit sınıflarına karşı

direnç durumunu incelemiştir. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada piretroid grubu insektisitlere karşı 3 ila 468 kat arasında bir direnç aralığı belirlemişlerdir. Alman hamam böceklerinde permetrin kullanarak topikal uygulamayla yapılan direnç çalışmalarında Gondhalekar vd. (2011) direncin 77,22 kat; Limoev vd. (2012) direncinin 3,15 kat fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Öz vd. (2021) Antalya'dan toplanan Alman hamam böceği popülasyonlarının piretroidlere karşı yüksek dirence sahip olduğunu belirtmiştir.

Çalışmamızda permetrin ile yapılan biyoassay denemeleri sonucunda ise sahadan toplanan Alman hamam böceği popülasyonlarının tamamının duyarlı popülasyona göre permetrine karşı dirençli olduğu görüldü. LD₅₀ düzeyinde bu direnç katsayılarının Altındağ popülasyonunda 26.03 kat, Etimesgut popülasyonunda 13.89 kat, Keçiören popülasyonunda 11.58 kat ve Hacettepe popülasyonunda 5 kat olduğu tespit edildi. Bioassay çalışmalarında elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda uygulama dozu azaldıkça direnç katsayısının arttığı görüldü. Bu direnç katsayılarına göre LD değerleri duyarlı popülasyon ile karşılaştırıldığında en yüksek direncin Altındağ popülasyonunda olduğu tespit edildi. Bu durumda sahadan toplanan popülasyonlardaki permetrine karşı mevcut direnç katsayılarının sıralaması Altındağ, Etimesgut, Keçiören, Hacettepe popülasyonları şeklinde idi. Burada elde edilen yüksek orandaki direnç kat sayıları literatürdeki gibi saha popülasyonlarında duyarlı popülasyona göre yüksektir. Daha önce Ankara ilinde Alman hamam böceği ile ilgili yapılmış bir direnç çalışmasına rastlanmadı. Elde edilen sonuçları bu bağlamda karşılaştırma durumu bulunmamaktadır. Fakat Hacettepe popülasyonu 2010 yılında Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nden toplanarak elde edilmiştir. Bu popülasyon 2021 yılında Altındağ-İskitlerden elde edilen popülasyon ile yakın bir konuma sahiptir. Hacettepe popülasyonu ile Altındağ, Etimesgut ve Keçiören popülasyonları kıyaslandığında geçen süreçte uygulamalar sonucunda yerel popülasyonların yüksek direnç kazanmış olduğu görüldü. Alman hamam böceği mücadelesinde uygun doz kriterinin %80 olduğu göz önünde bulundurulursa DSÖ'nün önermiş olduğu en yüksek doz olan 250 mg/m² dozunda ise Duyarlı ve Hacettepe popülasyonları hassas iken Altındağ, Etimesgut ve Keçiören popülasyonları dirençli bulundu. DSÖ'nün önermiş olduğu en düşük dozda ise tüm popülasyonlar dirençli bulundu. Bu sonuçlara bakıldığında DSÖ tarafından permetrin için önerilen en düşük doz toplanan günümüz Ankara popülasyonlarında etkin olmadığı görüldü. Permetrinin DSÖ

tarafından önerilen en yüksek dozu ise Etimesgut ve Keçiören popülasyonlarında etkinliğini neredeyse sınırdaki olduğunu gösterdi. Altındağ popülasyonunda ise bu dozun etkin olmadığı belirlendi. Burada elde edilen veriler permetrin aktif maddesi içindir. Yerel Alman hamam böceği popülasyonlarının mücadelesinde ticari formülasyonlar kullanıldığı düşünüldüğünde formülasyonlarda kullanılan yan maddelerin permetrin etkinliğini arttırmış olma olasılığı olabilir. DSÖ onaylı permetrin içeren ticari ürünler kullanılarak yapılacak gelecekteki çalışmalar bu formülasyonların kullanımıyla ilgili bilgiler verebilir.

Çalışmamızda kullandığımız Altındağ popülasyonu saha popülasyonları arasında permetrine en yüksek direnci gösteren popülasyondur. Bu popülasyona ait örneklerin alındığı ortam değerlendirildiğinde fiziki olarak (çatlak duvarlar, kırık fayanslar, bol girinti çıkıntı, hijyen eksikliği, nem, sıcaklık) Alman hamam böceğinin yaşaması için oldukça uygun bir ortamdı. İşletmenin genelinde bu zararlının rahatlıkla beslenebileceği, barınabileceği ve üreyebileceği mevcuttu. Bununla beraber bu popülasyonunun mücadelesinde işletmenin profesyonel yardım aldığını fakat hızlı sonuç alamadıklarından kendilerinin de hamam böceği için satılan formülasyonlarla ilaçlama yaptıklarını öğrendik. Bu işletmedeki hamam böceği mücadelesinin kısır bir döngüye girdiği ve sonuç alınmadıkça insektisit uygulamalarının kendileri tarafından devam ettiğini belirttiler. Bu durum bize zararlı mücadelesinde güncel bilimsel verilerle yapılan mücadele çalışmalarının önemini göstermektedir. Zararlı mücadelesinde güncel verilerle hareket etmek uygulamayı kolaylaştıracağı gibi zaman ve para kaybını da önleyecektir. Zararlı mücadelesine kimyasal kullanmadan önce kültürel, biyolojik ve fiziksel mücadeleye başvurulmalıdır. Günümüzde bu konuyla ilgili entegre zararlı mücadelesi kavramı gündeme gelmiştir. Entegre zararlı mücadelesi (Integrated Pest Management-IPM) haşerelerin etkisini azaltmayı, insektisit direncinin gelişmesini geciktirmeyi, zararlı mücadelesinden kaynaklanan çevre kirliliğini önlemeyi ve insan sağlığı risklerini en aza indirmeyi amaçlayan kanıtlanmış bir haşere kontrolü yöntemidir (Dingha 2016). Miller ve Meek (2004), Shahraki vd. (2011) ve Wang vd. (2019) yapmış olduğu çalışmalarda entegre zararlı mücadelesinin sadece kimyasal uygulanarak yapılan mücadeleye göre daha etkin olduğunu ve maliyet olarak daha düşük olduğunu göstermişlerdir.

Pestisit formülasyonlarındaki PBO'nun sinerjistik etkisi hamamböceği, karasinek, sivrisinek gibi zararlılarda test edilmiştir. Moretto (1995) yapmış olduğu çalışmada pestisit formülasyonlarına PBO eklenmesinin, hedef organizmada istenen etkiyi oluşturmak için gerekli olan aktif madde miktarını azalttığını bildirmiştir. Valles vd. (2000) Alman hamam böceğinde sipermetrine olan direncin 93 kat fazla olduğunu PBO sinerjistik eklenmesiyle bunun 29 kata kadar düşürüldüğünü belirtmişlerdir. Wei vd. (2001), Alman hamam böceğinde karşı permetrin ve sinerjistik olan PBO'yu kullandığı zaman, direncin PBO sinerjistik kullanılmasıyla 6.6 kat baskılandığını bildirmişlerdir. Chai ve Lee (2010), Singapur'da 22 farklı bölgeden toplanan Alman hamam böceği popülasyonlarının direnç seviyelerini enzimatik düzeyde incelemişler ve PBO kullanımıyla direncin azaldığını belirtmişlerdir. Limoe vd. (2011), PBO'nun, farklı oranlarda kullanılması sonucunda permetrinin toksisitesinin önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Hu vd. (2020), topladıkları 24 popülasyonda yaptıkları çalışmada PBO'nun deltametrin etkinliğini arttırdığını bildirmişlerdir. Öz ve Çetin (2022)'in sahadan toplanan Alman hamam böceği popülasyonlarıyla yapmış olduğu çalışmasında PBO'nun alfa-sipermetrin ve deltametrin üzerinde sinerjistik bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında aynı miktardaki permetrine PBO eklenerek 4 farklı doz uygulaması yapıldı. Uygulama sonucu tüm popülasyonlarda ilk 15 dk knock down etkisinin arttığı görüldü. Toplanan popülasyonlar arasında en yüksek dirence sahip olan Altındağ popülasyonunda sadece 25 mg/m² permetrin içeren dozunda ilk 15 dk knock down sayısı 3 birey iken, 1/4 oranında eklenen PBO ile bu sayı 7 bireye yükseldi. PBO eklenerek hazırlanan dozlar uygulandığında 24 saatte sonunda tüm popülasyonlarda ölüm yüzdelerinin arttığı görüldü.

Çalışmada permetrine PBO eklenerek yapılan uygulamalarda direnç katsayılarının PBO eklenmeden uygulanan doza göre düştüğü görüldü. Sinerjistik dozlarının daha önce öldürücü olmadığı ve/veya minimal mortaliteyi doğrulamak için duyarlı tür üzerinde test edildiği bildirilmiştir (Valles vd. 1997, Chai ve Lee 2010, Hu vd. 2020). Çalışmamızdan elde edilen veriler ve literatür bilgilerinin doğrultusunda sinerjistik olarak kullanılan PBO'nun permetrin etkinliğini arttırdığı tespit edildi. Çalışmamızın bu basamağında aynı miktardaki permetrine eklenen PBO oranı arttıkça ölüm yüzdelerinin de arttığı görüldü. Kullanılan PBO LD₅₀ seviyesinde duyarlı popülasyondaki permetrin aktivitesini 323.52

kat daha hassas duruma getirmiştir. PBO sinerjisti yerel popülasyonlarda da permetrin direncinin kırılmasını sağladı. Buna göre permetrine direnci en yüksek olan Altındağ popülasyonunda direnç 7.74 kat azaldı. Bu durum Etimesgut popülasyonunda 6.82 kat, Hacettepe popülasyonunda 7.12 kat, Keçiören popülasyonunda ise 7.01 kat arttığı tespit edildi. Bu sonuçlar Limoe vd. (2007)'nin farklı miktarlardaki permetrine PBO ekleyerek yaptıkları çalışmasında gösterilen permetrin direncinin PBO ile düştüğü sonucuyla uyumlu bulundu. Çalışmamızda PBO'nun permetrin direncini en çok Altındağ popülasyonunda azalttığı görüldü. PBO'nun Ankara popülasyonlarındaki permetrin direncini kırdığı tespit edildi. Bu duruma bakıldığında Sağlık Bakanlığı'nca onaylanan permetrin içerikli ticari formülasyonlarda PBO eklenmesinin bir gereklilik olduğu görüldü.

Piretroid grubu birincil hedefi, insektisitlerin böcek sinir sisteminin voltaj kapılı sodyum kanallarıdır. Böcek sinir sisteminin hücre zarlarındaki sodyum kanalı proteinlerinde lösin(L)-fenilalanin(F) değişimiyle meydana gelen mutasyonun, piretroid grubu insektisitlere karşı direncin önemli ölçüde önlediği bilinmektedir. Miyazaki vd. (1996) yaptığı PZR çalışmasıyla Alman hamam böceğinde L1014F değişimini tespit etmişlerdir. Dong (1997) yapmış olduğu çalışmada Alman hamamböceğinde *ksr* tip mutasyonun L1014F'den kaynaklandığını bildirmiştir. Liu vd. (2000), piretroid insektisitlere karşı *ksr* tipi direnç gösteren beş Alman hamam böceği popülasyonunda L1014F mutasyonunun yanı sıra 2 yeni mutasyon belirlemişlerdir. Bu mutasyonlar; glutamik asit yerine lizin aminoasidinin gelmesiyle oluşan E434 mutasyonu ve sistein yerine arjinin aminoasidinin gelmesiyle oluşan C764 mutasyonlarıdır. Çalışmamız genomik DNA'nın PZR ile çoğaltılmasıyla gerçekleştirildiğinden Liu vd. (2000)'nin bu mutasyonlarının varlığına bakılmamıştır. İleride yapılacak çalışmalarla bu mutasyonlarında varlığına da bakılabilir.

Liu vd. (2002), *ksr* olarak bilinen piretroid direncinin para sodyum kanal genlerindeki nokta mutasyonlarla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar Alman hamam böceğinin sodyum kanallarında bulunan 2 mutasyonuyla (E434K ve C764R) birlikte sodyum kanal hassasiyetini azaltan L1014F mutasyonun da deltametrine karşı böceğin direncini artırdığını bildirmişlerdir. Tan vd. (2002), Alman hamam böceğinin piretroidlere karşı dirençli popülasyonlarında 3 adet sodyum kanal mutasyonu (E434K, C764R,

L1014F) olduğunu tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, L1014F mutasyonunun deltametrine karşı sodyum kanal hassasiyetini azalttığını gözlemlemişlerdir. Buna rağmen, E434K ve C764R mutasyonları tek başına olduğunda deltametrine kanal hassasiyetini azaltmadığını fakat E434K veya C764R mutasyonu L1014F mutasyonu ile birlikte deltametrin hassasiyetinin 100 kat azaldığını, 3 mutasyon bir arada bulunduğu ise deltametrine hassasiyetin 500 kat azaldığını bildirmişlerdir. Xu vd. (2006)'nın Alman hamam böceği ve karasinek ile yapmış oldukları çalışmada her iki popülasyonda *kdr* mutasyonunun bulunduğunu ve 1014. pozisyonda lösün-fenilalanin değişiminin DNA molekülü üzerindeki TTG'nin TTC bazlarının yer değiştirmesinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Gholizadeh vd. (2014) G'nin C ile yer değiştirmesiyle ortaya çıkan *kdr* mutasyonunu üç farklı noktadan topladıkları 18 bireyin tamamında tespit etmişlerdir.

Genomik DNA ile yapılan çalışmamızda duyarlı popülasyon bireylerinde G'nin C ile yer değiştirmesiyle oluşan *kdr* mutasyonuna rastlanmadı. Biyoassay çalışmalarının sonuçlarına göre yerel popülasyonlar arasında direnç seviyesi en düşük olan Hacettepe popülasyonunda 2 bireyde (%5) bu mutasyon tespit edildi. Biyoassay çalışmalarının sonuçlarına göre yerel popülasyonlar arasında direnç seviyesi en yüksek olan Altındağ popülasyonunda 5 bireyde (%16.6) G-C değişimi belirlendi. Altındağ popülasyonunda sonuç alınamayan bireyler hesaplamadan çıkarıldığında bu oranın %26.3 olduğu görüldü. Verilerimize göre duyarlı popülasyonda hiçbir mutasyona rastlanmadı. Bu sonuçlara bakıldığında duyarlı popülasyonun bir mutasyon bulundurmaması biyoassay çalışmalarının sonuçlarıyla da örtüşmektedir. Çalışmamızda kullanılan örnek sayısına göre *kdr* mutasyonu tespit ettiğimiz birey sayısı düşüktür. Fakat çıkan sonuçlarda duyarlı popülasyonda mutasyona rastlanmaması biyoassay çalışmalarıyla uyumludur. Hacettepe popülasyonu uzun süredir herhangi bir insektisite maruz kalmamış olmasına rağmen bu direnç genini taşıyan bireylere sahiptir. Hacettepe ve Altındağ popülasyonlarında *kdr* mutasyonu bulunduran birey sayıları biyoassay çalışmalarında bu popülasyonlarda tespit edilen direnç katsayılarıyla uyumludur.

Türkiye'de Alman hamam böceği ile ilgili yapılan direnç çalışmaları oldukça sınırlıdır. Garrett vd. (1968)'de İzmir'den toplanan Alman hamam böceği popülasyonunda malation ve dieldrine karşı direncine bakmıştır. Tunaz vd. (2009) çeşitli bitki uçucu

yağlarının Alman hamam böceği erginlerinde fumigant etkisine bakmıştır. Küçüksarı ve Tunaz (2021) yarı sentetik spinetoram insektisinin Alman hamam böceği üzerindeki toksik etkisine bakmıştır. Öz vd. (2021)'in Antalya ilinde piretroidlerle yapmış oldukları biyoassay düzeyinde direnç çalışmalara mevcuttur. Bu çalışmalar dışında ülkemizde son yıllarda Alman hamam böceği ile ilgili yapılan çalışmalar daha çok bu zararlının patojen taşıma durumu ve hastalık yapma etkisiyle ilgilidir (Kutrup 2003, Bekir vd. 2017, Atay vd. 2023). Sonuç olarak, permetrin Alman hamam böceğinde duyarlı popülasyon hariç diğer popülasyonlarda düşük oranlarda etkili oldu. Permetrinin etkisini arttırmak amacıyla sinerjist olarak verilen PBO'nun diğer araştırmacıların sonuçlarında olduğu gibi bizim çalışmamızda da böceklerin direncini azalttığı gözlemlendi. Bunun yanı sıra yapılan moleküler çalışma ile *kdr* mutasyonunun Ankara'nın çeşitli yerlerinden alınan Alman hamam böceklerinde bulunduğu ve permetrine karşı direnç gösterdikleri ortaya konuldu. Çalışmamız ülkemizde ilk defa Alman hamam böceğinde hem biyoassay hem de *kdr* mutasyonu tespiti yapıldığı için önem arz etmektedir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar literatürdeki eksikliği giderecek ve ileride yapılacak çalışmalara uygun bir alt yapı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Ahmad, I., Sriwahjuningsih, Astari, S., Putra, R.E. & Permana, A.D. (2009). Monitoring pyrethroid resistance in field collected *Blattella germanica* Linn. (Dictyoptera: Blattellidae) in Indonesia. *Entomological Research* 39: 114-118.
- Alexander, J. B., Newton, J., & Crowe, G. A. (1991). Distribution of Oriental and German cockroaches, *Blatta orientalis* and *Blattella germanica* (Dictyoptera), in the United Kingdom. *Medical and veterinary entomology*, 5(4), 395-402.
- Arlian, L. G. (2002). Arthropod allergens and human health. Annual review of entomology, 47(1), 395-433.
- Atay, O., Kaya, M. Ş., Ocak, M., & Can, D. (2023). Frequency and clinical features of cockroach sensitivity in atopic children. *Population*, 15(2022).
- Beauty, B. J., & Marquardt, W. C. (1996). II. Fleas and the agents they transmit. *The Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado*, 632.
- Bekir, O., Özdal, N., Orunç, K. Ö. ve Değer, M. S. (2017). First investigation on vectorial potential of *Blattella germanica* in Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 64(2), 141-144.
- Bernard, B C., & Philogène, B. J. (1993). Insecticide synergists: role, importance, and perspectives. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 38(2), 199-223.
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological reviews*, 24, 93-106.
- Braga, I. A., & Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência.
- Brogdon, W. G. (1989). Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. *Parasitology today*, 5(2), 56-60.
- Brogdon, W. G., & McAllister, J. C. (2004). Insecticide resistance and vector control. *Journal of Agromedicine*, 9(2).
- Busvine, J. R. (1951). Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature*, 168, 193-195.
- Casida, J. E., Gammon, D. W., Glickman, A. H., & Lawrence, L. J. (1983). Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 23(1), 413-438.

- Casida, J. E., & Quistad, G. B. (1995). Pyrethrum flowers: production, chemistry, toxicology, and uses. (*No Title*).
- Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26(1), 13-25.
- Chai, R.Y. & Lee, C.Y. (2010). Insecticide resistance profiles and synergism in field populations of the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) from Singapore. *Journal of Economic Entomology* 103: 460-471.
- Chang, K. S., Shin, E. H., Jung, J. S., Park, C., & Ahn, Y. J. (2010). Monitoring for insecticide resistance in field-collected populations of *Blattella germanica* (Blattaria: Blattellidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(4), 309-312.
- Chen, M., Du, Y., Nomura, Y., Zhu, G., Zhorov, B. S., & Dong, K. (2017). Alanine to valine substitutions in the pore helix IIP1 and linker-helix IIL45 confer cockroach sodium channel resistance to DDT and pyrethroids. *Neurotoxicology*, 60, 197-206.
- Choo, L.E.W.C., Tang, C.S., Pang, F.Y. & HO, S.H. (2000). Comparison of two bioassay methods for determining deltamethrin resistance in German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology* 93(3): 905-910.
- Cochran, D.G. (1995). Misuse of the tarsal-contact method for detecting insecticide resistance in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology* 90: 1441-1444.
- Cochran, D. G. (1997). Misuse of the tarsal-contact method for detecting insecticide resistance in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 90(6), 1441-1444.
- Cetin, H., Kocak, O., Oz, E., Koc, S., Polat, Y., & Arıkan, K. (2019). Evaluation of some synthetic pyrethroids and piperonyl butoxide combinations against Turkish house fly (*Musca domestica* L.) populations.
- Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., & Williamson, M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB life*, 59(3), 151-162.
- Dehkordi, A. S., Abadi, Y. S., Nasirian, H., Hazratian, T., Gorouhi, M. A., Yousefi, S., & Paksa, A. (2017). Synergists action of piperonyl butoxide and S, S, S-tributyl phosphorotrithioate on toxicity of carbamate insecticides against *Blattella germanica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(10), 981-986.
- Demiröz, D. A. (2015). Böcekler Neden Direnç Kazanıyor?. *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3(2), 91-98.

- Demisoy, A. (2006). Yaşamın Temel Kuralları, Omurgasızlar/Böcekler, Entomoloji. Meteksan A.Ş, Cilt 2/Kısım 2, Ankara, 941 s.
- Dingha, B. N., O'Neal, J., Appel, A. G., & Jackai, L. E. (2016). Integrated pest management of the German cockroach (Blattodea: Blattellidae) in manufactured homes in rural North Carolina. *Florida Entomologist*, 99(4), 587-592.
- Dong, K. E. (1997). A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect biochemistry and molecular biology*, 27(2), 93-100.
- Dong, K., Valles, S. M., Scharf, M. E., Zeichner, B., & Bennett, G. W. (1998). The knockdown resistance (kdr) mutation in pyrethroid-resistant German cockroaches. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 60(3), 195-204
- Dong, K. (2007). Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neuroscience*, 7, 17-30.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., ... & Zhorov, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect biochemistry and molecular biology*, 50, 1-17.
- Du, Y., Liu, Z., Nomura, Y., Khambay, B., & Dong, K. (2006). An alanine in segment 3 of domain III (IIS3) of the cockroach sodium channel contributes to the low pyrethroid sensitivity of an alternative splice variant. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(2), 161-168.
- Elliott, M. (1977). Synthetic pyrethroids.
- Ensley, S. M. (2018). Pyrethrins and pyrethroids. In *Veterinary toxicology* (pp. 515-520). Academic Press.
- Erdoğan, A., & Koçak, O. (1989). Hamamböceği *Blattella germanica* (L) populasyonlarında nimf süresi ve ergin ömür uzunluğu ile ilgili araştırmalar. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 4(4).
- Farnham, A.W. and Sawicki, R.M. (1976). Development of resistance to pyrethroids in insects resistant to other insecticides. *Pesticide Science* 7:278-82.
- Farnham, A. W., Murray, A. W., Sawicki, R. M., Denholm, I., & White, J. C. (1987). Characterization of the structure-activity relationship of kdr and two variants of super-kdr to pyrethroids in the housefly (*Musca domestica* L.). *Pesticide science*, 19(3), 209-220.
- Finney, D. J. (1971). A statistical treatment of the sigmoid response curve. *Probit analysis*. Cambridge University Press, London, 633.

- Fishel, F. M. (2005). Pesticide toxicity profile: synthetic pyrethroid pesticides. *Agronomy Department Series, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, July Issue, PI-54.*
- Foltz, J. L. (2001). Order blattaria: ENY 3005 families of blattaria.
- Gajendiran, A., & Abraham, J. (2018). An overview of pyrethroid insecticides. *Frontiers in Biology, 13*, 79-90.
- Garrett, D. A., Agee, J. S., Gremminger, E. R., Morgan, W. E., & DEPARTMENT OF THE AIR FORCE APO NEW YORK 09224 TUSLOG DETACHMENT 36 (USAFE). (1968). Resistance levels of İzmir, Turkey bedbugs and cockroaches to insecticides 1966-67. *Ft. Belvoir Defense Technical Information Center, Professional Report*, (68-7).
- Ghazouani, L., Feriani, A., Mufti, A., Tir, M., Baaziz, I., Mansour, H. B., & Mnafigui, K. (2020). Toxic effect of alpha cypermethrin, an environmental pollutant, on myocardial tissue in male wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research, 27*, 5709-5717.
- Gholizadeh, S., Nouroozi, B., & Ladonni, H. (2014). Molecular detection of knockdown resistance (kdr) in *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) from northwestern Iran. *Journal of medical entomology, 51*(5), 976-979.
- Giray, H. (1977). Böceklerin insektisitlere karşı dayanıklılığı. *Türk. Bit. Kor. Derg, 1*(1), 29-38.
- Glomot, R. (1982). Toxicity of deltamethrin to higher vertebrates. *Deltamethrin (Monograph), Roussel-Uclaf Research Centre, France*, 109-136.
- Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., ... & Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron, 28*(2), 365-368.
- Goldin, A. L. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annual review of physiology, 63*(1), 871-894
- Gondhalekar, A. D., Song, C., & Scharf, M. E. (2011). Development of strategies for monitoring indoxacarb and gel bait susceptibility in the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Pest Management Science, 67*(3), 262-270.
- Graczyk, T. K., Knight, R., & Tamang, L. (2005). Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. *Clinical microbiology reviews, 18*(1), 128-132.
- Hemingway, J., & Ranson, H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual review of entomology, 45*(1), 371-391.

- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., & Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(7), 653-665.
- Hodgson, E. (Ed.). (2012). *Pesticide biotransformation and disposition*. Academic Press.
<https://www.hgsc.bcm.edu/arthropods/german-cockroach-genome-project>
- Hu, I. H., Chen, S. M., Lee, C. Y., & Neoh, K. B. (2020). Insecticide resistance, and its effects on bait performance in field-collected German cockroaches (Blattodea: Ectobiidae) from Taiwan. *Journal of Economic Entomology*, 113(3), 1389-1398.
- Kaneko, H. (2010). Pyrethroid chemistry and metabolism. In *Hayes' handbook of pesticide toxicology* (pp. 1635-1663). Academic Press.
- Kaneko, H. (2011). Pyrethroids: mammalian metabolism and toxicity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 2786-2791.
- Karunaratne, S. H. P. P., De Silva, W. A. P. P., Weeraratne, T. C., & Surendran, S. N. (2018). Insecticide resistance in mosquitoes: development, mechanisms and monitoring. *Ceylon J Sci*, 47(4), 299-309.
- Kassiri, H., Zarrin, M., & Veys-Behbahani, R. (2018). Pathogenic fungal species associated with digestive system of *Periplaneta americana* (blattaria: Blattidae) trapped from residential dwellings in Ahvaz city, southwestern Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 12(1), 16.
- Katsuda, Y. (1999). Development of and future prospects for pyrethroid chemistry. *Pesticide science*, 55(8), 775-782.
- Katsuda, Y. (2012). Progress and future of pyrethroids. *Pyrethroids: From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide*, 1-30.
- Kence, A., & Kence, M. (1988). Ecological genetics of malathion resistance in housefly, *Musca domestica* L.
- Koçak, O. (2008). Hamamböcekleri biyolojisi ve kontrol yöntemleri. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Alanında Haşere Mücadelesinde Sorumlu Müdür Eğitimi, Antalya.
- Kutrup, B. (2003). Cockroach infestation in some hospitals in Trabzon, Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 27(1), 73-77.
- Küçüksarı, F., & Tunaz, H. (2021). Yarı Sentetik Spinosin İnsektisidi Spinetoram'ın Alman Hamamböceği (*Blatella Germanica* (L.))'Ergin Dönemine Karşı Rezidual Kontak Toksik Etkisi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24(4), 795-804.

- Ladonni, H. (1997). Susceptibility of different field strains of *Blattella germanica* to four pyrethroids (Orthoptera: Blattellidae). *Iranian Journal of Public Health* 26: 35-40.
- Ladonni, H. & Sadegheyani, S. (1998). Permethrin toxicity and synergistic effect of piperonyl butoxide in the first nymphal stage of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Iranian Journal Public Health* 27: 44-50.
- Ladonni, H. (2001). Evaluation of three methods for detecting permethrin resistance in adult and nymphal *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of economic entomology*, 94(3), 694-697.
- Lee, C.Y., Yap, H.H., Chong, N.L. & Lee, R.S.T. (1996). Insecticide resistance and synergism in field collected German cockroach (Dictyoptera Blattellidae) in Peninsular Malaysia. *Bulletin Entomological Research* 86: 675-682.
- Lee, S. H., Choe, D. H., Scharf, M. E., Rust, M. K., & Lee, C. Y. (2022). Combined metabolic and target-site resistance mechanisms confer fipronil and deltamethrin resistance in field-collected German cockroaches (Blattodea: Ectobiidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 184, 105123.
- Li, X. (2007). Juvenile hormone and methyl farnesoate production in cockroach embryos in relation to dorsal closure and the reproductive modes of different species of cockroaches. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 66(4), 159-168.
- Liang D, Schal C (1993) Calling behavior of the female German cockroach, *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *J Insect Behavior* 6(5):603–614
- Limoe, M., Ladonni, H., Enayati, A.A., Vatandoost, H. & Aboulhasni, M. (2006). Detection of pyrethroid resistance and cross-resistance to DDT in seven field-collected strains of the German cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Biological Sciences* 6(2): 382-387.
- Limoe, M., Enayati, A. A., Khassi, K., Salimi, M., & Ladonni, H. (2011). Insecticide resistance and synergism of three field-collected strains of the German cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae) from hospitals in Kermanshah, Iran. *Trop Biomed*, 28(1), 111-118.
- Limoe, M., Davari, B., & Moosa-Kazemi, S. H. (2012). Toxicity of pyrethroid and organophosphorous insecticides against two field collected strains of the German cockroach *Blattella germanica* (Blattaria: Blattellidae). *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 6(2), 112.
- Liu, K., Ma, S., Zhang, K., Gao, R., Jin, H., Cao, P., ... & Wu, S. (2023). Functional Characterization of Knockdown Resistance Mutation L1014S in the German Cockroach, *Blattella germanica* (Linnaeus). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(6), 2734-2744.

- Liu, L., Cheng, J., Matsadiq, G., Zhou, H., & Li, J. (2010). Application of DLLME to the Determination of Pyrethroids in Aqueous Samples. *Chromatographia*, 72, 1017-1020.
- Liu, Z., Valles, S. M., & Dong, K. (2000). Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Insect biochemistry and molecular biology*, 30(10), 991-997.
- Liu, Z., Tan, J., Valles, S. M., & Dong, K. (2002). Synergistic interaction between two cockroach sodium channel mutations and a tobacco budworm sodium channel mutation in reducing channel sensitivity to a pyrethroid insecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(4), 397-404.
- Loughney, K., Kreber, R., & Ganetzky, B. (1989). Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell*, 58(6), 1143-1154.
- Lu, T., Zhang, Q., Lavoie, M., Zhu, Y., Ye, Y., Yang, J., ... & Zhu, Y. G. (2019). The fungicide azoxystrobin promotes freshwater cyanobacterial dominance through altering competition. *Microbiome*, 7, 1-13.
- Lund, A. E., & Narahashi, T. (1983). Kinetics of sodium channel modification as the basis for the variation in the nerve membrane effects of pyrethroids and DDT analogs. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 20(2), 203-216.
- Mahjoob, M., Nejati, J., & Keyhani, A. (2010). Evaluation of bacterial infection of external surface and digestive system of cockroach species. *Med J Hormozgan Univ*, 14(1), 80-86.
- Martins, A. J., & Valle, D. (2012). The pyrethroid knockdown resistance. *Insecticides-Basic and Other Applications*, 17, 38.
- Matsuo, N. (2019). Discovery and development of pyrethroid insecticides. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 95(7), 378-400.
- Mengoni, S. L., & Alzogaray, R. A. (2018). Deltamethrin-resistant German cockroaches are less sensitive to the insect repellents DEET and IR3535 than non-resistant individuals. *Journal of economic entomology*, 111(2), 836-843.
- Milani, R. (1954). Mendelian Behaviour of Eesistance to the knockdown Action of DDT and Correlation between Knockdown and Mortality in *M. domestica*. *Rivista di Parassitologia*, 15(4).
- Miller, D. M., & Meek, F. (2004). Cost and efficacy comparison of integrated pest management strategies with monthly spray insecticide applications for German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control in public housing. *Journal of Economic Entomology*, 97(2), 559-569.

- Miyazaki, M., Ohyama, K., Dunlap, D. Y., & Matsumura, F. (1996). Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Molecular and General Genetics MGG*, 252, 61-68.
- Moretto A. (1995). Piperonyl butoxide. In: Pesticide residues in food: 1995 evaluation part II toxicological and environmental. Geneva, Switzerland: WHO, p. 277-306.
- Narahashi, T. O. S. H. I. O. (1986). Toxins that modulate the sodium channel gating mechanism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 479, 133-151.
- Narahashi, T. (2002). Nerve membrane ion channels as the target site of insecticides. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2(4), 419-432.
- Nasirian, H. (2017). Infestation of cockroaches (Insecta: Blattaria) in the human dwelling environments: a systematic review and meta-analysis. *Acta Tropica*, 167, 86-98.
- Nauen, R. (2007). Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 63(7), 628-633.
- Naqqash, M.N., Gokce, A., Bakhsh, A. and Salim, M. (2016). Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitological Research* 115:1363-1373.
- Noda, M., Ikeda, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Takahashi, T., Kuno, M., & Numa, S. (1986). Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature*, 322(6082), 826-828.
- Omkar (2018). Pests And Their Management. Springer, Gateway East, 1078 p.
- Owuor, K. O., Machani, M. G., Mukabana, W. R., Munga, S. O., Yan, G., Ochomo, E., & Afrane, Y. A. (2021). Insecticide resistance status of indoor and outdoor resting malaria vectors in a highland and lowland site in Western Kenya. *PLoS One*, 16(3), e0240771.
- Öz E., Çetin, H., & YANIKOĞLU, A. (2021). Investigation of resistance to synthetic pyrethroids in *Blattella germanica* L., 1767 (Blattodea: Ectobiidae) and *Periplaneta americana* L., 1758 (Blattodea: Blattidae) populations in Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 45(3), 361-370.
- Öz, E., & Çetin, H. (2022). Synergistic effect of piperonyl butoxide on the toxicity of alpha-cypermethrin and deltamethrin against pyrethroid-resistant german cockroach *Blattella germanica* (Blattodea: Ectobiidae) strains in Turkey. *International Journal of Tropical Insect Science*, 42(4), 3017-3022.

- Pai, H.H., Wu, S.C. & Hsu, E.L. (2005). Insecticide resistance in German cockroach (*Blattella germanica*) from hospitals and households in Taiwan. *International Journal of Environmental Health Research* **15**(1): 33-40.
- Perry, A. S., Yamamoto, I., Ishaaya, I., & Perry, R. Y. (2013). *Insecticides in agriculture and environment: retrospects and prospects*. Springer Science & Business Media.
- Polat, B., & Çetin, H. (2020). Toxicity of thiamethoxam and piperonyl butoxide combination against some strains of house fly *Musca domestica* L.(Diptera) in Turkey. *Acta Zoologica Bulgarica*, **72**(2), 321-324.
- Polson, N. G., & Scott, S. L. (2011). Data augmentation for support vector machines.
- Pridgeon, J. W., Appel, A. G., Moar, W. J., & Liu, N. (2002). Variability of resistance mechanisms in pyrethroid resistant German cockroaches (Diptoptera: Blattellidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **73**(3), 149-156.
- Proudfoot, A. T. (2005). Poisoning due to pyrethrins. *Toxicological reviews*, **24**(2), 107-113.
- Ranson, H., N'guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., & Corbel, V. (2011). Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control?. *Trends in parasitology*, **27**(2), 91-98.
- Rinkevich, F. D., Du, Y., & Dong, K. (2013). Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pesticide biochemistry and physiology*, **106**(3), 93-100.
- Roy, N. K. (2002). *Chemistry of pesticides*. CBS Publishers & Distributors.
- Rust, M. K., Owens, J. M., & Reiersen, D. A. (Eds.). (1995). *Understanding and controlling the German cockroach*. Oxford University Press on Demand.
- Salehi, A., Vatandoost, H., Hazratian, T., Sanei-Dehkordi, A., Hooshyar, H., Arbabi, M., & Paksa, A. (2016). Detection of bendiocarb and carbaryl resistance mechanisms among German cockroach *Blattella germanica* (Blattaria: Blattellidae) collected from Tabriz Hospitals, East Azerbaijan Province, Iran in 2013. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, **10**(3), 403.
- Schal, C., & Hamilton, R. L. (1990). Integrated suppression of synanthropic cockroaches. *Annual Review of Entomology*, **35**(1), 521-551.
- Scharf, M.E., Kaakeh, W. & Bennett, G.W. (1997). Changes in an insecticide resistant field-population of German cockroach following exposure to an insecticide mixture. *Journal of Economic Entomology* **90**: 38-48.

- Scott, J. G., Liu, N., & Wen, Z. (1998). Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 121(1-3), 147-155.
- Shahraki, G. H., Hafidzi, M. N., Khadri, M. S., Rafinejad, J., & Ibrahim, Y. B. (2011). Cost-effectiveness of integrated pest management compared with insecticidal spraying against the German cockroach in apartment buildings. *Neotropical entomology*, 40, 607-612.
- Silver, K. S., Du, Y., Nomura, Y., Oliveira, E. E., Salgado, V. L., Zhorov, B. S., & Dong, K. (2014). Voltage-gated sodium channels as insecticide targets. *Advances in insect physiology*, 46, 389-433.
- Smith, T. J., Lee, S. H., Ingles, P. J., Knipple, D. C., & Soderlund, D. M. (1997). The L1014F point mutation in the house fly *Vssc1* sodium channel confers knockdown resistance to pyrethroids. *Insect biochemistry and molecular biology*, 27(10), 807-812.
- Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1989). Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual review of entomology*, 34(1), 77-96.
- Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1990). Molecular mechanisms of insecticide resistance. In *Pesticide resistance in arthropods* (pp. 58-96). Boston, MA: Springer US.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., and Weiner, M. L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171(1), 3-59.
- Soderlund, D. M., & Knipple, D. C. (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect biochemistry and molecular biology*, 33(6), 563-577.
- Soderlund, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of toxicology*, 86, 165-181.
- Stenersen, J., 2004. Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology. CRC Press, Boca Raton, 276 p
- Stumpf, N., & Nauen, R. (2001). Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 94(6), 1577-1583.
- Tabashnik, B. E., Mota-Sanchez, D., Whalon, M. E., Hollingworth, R. M., & Carrière, Y. (2014). Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. *Journal of economic entomology*, 107(2), 496-507.

- Tang, Q., Bourguignon, T., Willenmse, L., De Coninck, E., & Evans, T. (2019). Global spread of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Biological Invasions*, 21, 693-707.
- Toynnton, K., Luukinen, B., Buhl, K., Stone, D., 2009. National Pesticide Information Center. Oregon State University Extension Services, Baker City, OR, USA Permethrin Technical Fact Sheet.
- Tunaz, H., Er, M. K., & Işıkber, A. A. (2009). Fumigant toxicity of plant essential oils and selected monoterpene components against the adult German cockroach, *Blattella germanica* (L.)(Dictyoptera: Blattellidae). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33(2), 211-217.
- Ujihara, K. (2019). The history of extensive structural modifications of pyrethroids. *Journal of pesticide science*, 44(4), 215-224.
- Xu, Q., Wang, H., Zhang, L., & Liu, N. (2006). Sodium channel gene expression associated with pyrethroid resistant house flies and German cockroaches. *Gene*, 379, 62-67.
- Vais, H., Williamson, M. S., Devonshire, A. L., & Usherwood, P. N. R. (2001). The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pest management science*, 57(10), 877-888.
- Valles, S. M., and Yu, S. J. (1996). Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 89(1), 21-26.
- Valles, S.M., Dong, K. & Brenner, R.J. (2000). Mechanisms responsible for cypermethrin resistance in a strain of German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 66: 195-205.
- Wang, X., Martínez, M. A., Dai, M., Chen, D., Ares, I., Romero, A., ... & Yuan, Z. (2016). Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environmental Research*, 149, 86-104
- Wang, C., Eiden, A., Cooper, R., Zha, C., Wang, D., & Reilly, E. (2019). Changes in indoor insecticide residue levels after adopting an integrated pest management program to control German cockroach infestations in an apartment building. *Insects*, 10(9), 304.
- Wang, C., Lee, C. Y., & Rust, M. K. (Eds.). (2021). *Biology and management of the German cockroach*. CSIRO PUBLISHING.
- Ware, G. W., and D. M. Whitacre. 2004. The pesticide book, 6th ed. Meister Media Worldwide, Willoughby, OH.

- Weber, W. J. (1984). Fleas, ticks and cockroaches disease transmitters. Thomson Publications.
- Wei, Y., Appel, A. G., Moar, W. J., & Liu, N. (2001). Pyrethroid resistance and cross-resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 57(11), 1055-1059.
- Whalon, M. E., Mota-Sanchez, D., & Hollingworth, R. M. (2008). Analysis of global pesticide resistance in arthropods. In *Global pesticide resistance in arthropods* (pp. 5-31). Wallingford UK: CABI.
- Wylie, B. J., Hauptman, M., Woolf, A. D., & Goldman, R. H. (2016). Insect repellants during pregnancy in the era of the Zika virus. *Obstetrics and gynecology*, 128(5), 1111.
- WHO Expert Committee on Insecticides, 1957. 7th Report. In: WHO Tech. Rept. Ser. World Health Organization.^[1]
- WHO, (1998). Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio – Efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surfaces. Report of the WHO Informal Consultation. WHO, Geneva, Switzerland, 28 – 30 September 1998.
- WHO, (2009) Recommended Long-Lasting Insecticidal Mosquito Nets [Online]. World Health Organization; Geneva.
- Wu, D., Scharf, M.E., Neal, J.J., Suiter, D.R. & Bennett, G.W. (1998). Mechanism of fenvalerate resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 61: 53-62.
- Wylie, B.J., Hauptman, M., Woolf, A.D., Goldman, R.H., 2016. Insect repellants during pregnancy in the era of the zika virus. *Obstet. Gynecol.* 128, 1111.
- Yang, C. L., Zhu, H. Y., & Zhang, F. (2019). Comparative proteomics analysis between the short-term stress and long-term adaptation of the *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) in response to beta-cypermethrin. *Journal of economic entomology*, 112(3), 1396-1402.
- Zhang, X. C., & Zhang, F. (2018). The potential control strategies based on the interaction between indoor cockroaches and their symbionts in China. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 55, pp. 55-122). Academic Press.
- Zhao, Y., Park, Y., & Adams, M. E. (2000). Functional and evolutionary consequences of pyrethroid resistance mutations in S6 transmembrane segments of a voltage-gated sodium channel. *Biochemical and biophysical research communications*, 278(3), 516-521.

- Zimmer, C. T., Panini, M., Singh, K. S., Randall, E. L., Field, L. M., Roidakis, E., ... & Bass, C. (2017). Use of the synergist piperonyl butoxide can slow the development of alpha-cypermethrin resistance in the whitefly *Bemisia tabaci*. *Insect molecular biology*, *26*(2), 152-163.
- Zhu, F., Lavine, L., O'Neal, S., Lavine, M., Foss, C. and Walsh, D. (2016). Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems. *Insects* **7**(1):2-28.
- Zlotkin, E. (1999). The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annual review of entomology*, *44*(1), 429-455.