ANKARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DEPO ZARARLISI *Sitophilus granarius* L. (BUĞDAY BİTİ) ÜZERİNDE, AROMATİK BİTKİLERİN BİYOİNSEKTİSİT ETKİLERİNİN TESPİTİ ve SONUÇLARIN MOLEKÜLER OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Rüstem DUYAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2019

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Rüstem DUYAR tarafından hazırlanan **"Depo Zararlısı *Sitophilus granarius* L. (Buğday Biti) Üzerinde, Aromatik Bitkilerin Biyoinsektisit Etkilerinin Tespiti ve Sonuçların Moleküler Olarak Değerlendirilmesi"** adlı tez çalışması 25/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mehmet KARAKAŞ
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Ayla TÜZÜN
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Tamer KEÇELİ
Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Üye : Doç. Dr. Mehmet KARAKAŞ
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Enstitü Müdürü Vekili

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

25/06/2019



Rüstem DUYAR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DEPO ZARARLISI *Sitophilus granarius* L. (BUĞDAY BİTİ) ÜZERİNDE, AROMATİK BİTKİLERİN BİYOİNSEKTİSİT ETKİLERİNİN TESPİTİ ve SONUÇLARIN MOLEKÜLER OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Rüstem DUYAR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet KARAKAŞ

Bu çalışmada, *Thymus sp.* (Kekik), *Petroselinum sp.* (Maydanoz) ve *Mentha sp.* (Nane) ekstraktlarının *Sitophilus granarius* L. üzerindeki biyoinsektisit etkileri araştırılarak sonuçları moleküler açıdan Real-Time-PCR yöntemiyle değerlendirilmiştir. Ekstrakt çözeltisi olarak kullanılan saf metanol ve distile su ile hazırlanan örnekler kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Böcekler 21-23 °C ve %71-73 bağıl nem aralığında yetiştirilmiştir. Metanol ile hazırlanan farklı örneklerde yaklaşık aynı tarih aralığında (6.-10. gün) güçlü biyoinsektisit etki görülmüştür. Ayrıca kimyasal insektisitlerle yapılan çalışmalarda dahi ancak 7-14 gün arası %100 etkin gözlemlenmektedir. Bu iki nedenden dolayı gözlem süresi 10 günün üzerine çıkartılmıştır. Bunu takiben, değişen diğer parametreler nedeniyle farklı gruplarda 16 ile 72 gün arası çeşitli periyotlarda toplamda 75 gün gözlemler devam ettirilmiştir. En güçlü etkinin *Thymus sp*'de, en zayıf etkinin (etkisi nedeniyle moleküler çalışmadan çıkarılan) *Petroselinium sp.*'de olduğu görülmüştür. Ancak değişik nedenlerden kaynaklanan kısmi farklara rağmen sonuçlar birbiriyle paralel ve tutarlıdır. Çalışmamızın moleküler aşamasında Real-Time PCR yöntemiyle nane ve kekiğin %10, %20, %50, %75, %100 oranları olmak üzere 2x5=10 ve ek olarak çalışılan metanolle birlikte 11 Target gen; distile su uygulanmış örneklerden çalışılan 1 Housekeeping (Kontrol grubu) toplam 12 gen üçer teknik tekrara tabi tutulduğu için 12x3=36 reaksiyon çalışılmıştır. Sadece ilk hafta etkisi görülen metanolde 1. hafta; ekstratlardan ise 3-4. hafta içerisinde ölen böcekler üzerinde çalışılmıştır. Kontrol grubu gliseraldehit 3 fosfat geni 1 kabul edildiğinde sitokrom oksidaz 1 geninin ifadesini tutarlı şekilde düşüş gösterdiği görülmüştür. Sonuçlardan nanede %10 kekikte % 50'lik konsantrasyonda strese cevap mekanizmalarının kısmen devreye girdiği görülmüştür. Ekstrakt dozu arttırıldıkça sitokrom oksidaz 1 gen ifadesinin azalması toksik etkinin solunum fonksiyonu üzerinde olduğunu göstermektedir.

Haziran 2019, 59 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Sitophilus granarius* (Buğday Biti), Aromatik Bitki, Biyoinsektisit, Real-Time PCR

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF THE BIOINSECTICIDE EFFECTS OF AROMATIC PLANTS ON STORAGE PEST *Sitophilus granarius L.* (GRANARY WEEVIL) AND MOLECULAR EVALUATION OF RESULTS.

Rüstem DUYAR

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biyology

Supervisor: Doç.Dr. Mehmet KARAKAŞ

In this study, *Thymus sp.* (Thyme), *Petroselinum sp.* (Parsley) and *Mentha sp.* The bioinsectic effects of the (Mint) extracts on *Sitophilus granarius* L. were investigated and their results were evaluated molecularly by Real-Time-PCR method. Pure methanol and distilled water were used as extract solutions. Insects were grown at 21-23 ° C, in the relative humidity range of 71-73%. In different samples prepared with methanol, strong bioinsecticide effect was observed in the same date range (day 6-10). In addition, even in studies with chemical insecticides, it is observed that it is only 100% effective between 7-14 days. For these two reasons, the observation period was increased to over 10 days. Following this, due to the other parameters, a total of 75 days observations were continued in different groups for periods ranging from 16 to 75 days. The most potent effect was seen in *Thymus sp*. and the weakest effect (excluded from molecular study due to its effect) was found in *Petroselinium sp.* However, despite partial differences due to various reasons, the results are parallel and consistent with each other. Molecular stage of our study was carried out with Real-Time PCR method of mint and thyme with 10%, 20%, 50%, 75%, 100%, 2x5 = 10 and 11 Target genes with methanol. 12 housings (1) were studied from distilled water applied first, 12 genes were subjected to three technical repetitions and 12x3 = 36 reactions were studied. First week in methanol only seen in the first week effect; from extracts 3-4. insects that died during the week were studied. Control group When glyceraldehyde 3 phosphate gene 1 was accepted, it was observed that the expression of cytochrome oxidase 1 gene decreased consistently. From the results, it was observed that the mechanisms of response to stress at the concentration of 50% in the 10% oregano were partially activated. Decreased expression of cytochrome oxidase 1 gene expression as the extract dose is increased indicates that the toxic effect is on respiratory function.

June 2019, **59 pages**

Key Words : *Sitophilus granarius* (Granary Weevil), Aromatic Plant, Bioinsecticide, Real-Time PCR.

TEŞEKKÜR

Başta, çalışma konusunun belirlenmesinden son aşamaya kadar yakın ilgi ve alakasını hiç esirgemeyen değerli danışman Hocam Mehmet KARAKAŞ'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı);

Bütün çalışmamıza katkısının yanı sıra özellikle en baştan itibaren Real-Time PCR aşamasını desteği ve gözetimi altında yapmış olduğumuz Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI'na (Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi);

Laboratuvar aşamasında aynı kattaki laboratuvarda sık sık rahatsız ettiğimde ilgisini esirgemeyen Araştırma Görevlisi Ekin DEMİRAY'a;

Yaptığım tüm işlerde olduğu gibi bu çalışmamda da maddi ve manevi destekleri ve katkıları geçen Sevgili Eşim Kader Güney DUYAR, Kızlarım Zeynep Sena DUYAR ve Saliha Nisa DUYAR'a teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışmasının konusu "Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP)" 18L0430013 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

Rüstem DUYAR

ANKARA, Haziran 2019

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Triticum vulgare (Buğday) **1**
1.2 Gıdalarda Depolama Parametresinin Önemi **1**
1.3 Depolanmış Ürünlerde Böcek Tahribatının Boyutları **2**
1.4 Böcek Tahribatının Maliyeti Hakkındaki Tahmin **3**
1.5 Sitophilus granarius **4**
1.6 Depo Zararlıları İçerisinde S. granariusun Yeri **5**
1.7 Depo Zararlılarıyla Mücadele Yöntemleri **6**
1.7.1 Kimyasal mücadele yöntemi **7**
1.7.2 Kimyasal olmayan diğer mücadele yöntemleri **8**
1.7.3 Biyolojik mücadele yöntemleri **9**
1.7.4 Biyolojik yöntemin ülkemizdeki avantajları **10**
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ **12**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **16**
3.1 Çalışmanın Biyoinsektisit Aşamasının Materyal ve Yöntemi **16**
3.1.1 Materyal. **16**
3.1.1.1 Sitophilus granarius kültürü **16**
3.1.1.2 Bitki materyalleri **17**
3.1.1.3 Buğday **17**
3.1.2 Yöntem **18**
3.1.2.1 Bitki ekstraktının hazırlanması **18**
3.1.2.2 Böcek kültürünün belirlenmesi ve hazırlanması **19**
3.1.2.3 Uygulama **20**

3.1.3 Bulgular ve tartışma (Biyoinsektisit aşama).....21
3.2 Çalışmanın Real-Time-PCR Aşamasının Materyal ve Yöntemi 38
3.2.1 Materyal.....38
3.2.1.1 Primer dizaynı.....39
3.2.1.2 Faz ve reaksiyon sayısı planlaması 41
3.2.2 Yöntem.....41
3.2.2.1 Total RNA ekstraksiyon.....41
3.2.2.2 Elde edilen cDNA'nın saflık değerleri.....44
3.2.2.3 (RT PCR Aşaması) sonuçların normalizasyonu..... 44
3.2.3 Bulgular ve tartışma (RT PCR Aşaması) 46
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....48
KAYNAKLAR 55
ÖZGEÇMİŞ.....59

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

^0C Santigrat Derece

Kısaltmalar

aK	Kekik ekstraktı uygulanmış birinci (1.) deney grubu.
aM	Maydanoz ekstraktı uygulanmış birinci (1.) deney grubu.
aN	Nane ekstraktı uygulanmış birinci deney (1.) grubu.
bK	Kekik ekstraktı uygulanmış ikinci (2.) deney grubu.
bM	Maydanoz ekstraktı uygulanmış ikinci (2.) deney grubu.
bN	Nane ekstraktı uygulanmış ikinci (2.) deney grubu.
cK	Kekik ekstraktı uygulanmış üçüncü (3.) deney grubu.
cM	Maydanoz ekstraktı uygulanmış (3.) deney grubu.
cN	Nane ekstraktı uygulanmış (3.) deney grubu.
K	Kekik ekstraktı uygulanmış deney grubunun kısaltması.
KKont1	Kekik ekstraktı uygulanmış birinci (1.) kontrol grubu.
KKont2	Kekik ekstraktı uygulanmış ikinci (2.) kontrol grubu.
M	Maydanoz ekstraktı uygulanmış deney grubunun kısaltması.
MKont1	Maydanoz ekstraktı uygulanmış birinci (1.) kontrol grubu.
MKont2	Maydanoz ekstraktı uygulanmış ikinci (2.) kontrol grubu.
N	Nane ekstraktı uygulanmış deney grubunun kısaltması.
NKont	Nane ekstraktı uygulanmış kontrol grubu.
Met1	Metanol uygulanmış birinci (1.) kontrol deney grubu.
Met2	Metanol uygulanmış ikinci (2.) kontrol deney grubu.
Met3	Metanol uygulanmış üçüncü (3.) kontrol deney grubu.
Ss1	Saf su uygulanmış birinci (1.) kontrol deney grubu.
Ss2	Saf su uygulanmış ikinci (2.) kontrol deney grubu.
Ss3	Saf su uygulanmış üçüncü (3.) kontrol deney grubu.
Ss4	Saf su uygulanmış dördüncü (4.) kontrol deney grubu.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Sitophilus granarius L. 1758 (Orijinal) 4
Şekil 1.2 Bir adet buğday tanesinin içini oymuş S. granarius (Orijinal) 5
Şekil 3.1 Alman orjinli kültür stokları (orijinal) 16
Şekil 3.2 Çalışmada kullanılan kurutulmuş kekik, maydanoz, nane (Orijinal) 17
Şekil 3.3 Çalışmada kullanılan buğday (Orijinal) 17
Şekil 3.4 Hassas terazi ve mekanik karıştırıcı (orijinal) 18
Şekil 3.5 24 saat bekletilmiş ağzı parefenli ekstrakt kapları (orijinal) 18
Şekil 3.6 Kotterman marka kazanda metanolü uçurulan ekstraktlar (orijinal) 19
Şekil 3.7 Konsantrasyon oranlarına göre hazırlanmış böcek kültürler (orijinal) 19
Şekil 3.8 Konsantrasyon oranlarına göre parfüm şişeleri ve kültürler (orijinal) 20
Şekil 3.9 Kekiğin birinci biyolojik tekrarının artan konsantrasyon oranlarına göre etki yüzdeleri grafiği 24
Şekil 3.10 Kekiğin ikinci biyolojik tekrarının artan konsantrasyon oranlarına göre etki yüzdesi grafiği 26
Şekil 3.11 Kekiğin üçüncü biyolojik tekrarını artan konsantrasyon oranlarına etki yüzdeleri grafiği 27
Şekil 3.12 Kekiğin üç biyolojik tekrarının artan konsantrasyon oranlarına göre karşılaştırılmalı olarak etki yüzdeleri grafiği 27
Şekil 3.13 Kekiğin %100 konsantrasyon oranındaki ekstraktıyla hazırlanan kontrol gruplarının metanolun birinci hafta etkisi çıkartılarak oluşturulan 2, 3 ve 4. hafta eğrisi 28
Şekil 3.14 Maydanoz ekstraktı uygulanmış ikinci biyolojik tekrar örneklerde metanolun birinci haftadaki tesirinden arındırılmış etki yüzdeleri grafiği 30
Şekil 3.15 Maydanozun %100 konsantrasyonlu kontrol gruplarının etkili olduğu hafta dağılımları 31
Şekil 3.16 Nane ekstraktıyla hazırlanan ikinci biyolojik tekrarın etkin konsantrasyon aralığı 32
Şekil 3.17 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan ikinci biyolojik tekrarın %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında birinci hafta metanol etkisinden arındırılmış haftalık etki yüzdeler grafiği 34
Şekil 3.18 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan üçüncü biyolojik tekrarın %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında birinci hafta metanol etkisinden arındırılmış haftalık etki yüzdeleri grafiği 35
Şekil 3.19 Nane ekstraktı uygulanmış kontrol gruplarının etki etmiş olduğu hafta dağılımları 36

Şekil 3.20 Kekik, maydanoz ve nane ekstraktların en güçlü letal etki göstermiş olduğu çalışma gruplarının (aK, bM, bN) karşılaştırılması.....36

Şekil 3.21 On iki (12) adet genetik materyalı izole edilmiş böcek kültürlerine ait eppendorf tüpleri (orijinal) 41

Şekil 3.22 14000 devir, 5 0C'de çalışan santrifüj (orijinal).....42

Şekil 3.23 NanoDrop ND-1000 Spectrometer (orijinal). 43

Şekil 3.24 ROCHE marka Light Cycler Nano Real Time PCR cihazı (orijinal).....43

Şekil 3.25 Saf su uygulanmış kontrol grubunun Housekeeping geni (Glyceraldehyde-3-phosphate GAP) geni ifade düzeyine oranla kekik uygulanmış örneklerin konsantrasyon oranlarına bağlı olarak Target gen (Cytochrome oxidase 1 CO1) gen ifade düzeyleri.....46

Şekil 3.26 Saf su uygulanmış kontrol grubunun Housekeeping geni (Glyceraldehyde-3-phosphate GAP) geni ifade düzeyine oranla nane uygulanmış örneklerin konsantrasyon oranlarına bağlı olarak Target gen (Cytochrome oxidase 1 CO1) gen ifade düzeyleri.....46

Şekil 3.27 Şekil 3.27 Saf su uygulanmış kontrol grubunun Housekeeping geni (Glyceraldehyde-3-phosphate GAP) geni ifade düzeyine oranla metanol uygulanmış örneklerin konsantrasyon oranlarına bağlı olarak Target gen (Cytochrome oxidase 1 CO1) gen ifade düzeyleri 47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Hazırlanan beş farklı konsantrasyonun etken madde saf su oranları 19

Çizelge 3.2 Sadece distile su uygulanan buğdaylarla hazırlanan kontrol gruplarının haftalık mortalite kayıtları 22

Çizelge 3.3 Sadece distile su tatbik dilen buğdaylardan hazırlana kontrol gruplarının haftalık mortalite oranları 22

Çizelge 3.4 Sadece %70'lik metanol uygulanan buğdaylarla hazırlanan kontrol gruplarının haftalık ham mortalite kayıtları 23

Çizelge 3.5 Sadece metanol uygulanan buğdaylarla hazırlanan kontrol gruplarının haftalık etki oranı hesapları 23

Çizelge 3.6 Sadece metanol uygulanan buğdaylarla hazırlanan kontrol gruplarında, birinci hafta etkisinden arındırılmış haftalık etki oranları 24

Çizelge 3.7 Kekik ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan birinci biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarına göre kaydedilen haftalık ham mortalite sayıları 24

Çizelge 3.8 Kekik ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan birinci biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında birinci hafta metanol etkisinden arındırılmış haftalık etki oranları 24

Çizelge 3.9 Kekik ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan ikinci biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarına göre kaydedilen haftalık ham mortalite sayıları 25

Çizelge 3.10 Kekik ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan ikinci biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında birinci hafta metanolun yanıltıcı etkisinden arındırılmış haftalık etki oranları 25

Çizelge 3.11 Kekik ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan üçüncü biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarına göre kaydedilen haftalık ham mortalite sayıları 26

Çizelge 3.12 Kekik ekstraktı uygulanmış örnekler üçüncü biyolojik tekrarın birinci hafta metanolun yanıltıcı etkisinden arındırılmış, yüzde etki oranları 26

Çizelge 3.13 Kekiğin %100 konsantrasyon oranıyla hazırlanmış iki adet kontrol deneyinin kaydedilen haftalık mortalite sayıları 28

Çizelge 3.14 Kekiğin %100 konsantrasyon oranıyla hazırlanmış iki adet kontrol deneyinin birinci hafta metanolun yanıltıcı etkisinden arındırılarak hesaplanan % etki oranları 28

Çizelge 3.15 Maydanoz ekstraktı uygulanmış birinci gruptaki örneklerde haftalık mortalite sayım sonuçları 29

Çizelge 3.16 Maydanoz ekstraktı uygulanmış gruplardan birinci biyolojik tekrarın metanolun birinci hafta etkisinden arındırılarak hesaplanan % etki oranları 29

Çizelge 3.17 Maydanoz ekstraktı uygulanmış, ikinci biyolojik tekrar örneklerde kaydedilen haftalık mortalite sayıları 29

Çizelge 3.18 Maydanoz ekstraktı uygulanmış ve ikinci biyolojik tekrar örneklerde metanolun birinci haftadaki tesirinden arındırılmış etki yüzdeleri 30

Çizelge 3.19 Maydanozun %100 konsantrasyondaki ekstraktı uygulanmış kontrol gruplarının kaydedilen haftalık mortalite sayıları 30

Çizelge 3.20 Maydanozun %100 konsantrasyondaki ekstraktı uygulanmış kontrol gruplarının metanolun birinci hafta etkisinden arındırılarak hesaplanan % etki oranları 31

Çizelge 3.21 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan birinci biyolojik tekrarın %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarına göre kaydedilen haftalık ham mortalite sayımları 32

Çizelge 3.22 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan birinci biyolojik tekrarın %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında birinci hafta metanol etkisinden arındırılmış haftalık etki oranları 32

Çizelge 3.23 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan ikinci biyolojik tekrarın %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarına göre kaydedilen haftalık ham mortalite sayımları 33

Çizelge 3.24 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan ikinci biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında birinci hafta metanol etkisinden arındırılmış haftalık etki yüzdeler 33

Çizelge 3.25 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan üçüncü biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarına göre kaydedilen haftalık ham mortalite sayımları 34

Çizelge 3.26 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan üçüncü biyolojik tekrarın %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında birinci hafta metanol etkisinden arındırılmış haftalık etki yüzdeler 34

Çizelge 3.27 Nanenin %100 konsantrasyondaki ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan kontrol gruplarının 55. gün öncesi mortalite 55. gün sonrası canlı böcek sayıları 35

Çizelge 3.28 Nanenin %100 ekstraktı uygulanan kontrol gruplarını metanolun birinci hafta etkisinden arındırılmış etki yüzde oranları 36

Çizelge 3.29 En güçlü letal etki görülen ekstrakt gruplarının (aK, bM, bN) karşılaştırılması 36

Çizelge 3.30 Üç tam biyolojik tekrar yapılan kekik ve nane gruplarının One-Wan ANOVA testine tabi tutulmak üzere hesaplanan avarage değerleri ve p-value değer 37

Çizelge 3.31 Target gen bölgeleri için seçilen ve işaretlenen primer dizileri 40

Çizelge 3.32 Housekeeping gen bölgeleri için seçilen ve işaretlenen primer dizileri 40
Çizelge 3.33 Real-Time PCR reaksiyonu komponentleri 43
Çizelge 3.34 Real-Time PCR Döngüsü protokolü 43
Çizelge 3.35 Nanodrop ND-Spectrometer 1000 sonuçları. Örneklerden elde edilen cDNA saflık değerleri 44
Çizelge 3.36 Kekik ve nane ekstraktı ve metanol uygulanmış örneklere ait normalize edilmiş CO-I geninin ekspresyon verileri 45
Çizelge 3.37 Kekik ve nane ekstraktı ve metanol uygulanmış örneklere ait CO-I geninin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri 45

1. GİRİŞ

1.1 *Triticum vulgare* (Buğday)

Buğday *Triticum vulgare* (Poaceae) fosil kayıtlara göre insanoğlu için binlerce yıldır temel besin kaynağı olmuştur. Bu durumun en önemli nedeni olarak buğdayın yeterli karbonhidrat içermesinin yanı sıra % 10,26-13,88 oranında yüksek protein (gluten); başta B ve E olmak üzere çok çeşitli vitamin; yağ, selüloz ve hatta minereler içeriyor olmasıdır (Yağdı 2004). Zengin besin içeriğine ek olarak yetiştirilmesinin kolaylığı, ürün veriminin yüksek olması, uygun koşullar sağlandığında yıl boyu muhafaza edilebilmesi buğdayı insanoğlu için yeri doldurulamaz gıda ham maddesi haline getirmiştir. Tüm dünyada, 2017 yılında 221 milyon hektar ekim alanında toplam 758 milyon ton buğday üretimi rapor edilmiştir. 2018 yılında yapılan buğday üretimi ise 744,68 milyon tondur. Buğday, mısırdan sonra dünyada en fazla üretimi yapılan ikinci hububattır. Üçüncü dünya ülkelerinin ürünü olarak lanse edilen buğday üretiminde, sanılanın aksine, Çin, ABD ve Rusya gibi küresel aktörler ilk dörde girmektedir. Ülkemizde 2017 yılında 7,6 milyon hektar üretim alanında 21,5 milyon ton; 2018'de ise 7,3 hektar üretim alanında 20,00 milyon ton buğday üretilmiştir. Ülkemiz dünya sıralamasında yedinci sıraya girmesine rağmen toplam üretimdeki payı ancak %3 kadardır (Anonim 2016, Anonim 2017a, Anonim 2017b, Anonim 2018, Anonim 2019b). Buğdayın, yapılan araştırmalarda ülkemizde ve dünyada çok büyük ticari hacmi ve sosyo-ekonomik önemi olduğu görülmektedir. Sonuçta gelişmiş ülkelerin üretim, depolama ve tüketimde ilk sıralarda bulunduğu buğdayın, petrolden daha önemli stratejik enerji ve güç kaynağı olduğu saptanmıştır.

1.2 Gıdalarda Depolama Parametresinin Önemi

Yıl boyunca sofralarımızda önümüze konulacak besinlerin tamamına yakını şu an dünyanın dört bir yanında toplam hacmini hayal bile edemeyeceğimiz büyüklükteki depolarda bizimle karşılaşacağı günü beklemektedir. Bütün gıdalarda olduğu gibi hububat ve özellikle buğday doğası gereği yılın belli bir ayında hasat edilmekte olup

yılın kalan diğer on bir ayı boyunca kontrollü bir şekilde tüketime arz edilmesi için uygun koşullarda depolanmalıdır. Aksi takdirde gıda yetersizliği ve kıtlık söz konusu olabileceği gibi savaş, kuraklık ve diğer öngörülemeyen doğal afetler için de tahılların önceden yeterli ölçüde depolanması hayati öneme sahiptir (Dizlek 2012). Ayrıca ürün uygun depo koşullarında muhafaza edilemediği takdirde üretimi arttırmak için harcanan bütün girdilerin kaybedileceği açıktır (Kibar ve Öztürk 2010). Konuya verilen önemini ortaya koymak açısından değinecek olursak, 2018 yılı buğday üretimi 20.00 milyon ton olan ülkemizin hububat depolama kapasitesi kamu ve özel toplam 24,5 milyon ton civarında iken, örneğin Rusya'nın bu kapasitesi 120 milyon tondur (Anonim 2016, Anonim 2018, Anonim 2019b). Sonuçta farklı ulusların ve küresel aktörlerin buğdaya verdiği önem ortadadır.

1.3 Depolanmış Ürünlerde Böcek Tahribatının Boyutları

Gıdalarda nicel ve nitel kayıp, üretimden başlayıp tüketiciye ulaştığı ana kadar devam etmektedir. Bu kaybın en önemli etmeni depolardır. Örneğin hububatların depoda bekleme süresi bir sonraki hasat mevsimine kadar uzayabilmektedir. Sıcaklık, bağıl nem, havalandırma ve hava içeriği gibi fiziksel etmenlerin yanı sıra kemirgenler, böcekler, akar ve funguslar gibi depo zararlısı biyolojik faktörlerde ürünlerin miktar ve kalitesini tehdit etmektedir (Dizlek 2012). Yapılan araştırmalarda, buğday ve tahıllarda, depo zararlısı böcek ve diğer organizmalardan kaynaklanan ürün kaybı ve tahribatının %10 civarında olduğu belirtilmektedir (Donahaye ve Messer 1992). Üstelik Senegal'de tür bazında *Sitophilus spp.* üzerinde yapılan bir çalışmada depo zararlılarının toplam hububat üzerinde oluşturduğu kaybın % 25 ile % 40 arasında olduğu rapor edilmiştir (Ndong vd. 2015). Bu hususta görüşe, dolaylı kanıt olacak farklı bir örnek verecek olursak; Toprak Mahsulleri Ofisi (TMO) *Eurygaster spp.* (Süne), *Aelia rostrata* **(**Kımıl) benzeri böcek tahribatının % 2'nin altında olduğu ürünlere 2016 yılında % 1-7'ye ek ilave fiyat ödemektedir (Anonim 2016). Sonuç olarak tüm aşamalarda olduğu gibi özellikle depolama esnasında tahıllar, kaliteyi düşürecek çeşitli böcek istilası tehdidiyle karşı karşıya olduğu göz ardı edilemeyecek bir gerçektir (Leblanc vd. 2014).

1.4 Böcek Tahribatının Maliyeti Hakkındaki Tahmin

Depo aşamasında, başta çalışmamızın konusu olan *S. granarius* olmak üzere çeşitli böceklerden kaynaklanan kaybın % 10 olduğu hakkındaki (Donahaye ve Messer 1992) veriden yola çıkarak bir hesap yapacak olursak;

TMO 2019 alım fiyatı:

Makarnalık Buğday	: Ton başına 1.603TL,
Anadolu Kırmızı Sert Buğday	: Ton başına 1.335TL

(Anonim 2019a).

(1.335,00TLX20 milyon ton = 26,7)X1/10=**2,67MilyarTL(Kayıp)**

Makarna, bisküvi gibi maliyeti ile satış fiyatı arsında çok büyük rakamlar oynayan ürünleri değil de sadece ekmek maliyeti üzerinde, ürün bazında bu kaybı tekrar hesaplayacak olursak:

(200 gr ekmek 1.25TL, kilosu 6.25TL, tonu 6250 TL)
(6250TLX20milyon ton=125 milyar TL)X1/10=**12,5 milyar TL (Kayıp).**

Konya-Ankara hızlı tren hattının devlete maliyeti yaklaşık 2,5 milyar Türk Lirası olduğu hesaba katıldığında 2,67 milyar Türk Lirası doğrudan veya 12,5 milyar Türk Lirası dolaylı (ürün bazında) olası kayıp rakamlarının ülkemiz açısından maliyetinin boyutu daha iyi anlaşılabilir. Dünya ölçeğinde tahmini rakamları düşünüldüğünde yapmış olduğumuz çalışmayla buğdayın spesifik tüketicisi *S. granarius* ile mücadeleye küçük bir katkı sağlayabilmenin dahi ekonomik açıdan ne kadar büyük önemi olduğu anlaşılabilir.

1.5 *Sitophilus granarius*



Şekil 1.1 *Sitophilus granarius L. 1758* (Orijinal)

Takım:	Coleoptera/Kınkanatlılar
Familya:	Curculionidea/Hortumlugiller
Cins:	*Sitophilus*
Tür:	*S. granarius* (L.)
Türkçe Adı:	Buğday Biti,
İngilizce Adı:	Granary Weevil,

Depo zararlısı böcekler kapsamında değerlendirilen ve depo tahılların en önemlisi buğdaya ve ayrıca makarna, bisküvi, pasta gibi sert unlu mamulleri hem tüketerek hem de yumurta bırakarak tahrip eden, spesifik, kozmopolit, bir böcektir. Ortalama 3-5 mm boyundadır ve uçucu değillerdir. Depo ve depo ürünleri dışında hiç kaydedilmemiş olan *S. granarius*'un, uçuş aktivitesinin olmaması, nem oranı çok düşük olan kuru hububat depolarında sıvı kaybını önleyerek, kuraklığa dayanıklılık açısından kendisine avantaj sağlamaktadır (Plarre 2013). Aynı zamanda parlak, koyu kahverengi veya siyah kutikulası sıvı kaybına karşı bariyer görevi de yapmaktadır. Uçucu olmaması, temas halinde cenin pozisyonunda ölü taklidi yapması ve tipik kutikulasıyla diğer türlerden ayrılır. Baş, thoraks ve abdomen bölgelerinden oluşan *S. granarius*'un baş ve thoraks bölgeleri belli belirsiz bir segmentle birbiriyle kaynaşmış görünümdedir. Thoraks bölgesi yuvarlak çukurcuk ve noktalarla; thorakstan belirgin bir segmentle ayrılan abdomen bölgesi paralel çizgilerle şekillenmiştir. Hexapoda altşubesine de adını veren bir özellik olarak altı adet bacağı olan *S. granarius*'un güçlü bir çift mandibulasının ortasında kısa bir hurtumları vardır. Bir haftalık periyotlarla üreyen ergin dişiler, yumurtalarını, buğdayda ve sert unlu mamullerde bu hortum vasıtasıyla açmış oldukları deliklere bırakır. Bir defada 150-300 yumurta bırakabilen ergin dişi tohumun embriyosuna yakın bir bölgeye yumurtasını bıraktıktan sonra bu deliği salgıyla kapatır.

Tohuma açılan deliği kapatan salgı zamanla katılaşır. Kayıtlarda nem, sıcaklık ve diğer koşullar uygunsa yumurta, larva ve pupa aşamalarını 30-45 günde tamamlayarak ergin bireylere dönüşür denilmektedir ancak yaptığımız çalışmada (Maydanoz ve nane ekstrakt uygulanmış ve 55 günden fazla günlük sayımları devam eden iki farklı kontrol grubunda.) 55. günden itibaren –her bir buğdayda birer tane- olmak üzere birer ikişer yavru böceklerin çıkmaya başladığı gözlemlenmiştir. Fakat bu döngünün 55 güne uzamasında uygulanan ekstrakttan kaynaklanan stresin geciktirici etkisi de olmuş olabilir ki bu durum söz konusu ekstraktların böceğin verimliği üzerindeki baskılayıcı etkisiyle ilgili yapılan çalışmalarla da uyuşmaktadır (Karakaş 2016). İçine yumurta bırakılan buğdaylar yavru bireyin büyümesi üzerine dışarıdan bakıldığında belli belirsiz kararmış bir görüntü almaya başlamaktadır. Beslenme esnasında hareketsiz kaldığı kısa molalar verdiği gözlemlenen söz konusu böcek herhangi bir sarsıntı ve yer değişiklikleri esnasında birkaç saniye bacaklarını tamamen toplayarak cenin pozisyonunda beklemektedir. Bu cenin pozisyonuna geçmesi sayesinde kendi vücut kütlesinden çok büyük yığın hareketleri içerisinde sağlam kalabilmektedir. Böceğin öldüğü, cenin pozisyonundakine benzer hareketsizlikten değil, bacakların kendiliğinden gevşediği Şekil 1.1'deki görüntüye almasıyla anlaşılmaktadır. *S. granarius*'de uygun sıcaklığın olmadığı kış mevsimi boyunca veya diğer inhibe edici koşullarda yumurta, larva veya pupa evrelerinde tahıl tanesinin içinde uzun süre beklemede kalabilmektedir. *Sitophilus oryzea* (Pirinç Biti), *Sitophilus zeamais* (Mısır Biti) dış görünüş olarak çok küçük farkları olsa da filogenetik olarak yakın akrabadırlar (Manueke vd. 2015 – Obrepalska-Steplowska vd. 2008).

1.6 Depo Zararlıları İçerisinde *Sitophilus granarius*'un Yeri



Şekil 1.2 Bir adet buğday tanesinin içini oymuş *S. granarius* (Orijinal)

Filogenetik olarak yakın akrabası on dört tür vardır. Depo zararlısı bu on dört türün içinde tahıllara en yüksek zararı veren *Sitophilus granarius*'dür (Longstaff, 1981; Plarre, 2013). Tahıllarda sağlam tanelerde zarar verme özellikleriyle *Sitophilus spp*., *Trogoderma granarium, Sitotroga cerealella,* ve *Rhyzopertha dominica* başlıca zararlı olarak görülmektedir. *T. granarium*'a sıklıkla Güneydoğu Anadolu bölgesinde rastlanmaktadır (Ferizli ve Emekci 2010). İçinde bulunduğumuz şu an bile; dünya depolarındaki besin denizinden daha bize ulaşmadan tamamını ele geçirmeye çalışan ve $n^{150\text{-}300}$ formülle aritmetik olarak çoğalan dev bir ordu (Depo zararlısı haşereler.) önlem alınmayacak olsa son hububat tanesi de tüketinceye kadar sürecek bir şekilde öğütücü bir fabrika gibi gece gündüz çalışmaktadır. Bu ordunun amiral gemisinin kaptanı ise besin denizinin en büyük iki öğesi mısır ve buğdayın ve hatta makarna, bisküvi gibi sert unlu mamullerin baş zarar vericisi *Sitophilus spp*'dir. Bu cins filogenetik olarak yakın akraba olduğu 14 takson içinde depolu ürünlerde en çok zarar verenidir (Longstaff, 1981; Plarre, 2013). Dünyadaki tüm zararlıların içerisinde değerlendirildiğinde, mısırdan sonra üretim ve tüketimde ikinci sırada olan buğdayın spesifik zararlısı *S. granarius* olduğu söylenebilir.

Ayrıca; $n^{150\text{-}300}$ üreme kapasitesine sahip olan *Sitophilus sp.* ve benzeri böcekler, normalde 1'e 700, (Tohum ıslahı çalışmalarıyla 1' 5000'e kadar arttırılabilen.) çoğalma kapasitesine sahip *Triticum sp.* ve benzeri bitkilerin dünya üzerinde yaygın alan kaplayarak oluşturacakları geniş vejetasyon serileriyle tür çeşitliliğinin azalması ve endemik türlerin yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalması önünde engelleyici doğal bir denge mekanizması görevi yapmaktadır.

1.7 Depo Zararlılarıyla Mücadele Yöntemleri

Depolanmış ürünlerde, tohumların yaş ağırlığı, protein ve besin değerlerinde, mahsulün pazar değerindeki kayıplar "doğrudan"; bakteri, mantar, böcek gibi hayvansal organizmalar ve kimyasal pestisit kalıntıları sonucu oluşan kayıplar "dolaylı" kayıplar olarak ifade edilmektedir (Ferizli ve Emekci 2010). Günümüzde, tüm dünyada ve özellikle Ziraat Fakültelerinde; biyolojik, fiziksel veya kimyasal yollarla bu kayıpla

mücadele çalışmaları kesintisiz devam etmektedir. Zaten depo zararlılarıyla mücadele, geliştirilerek devam etmesi gereken vazgeçilemez bir olgudur. Bu çalışmanın temel amaçlarından biri de, hali hazırda geliştirilmeye çalışılan ve kimyasalların dezavantajlarını taşımayan biyolojik yöntemlere katkı sağlamaktır. Çalışmanın moleküler değerlendirmesi ile de konuya ek bilimsel katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

1.7.1 Kimyasal mücadele yöntemi

Günümüzde uygulanan en yaygın mücadele yöntemi kimyasal mücadeledir. Üreticilerin ticari amaçları; yetiştiricilerin hazırcı ve kolaycı yaklaşımı; çevre ve kimyasallar konusunun başka amaçlarla çarpıtılması; bu sorunun çözümünü engellemektedir. Araştırmalarda test edilen biyolojik yöntemlerin tamamına yakını başarı göstermesine rağmen kimyasal yöntemler tercih edilmekte olup örneğin ülkemizde 1998 yılında 297 ton civarı pestisit kullanıldığı rapor edilmiştir (Ferizli ve Emekci 2010). Yaygın olarak kullanılan kimyasal yöntem yeni oluşan popülasyonlarda bu kimyasallara karşı çapraz direnç gelişmesine neden olmaktadır (Lorini ve Galley 1999). Ayrıca kimyasalların tabiatta bıraktığı kalıntılar, hedef türün dışında, insan sağlığına ve ekosisteme birçok canlıya zarar vermektedir (Ferizli ve Emekci 2010). Optimum konsantrasyon dışında zararlı organizmaya etkisinin olmamasına karşın ticari nedenlerle konsantrasyon dozunun ve temas süresinin arttırılması tehdidin boyutunu arttırmaktadır. Ayrıca hangi kimyasal kullanılırsa kullanılsın doğal seleksiyon sonucu elenen bireylerden sonra söz konusu kimyasaldan hiç etkilenmeyen genetik mirasa sahip bir popülasyon ortaya çıkacaktır. Bu nedenle aynı kimyasalın uzun yıllar boyunca aynı etkiyi göstermesi mümkün değildir. Üstelik bütün toksik etkilerine rağmen bazı kimyasallar laboratuar çalışmalarında dahi % 100 neticeye ulaşamamaktadır. Hatta bazı böceklerde bu kimyasallardan hiç etkilenmemektedir (Sehgal vd. 2014). İçerisinde *S. granarius*'un da bulunduğu çeşitli böcekler üzerinde yapılan Konsantrasyon-Zaman (CT) analizinde, metil bromürün optimum dozun üzerindeki konsantrasyonlarının kullanıldığı deneylerde daha düşük mortalite gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada fosfin gazı ile uygulanan fumigasyon yönteminde 6 saatten az uygulandığında letal etkinin çok düşük olduğu görülmüştür (Bell ve Glanville 1973). Optimum dozun üzerinde mortalitenin

azalması bulgusu, yapmış olduğumuz çalışmada da farklı bitki özütlerinde gözlemlenmiştir. Ayrıca birçok pestisit genotoksik etkiye sahiptir. Genel olarak sindirim, solunum ve üremeyi inhibe eden biyolojik yöntemler yerine Fransa'da yaygın olarak kullanılan pirimifos-metil ve klorpirifos-metil gibi organafosfatlar; deltamethrin veya sipermetrin gibi pretroit tarzı temas yöntemiyle etki eden kimyasallar tercih edilmektedir (Leblanc vd. 2014). Bu temas yöntemiyle etki eden kimyasal ajanların ekolojik olarak daha tehlikeli oldukları söylenebilir. Bu nedenle çeşitli kimyasallar bazı ülkelerde yasaklanmakta olup sınırlı sayıda kimyasal yasal izin alabilmektedir. Örneğin ülkemizde günümüzde *S. granarius*'a karşı kullanımda, ruhsatlı tek ürün Deltametrin ismindeki organafosfattır. Fosfin gazıyla yapılan fumigasyonda yada boş ambara sıvı kimyasalın püskürtülmeside (pülverizasyon) kimyasalların zararlı etkilerinin en asgariye indirilmesi için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından insektisitlerin kullanımında optimum sürede haşerelerin % 50'sini öldüren konsantrasyonun (LC_{50}) altı değerleri tavsiye edilmektedir. WHO'nun tavsiye niteliğindeki kararları, üye ülkeler nezdinde yasal olarak bağlayıcıdır. Tavsiye edilen değerin üstü çevreye ve insan sağlığına zararı arttıracaktır. Bu değer zaten tamamen zararsız olmamakla beraber bu seferde %50 üst limiti haşereyle mücadelede istenilen hedef başarının önünde bir engel oluşturacaktır. Daha öncede belirttiğimiz gibi çalışmalarda kullanılan çeşitli kimyasalların % 100 etki sağlayamadığı görülmüştür (Sehgal vd. 2014). Üstelik bu kimyasalların rezidüel etkileri hakkında yapılan çalışmalarda insektisit kalıntı bıraktığı ve bu kalıntıların on iki (12) ay boyunca letal etkisini devam ettirdiği görülmüştür (Çizmecioğlu 2015). Bu kimyasal kalıntılar zamanla kontamine ettiği sucul alanları ve içme suyu kaynaklarını da kirletmekte olup başta sucul olmak üzere tüm canlılar üzerinde toksik etkileri görülmektedir (Atamanalp ve Cengiz 2002).

1.7.2 Kimyasal olmayan diğer mücadele yöntemleri

Mücadele yöntemlerini genel olarak kimyasal ve kimyasal olmayan adı altında ele alacak olursak, sıcaklık ve nem oranının optimum seviyede korunduğu modern çelik silolar tahılların uzun süre muhafazasında önemli avantaj sağlaması, havalandırma uygulaması, hermetik depolama, optimum ısı seviyesinin düşürülmesi veya arttırılması sayılabilir. Ancak bunlarında belli yatırım ve enerji giderlerinin maliyetleri olacağı

açıktır. Böcek Büyüme Düzenleyicileri (IGR) kullanımı, Amorf Silika (Dryacide) kullanımı da (Aldryhim 1990) kimyasal olmayan depo zararlılarıyla mücadele yöntemleri olarak değerlendirilebilir. Diyatom toprağı ve amorf silika tuzu gibi ajanlar böceğin su bariyerlerini bozarak letal etki göstermektedir (Aldryhim 1990). Literatür tarandığında, genel anlamda kimyasal olmayan ve veya biyolojik yöntemlerin yaklaşık tamamında başarı sağlandığı görülmektedir.

1.7.3 Biyolojik mücadele yöntemleri

Biyolojik yöntemlerden en yaygını aromatik bitkilerin kullanımıdır. *Artemis* türüne ait uçucu yağlar *S. granarius* üzerine güçlü biyolojik etki göstermiştir (Kordali vd. 2006). Mehrabadi ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada *Punica granatum* L. (Nar), *Rheum officinale* B. (Ravent), *Rhus coriaria* L. (Sumak), *Artemisia sieberi* B. (Pelin), *Peganum harmala* L. (Üzerlik), *Datura stramonyum* L. (Boru Çiçeği) ve *Thymus vulgaris* L. (Kekik) olmak üzere yedi tür biyoinsektisit olarak kullanılmıştır. Karakaş'ın (2016) yaptığı çalışmada *Anethum graveolens* L. (Dereotu) ve (*Ocimum basilicum* L. (Fesleğen), *S. granarius* üzerinde biyoinsektisit olarak denemiş ve dereotunun daha güçlü olmak üzere her iki bitkinin de toksik ve antifeedant (uzaklaştırıcı) etkisini saptamıştır. Yine Karakaş tarafından aynı yıl yapılan diğer bir çalışmada kekik, maydanoz ve nanenin *S. granarius'*un üremesi üzerindeki etkileri araştırılmış ve en güçlü etki nanede olmak üzere konsantrasyon oranlarına bağlı olarak üremeyi inhibe edici etkileri olduğu görülmüştür (Karakaş 2016). Bölükbaşı ve Karakaş (2017) yapmış olduğu bir diğer çalışmada kara kimyonun yüksek konsantrasyonda *S. granarius* üzerinde letal etki gösterdiği görülmüştür. Tıbbi aromatik bitkilerin yanı sıra *Saccharopolyspora spinosa* bakterisinin doğal fermantasyon ürünü spinosinler böcek kontrolünde aktif ürünlerdir (Madduri vd. 2001). Aynı zamanda spinosinler ruhsatlandırılmıştır. Böcek Büyüme Düzenleyicileri (IGR) kullanımı ise sentetik kimyasallardan da elde edildiği gibi değişik bitkilerden doğal olarak da elde edilebilmektedir. Bunlar böceklerin hormonlarını hedef alarak letal etki oluşturmaktadır (Tunaz ve Uygun 2004).

1.7.4 Biyolojik yöntemin ülkemizdeki avantajları

Ülkemiz, çalışma konumuz olan depo zararlılarına karşı tıbbi aromatik bitkilerle yapılan biyolojik mücadele konusunda, farklı avantajlara sahiptir. Anadolu, Üçüncü Buzul Çağında tüm canlı türleri için bir yaşam adasına dönüşmüş olması nedeniyle çoğu tür için gen merkezi konumundadır. Tespit edilen 12000 üzerindeki bitki taksonunun 3500'e yakını endemiktir. Endemik tür dünyada sadece belli bir bölgede yetişen ve başka bölgelerde görülmeyen türler olup genetik zenginliğin en önemli kriteridir. Ülkemizle kıyaslandığında Türkiye'nin 15 katı yüz ölçümüne sahip tüm Avrupa Kıtasında toplam 12500 bitki taksonu vardır ve bunların ancak 2500'ü endemiktir. Örneğin tıbbi aromatik bitkilerin arasında *Salvia'*nın (Ada Çayı) 51'i endemik 97 türü ülkemizde yetişmektedir (İpek ve Gürbüz 2010). Konumuzla ilgili *Poaceae*'in (Buğdaygiller) 512 tür sayısı olmakla beraber biyoinsektisit olarak test ettiğimiz *Lamiaceae* (Ballıbabagiller) familyasının ülkemizde 45 Cins, 456 tür ve % 44 endemik 731 taksonu bulunmaktadır. Bu familyada çalışmamızın da konusu olan *Thymus* (Kekik), *Mentha* (Nane) ülkemizde yabani ve kültür tarımı yapılan çok sayıda türü yaygın olarak bulunmaktadır (İpek vd. 2014). *Lamiaceae* (Ballıbabagiller) familyası otsu ve çalı formundadır ve Akdeniz Bölgesinde yaygındır. İngiliz Nanesi ismi de kullanılan *Mentha piperita* (Eskişehir Nanesi) kültür bitkisi olarak ülkemizin çoğu sucul alanlarında yetiştirilmektedir. *M. aquatica* ve *M. spicata'*nın melezinin yaprakları kodeks ve farmakopelerde *Foli menthae piperitae* olarak kayıtlıdır. *M. aquatica* –latince ismindende anlaşılacağı üzere- (Su Nanesi) Karadeniz bölgesinde (Terme) yapılan çalışmada sucul alanlarda kendiliğinden yetiştiği gözlemlenmiştir (Korkmaz vd. 2017). Pulegon bakımından zengin *M. pulegium* ağırlıklı olarak Akdeniz Bölgesi olmak üzere akarsu ve göl kenarları gibi tüm sulak alanlarda yayılım göstermektedir. Türkiye'de kültür tarımı yapılan ve yerel market ve pazarlarda satılan nane türleri *M. rotundifolia* ve *M. longifolia*'dır. Bunların yaprakları piperiton içerir fakat mentol içermez (Tanker vd. 1998). Aynı tür içerisinde büyük içerik farkları, sahip olunan takson çeşitliliğin önemini göstermektedir. Biyoinsektisit olma potansiyeline sahip bitkilerin temini konusunda ülkemizin sahip olduğu avantajları göstermek açısından birkaç örnek verecek olursak; İç Anadolu da *M. longifolia* yazları kuruyan dere ve soğuksu kenarlarında kendiliğinden yabani olarak yetişmektedir ve bu durum

Anadolu Üniversitesi tarafından da tespit edilmiştir (Türe ve Köse 2000; Atik vd. 2010). *M. aquatica* (Su Nanesi) Karadeniz Bölgesinde, *M. spicata* ise Ege Bölgesinde doğal alanlarda yaygın olarak kendiliğinden yetiştiği kayıtlara geçmiştir (Özderin vd. 2014). Çok büyük ticari öneme sahip *Mentha spp*.'nin ülkemizde tarımı yapılmakla birlikte araziden de toplanabilmektedir. Örneğin Şanlıurfa'da birçok nane türünün yabani olarak bulunmaktadır. Tabiatta yayılım gösteren yabanıl mahsulün yanı sıra ülkemizde 1994 yılında 2800 ton nane bitkisi yetiştirilmiştir. Ülkemizde, *Thymus spp.* (Kekik) bitkisinin 40 kadar türü yetişmektedir. *T. vulgaris* (Yabani Kekik) Türkiye'de kültür tarımı yapılmaktadır. *T. serpyllum* ise ülkemizde yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak halk arasında başka bitkilerde kekik olarak bilinmektedir (Tanker vd. 1998). *Thymus* (Kekik) hakkında literatür tarandığında, deniz kenarındaki bölgelerde ve iç kesimde sulak alanlarda örneğin Eskişehir, Bilecik, Elazığ, Antep gibi illerimizde hem yabanıl olarak rastlandığı hem de kültür bitkisi olarak yetiştirildiği anlaşılmaktadır.

Çalışmamızdaki mortalite oranları üzerinde etkisinin olduğunu düşündüğümüz bir başka husus şudur ki; Harran Ovasında *M. arvensis var. piparescens, M. piperita mitcham, M. piperita* (Eskişehir Nanesi) , *M. piperita prilubskaja* üzerinde yapılan araştırmada farklı türlerde farklı dikim ve hasat zamanlarında uçucu yağ oranlarının değiştiği en yüksek verimin sonbahar hasadında görüldüğü belirlenmiştir (Özel ve Özgüven 2002). Bu dikim ve hasat zamanın bitki içeriğindeki etkisi bizim çalışmamızda da gözlemlenmiştir. Tüm bu bilgilerin ışığında, ülkemiz tıbbi aromatik bitkilerin kullanımında önemli avantaja sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca çevreye herhangi bir toksik etkisi kayıtlara geçmeyen aromatik bitkilerden elde edilen ekstrakt ve uçucu yağlar, kapalı depolarda ve depolama işleminden önce uygulandığı taktirde ürüne ve çevreye kontaminasyon ihtimali de ciddi oranda azalmaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

Triticum vulgare üzerinde yapılan çalışmada buğdayın yüksek oranda protein, karbonhidrat, yağ, vitamin ve mineral içerdiği görülmüştür (Yağdı 2004). 2018 yılında buğday dünyada ve ülkemizde bir önceki yıla göre azalma göstermesine karşın toplamda 744,68 milyon ton üretimle mısırdan sonra en fazla üretimi yapılan ikinci hububattır. Sanılanın aksine buğday üretimi üçüncü dünya ülkelerinde değil -ilk dörde giren- Çin, ABD ve Rusya gibi büyük ölçekli ekonomilerde yüksek düzeylerdedir. Ülkemizde toplam 24,5 milyon ton hububat depolama kapasitesi varken bu kapasite Rusya'da 120 milyon ton civarındadır. (Anonim 2016, Anonim 2018, Anonim 2019b) Buğday depolanmadığı takdirde kıtlık olacağı gibi savaş kuraklık ve her türlü doğal afet içinde depolanarak muhafazası hayati mecburiyettir (Dizlek 2012). Ayrıca uygun depolama olmaması halinde üretim için harcanan tüm girdiler kaybedileceği açıktır (Kibar ve Öztürk 2010). Depolardaki ürünler sıcaklık, nem, havalandırma, hava kalitesi, hava bileşenleri gibi fiziksel etmenlerin yanı sıra kemirgenler, böcekler, akar ve fungusların tehdidi altındadır (Dizlek 2012). Depolanmış ürünlerde bu tarz depo zararlısı organizmalardan kaynaklanan kaybın %10 civarı olduğu söylenmektedir (Donahaye ve Messer 1992). Üstelik Senegal'de yapılan bir araştırmada bu rakam %25 ile %40 arasında olduğu belirtilmiştir (Ndong vd. 2015). Aynı zamanda böyle bir olgunun varlığının kanıtı, TMO alımlarında böcek tahribatı incelenmesi ve bu tahribatın düşük olduğu ürünlere ilave ödeme yapmasıdır (Anonim 2016). Leblanc ve arkadaşları da (2014) yaptıkları çalışmada doğal olarak depolarda saklanan tahılların böcek istilası tehdidiyle karşı karşıya olduğunu belirtmiştir. Depo zarlıları içerisinde adı geçen 14 taksondan *Sitophilus spp*. en çok zarar veren türdür (Longstaff, 1981; Plarre 2013). *S. granarius, S. zeamais, S. oryzae* görünüş olarak küçük farkları olsa da filogenetik olarak yakın akrabadır (Manueke vd. 2015; Obrepalska-StepLowska vd. 2008). Depolanmış ürünlerin yaş ağırlığında, protein ve besin değerlerinde, mahsulün pazar değerindeki kayıplara doğrudan kayıplar denilmektedir. Bakteri; mantar; böcek ve diğer hayvansal organizmalardan kaynaklanan kayıplar ile kimyasal kalıntıları sonucu oluşan kayıplara dolaylı kayıp denilmektedir. Araştırmalarda biyolojik yöntemlerin başarılı olmasına rağmen kimyasallar tercih edilmektedir. Örneğin ülkemizde 1998 yılında 297 ton civarı pestisit kullanıldığı rapor edilmiştir. Bu kimyasalların tabiata

bıraktığı kalıntılar insan sağlığına ve ekosisteme zarar vermektedir (Ferizli ve Emekci 2010; Çizmecioğlu 2015). Yaygın olarak kullanılan bu kimyasallara karşı çapraz direnç gelişmektedir (Lorini ve Galley 1999). Üstelik kullanılan bazı kimyasallar laboratuar çalışmalarında dahi %100 netice verememektedir (Ferizli ve Emekci 2010). Bazı türler bu kimyasallardan hiç etkilenmemektedir (Sehgal vd. 2014). Örneğin en etkili kimyasallardan biri olan fosfin gazı ile uygulanan fumigasyon yönteminde 6 saatten az temas süresinde letal etkinin düşük olduğu görülmüştür (Bell ve Glanville 1973). Çalışmamızla ilgili diğer bir ayrıntı ise kimyasal çalışmalarda dahi letal etki ancak 7-14. gün aralığında gözlemlenebilmektedir (Kljajic ve Peric 2009). Sindirim, solunum ve üreme üzerinde etkili olan aromatik bitkilerin yerine organizmaya temas yoluyla zarar veren kimyasallar tercih edilmektedir (Leblanc vd. 2014). Temas yöntemiyle etki eden bu kimyasalların rezidüel etkileri yıl boyu (12 ay) devam ettiği saptanmıştır (Çizmecioğlu 2015). Bu kalıntılar sucul alanları kontamine ederek insanlar dâhil tüm canlı türlerini tehdit etmektedir (Atamanalp ve Cengiz 2002). Aromatik bitki ekstraktlarının kullanımının yanı sıra; modern çelik silolar, havalandırma, optimum ısı seviyesinin korunması, hermetik depolama ve böcek büyüme düzenleyicileri (IGR) kullanımı, Spinosinler gibi depo zararlılarıyla mücadelede bir çok kimyasal olmayan yöntem de kullanılmaktadır (Ferizli ve Emekci 2010). *Sacharopolyspora spinosa* bakterisinin doğal fermantasyon ürünü spinosinler böcek kontrolünde kullanılmaktadır (Madduri vd. 2001). Böcek hormonlarını hedef alarak letal etki gösteren IGR değişik bitkilerden elde edilmektedir (Tunaz ve Uygun 2004). Biyolojik yöntemin denendiği diğer bir çalışmada *Artemis* türüne ait uçucu yağların *S. granarius* üzerinde güçlü biyoinsektisit etki gösterdiği saptanmıştır (Kordali vd. 2006). Sentetik kimyasalların zararlı etkilerine sahip olmayan Diyatom Toprağı (DE) denendiğinde *S. granarius* üzerinde letal etki gösterdiği görülmüştür (Mewis ve Ulrichs 2001). Farklı bir çalışmada Amorf Silika (Dryacide) tuzunun toksik ajan olarak kullanılmış ve etkinliği kanıtlanmıştır (Aldryhim 1990). Baker 1983 yılında *S. granarius*'un midesindeki amilazın yapısını incelemiştir. Mehrabadi ve arkadaşları 2011 yılında biyoinsektisit olarak kullanılan bitki özlerinin içlerinde *S. granariusun*'da bulunduğu böcekler üzerinde etki mekanizmasını araştırmış ve karbonhidrat metabolizmasında görevli alfa amilaz aktivitesinin inhibe olduğunu görmüşlerdir. Bu kimyasal olmayan ve veya biyolojik yöntemlerle çoğunlukla mücadelede başarıya ulaşıldığı görülmektedir. Ancak

çalışmaların hiç birinde genetik etki mekanizması araştırılmamıştır. Örneğin Fransa'da yaygın olarak kullanılan metil bromürün sitokrom oksidaz c üzerinde inhibe edici etkisi incelenmiş ve saptanmıştır (Haritos ve Dojchinov'un 2003). Ancak bu çalışmada da PCR ve veya genetik analiz yoluna gidilmemiştir. Çalışmamız bu anlamda orijinaldir. Ayrıca, ülkemizin aromatik bitkiler konusundaki çok çeşitli avantajlara sahiptir. Anadolu Yarımadasında yaklaşık 3500'ü endemik 12000 civarı bitki taksonu bulunmaktadır. Örneğin tıbbi aromatik bitkilerin arasında Ada Çayının (*Salvia*) 51'i endemik 97 türü ülkemizde yetişmektedir (İpek ve Gürbüz 2010). Çalışmamızın konusu olan kekik ve nanenin yabani olarak yetişen veya kültür tarımı yapılan birçok türü ülkemizde mevcuttur (İpek vd. 2014). Türkiye'de kültür tarımı yapılan nane türleri *M. rotundifolia* ve *M. longifolia*'dır (Tanker vd. 1998). Bunlardan *M. longifolia* Anadolu'da sucul alan kenarlarında yabani olarak kendiliğinden yetişmektedir (Türe ve Köse 2000; Atik vd. 2010). *M. aquatica* ve Karadeniz, *M. sapicata* da Ege Bölgesinde -doğadan toplanabilecek şekilde- kendiliğinden yetişmektedir (Özderin vd. 2014). Eklememiz gereken bir husus da bu uçucu yağ içeren aromatik bitkilerin içerdiği etken madde miktarı dikim ve hasat mevsimine göre değişmekte olup en yüksek verim sonbahar hasadında alınmaktadır (Özel ve Özgüven 2002). Bu durumun etkisi çalışmamızda da görülmüştür. Çalışmamızda yakın birkaç konunun genetik boyutunu PCR yöntemiyle çalışan örneklere gelecek olursak; 2017 Yılında yayınlanan seminerimizde de belirtildiği üzere Obrepalska-Steploeska ve arkadaşları 2008 yılında -bizim çalışmamızdan tamamen farklı olarak- *S. granarius*'un bulaştığı ürünlerde kontaminasyon oranının belirlenmesi amacıyla -seçilen COI ve COII genleriyle- RT-PCR yöntemini kullanmışlardır. Aynı zamanda bu çalışmada da *S. zeamais* ve *S. oryzea*'nın flogenetik olarak yakın iki tür olduğu belirtilmiştir. Yine, Vallier ve arkadaşlarının 2009 yılında yapmış olduğu farklı bir çalışmada yine RT-PCR yöntemiyle *Sitophilus spp*.nin gelişme evreleri incelenmiştir. Üstelik bu çalışmada Target gen olarak -bizim çalışmamızdan farklı olarak (wpgrp1) belirlenmiştir. Sola ve arkadaşlarının (2018) yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise Obrepalska-Steploeska ve arkadaşlarıyla ile (2008) aynı amaç için -kontaminasyon tespitinde- PCR yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca bu çalışmada da –bizim çalışmamızdan farklı olarak- RT yerine Multiplex PCR yöntemi kullanılmıştır. Haritos ve Dojchinov'un (2003) yaptığı *Sitophilus oryzae* üzerinde metil bromür'ün etki mekanizması araştırıldığında sitokrom

oksidaz c üzerinde inhibe edici etkisi saptanmıştır. Ancak genetik açıdan değerlendirilmemiştir. Karakaş (2016) yaptığı çalışmada dereotu ve fesleğenin *S. granarius* üzerinde biyoinsektisit olarak denemiş ve -dereotunun daha güçlü olmak üzere- her iki bitkinin de toksik ve antifeedant (uzaklaştırıcı) etkisini saptamıştır. Yine Karakaş (2016) tarafından diğer bir çalışmada kekik, maydanoz ve nanenin *S. granarius'*un üremesi üzerindeki etkileri araştırılmış ve en güçlü etki nanede olmak üzere konsantrasyon oranlarına bağlı olarak üremeyi inhibe edici etkileri olduğu görülmüştür. Bölükbaşı ve Karakaş (2017) yapmış olduğu bir diğer çalışmada kara kimyonun yüksek konsantrasyonda *S. granarius* üzerinde letal etki gösterdiği görülmüştür. Literatür tarandığında kekiğin *S. granarius* üzerinde veya herhangi bir toksik ajanın *S. granarius* üzerinde etki mekanizmasının genetik ifadesini PCR ve veya RT-PCR yöntemiyle çalışan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu anlamda da çalışmamız orijinaldir. Biyoinsektisit etki istatistik değerlendirmede One-Way ANOVA kullanılmıştır. Ancak RT-PCR analizinde sabit bir değişkenle kıyaslama yapıldığı durumlarda One-Way ANOVA Dunnet tavsiye edildiği için bu yöntem kullanılmıştır (Dunnet 1955).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamız iki aşamalı olarak uygulamıştır.

1- Birinci aşamada bitki ekstraktlarının *Sitophilus granarius* üzerindeki biyoinsektisit etkileri test edilmiştir.

2- İkinci aşamada ise ölen böceklerin nasıl bir toksik etki sonucu etkilendikleri Real-Time PCR yöntemi kullanılarak moleküler açıdan değerlendirilmiştir.

3.1 Çalışmanın Biyoinsektisit Aşamasının Materyal ve Yöntemi

3.1.1 Materyal

3.1.1.1 *Sitophilus granarius* ve kültürü



Şekil 3.1 Alman orjinli kültür stokları (Orijinal)

Bu çalışmada kullanılan Almanya orjinli *Sitophilus granarius* L. 1758 (Coleoptera; Curculionid), Buğday Biti/Granary Weevil, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi kültür stoklarından daha önceki çalışmalar için Doç. Dr. Mehmet KARAKAŞ tarafından alınan ve Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü A Blok Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarında, % 74 bağıl nem ve 24 ^{0}C ısıya ayarlanmış etüv ortamında yetiştirilen ergin populasyonlar halinde üretimi ve muhafazası devam eden örneklerden temin edilmiştir. *S. granarius* örnekleri temiz buğdaylarla 1/3 oranında doldurulan 1 litre cam kavanozlarda yetiştirilmektedir. Cam kavanozun ağızları böceklerin oksijen ve nem ihtiyacının karşılanması ve kaçmalarını önlemek amacıyla paket lastiği yardımıyla

beyaz tülbentlerle kapatılmaktadır.

3.1.1.2 Bitki materyalleri



Şekil 3.2 Çalışmada kullanılan kurutulmuş kekik, maydanoz, nane (Orijinal)

Bitki materyali olarak *Thymus sp.* L. (Kekik), *Petroselinum sp.* L. (Maydanoz) ve *Mentha sp.* L. (Nane) Ankara'da yerel pazardan (marketten) temin edilmiştir. Kontaminasyondan kaçınmak için bol su ile yıkanan örnekler oda ısısında kurutulmuştur.

3.1.1.3 Buğday



Şekil 3.3 Çalışmada kullanılan buğday (orijinal)

Çalışmamızda marketlerden temin edilen paketli aşurelik buğday kullanılmıştır. Buğdaylar kontaminasyonu önlemek için -20 ^{0}C'de 3 gün bekletilmiştir. Buğdayın çok çeşitli varyetelerinden aşurelik buğdayın tercih edilmesinin nedeni olarak bu tür buğdayın yumuşak olması dolayısıyla ergin *S. granarius* bireylerinin beslenmesinde ve ayrıca içini oyarak yumurtasını koymasının daha kolay olmasındandır.

3.1.2 Yöntem

3.1.2.1 Bitki Ekstraktının Hazırlanması



Şekil 3.4 Hassas terazi ve mekanik karıştırıcı (Orijinal)

Çalışmamızda bitki ekstraktının hazırlanması Talukder ve arkadaşlarının (1993) protokolünden optimize edilen Karakaş ve Bölükbaşının (2017) çalışmasındaki yöntemlerden yararlanmak suretiyle yapılmıştır. Bu protokole uygun olarak önce oda ısısında kurutulan bitki dokuları mekanik olarak öğütülüp elenerek toz haline getirildikten sonra 10 gr'ı 100 ml %70'lik metanolda 30 dk mekanik çalkalayıcıda karıştırılmış daha sonra ağzı parafin zarla kapatılan beherlerde oda sıcaklığında bir gece bekletilmiş ve plastik falkon tüptelerde, Kotterman Marka sıcak su banyosunda 65-70 C'de suyun içinde 15 ml seviyesine düşünceye kadar buharlaştırılmıştır.

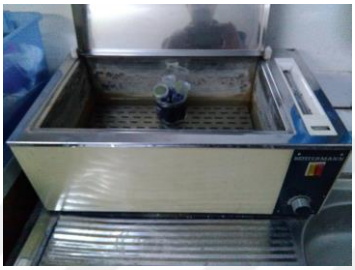


Şekil 3.5 24 saat bekletilmiş ağzı parafinli ekstrakt kapları (Orijinal)

Sprey şeklinde uygulamayı engelleyecek posa ve kalıntılardan arındırmak için 20 ml saf su eklenmesinin ardından whatman no 1 filtre kağıdı ile süzülmüştür. Süzme işlemi tamamlandıktan sonra aşağıdaki verilen oranlarda saf su ile karıştırılarak konsantrasyonlar hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1 Hazırlanan beş farklı konsantrasyonun etken madde saf su oranları

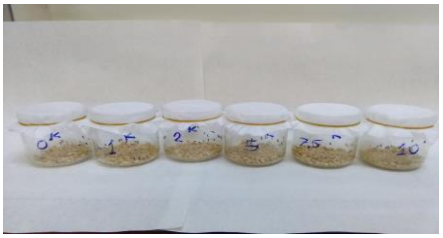
	Ekstrakt (ml)	Saf Su (ml)	Toplam(ml)
1-	1	9	10
2-	2	8	“
3-	5	5	“
4-	7.5	2.5	“
5-	10	0	“



Şekil 3.6 Kotterman marka kazanda metanolü uçurulan ekstraktlar (Orijinal)

Çizelge 3.1’de gösterilen beş ayrı konsantrasyon oranlarında hazırlanan ekstraktlar, hiç kullanılmamış, fabrikasyon ve saf su ile yıkanmış boş parfüm tüplerine konulmuştur. İlk biyolojik tekrarda üçer gün arayla bu üç ayrı ekstraktın, %10, %20, %50, %75 ve %100 olmak üzere beşer ayrı konsantrasyonu; ayrıca (Saf su ve %70 metanol olmak üzere) iki ayrı kontrol grupları olarak toplam on yedi 17 ayrı tüpe konulduktan sonra cam kalemiyle etiketlenmiştir. Çalışma esnasında alınan kararlar sonucu kekik ve nanede üç, maydanozda iki biyolojik tekrara yapılarak gözlemler 75. güne kadar devam edilmiştir.

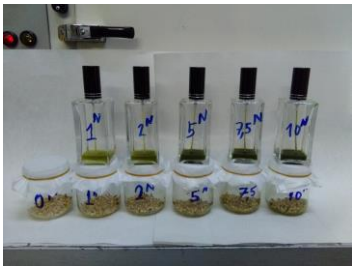
3.1.2.2 Böcek kültürlerinin belirlenmesi ve hazırlanması



Şekil 3.7 Konsantrasyon oranlarına göre hazırlanmış böcek kültürler (Orijinal)

İlk olarak %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında her bir ekstrakt için beşer ayrı deney kültürü planlanmıştır. Ekstrakt hazırlama protokolünde kullanılan distile su uygulanmış kontrol grubu özellikle böceğin ekstrakttaki rutubetten etkilenip etkilenmediği test edilmesi amacıyla oluşturulmuştur. Daha sonra, ayrıca ekstrakt hazırlama protokolü gereği solvent olarak kullanılan metanol uygulanan örnekler ikinci kontrol grupları olarak belirlenmiştir. 10'ar gr tartılarak 125 mg'lık kavanozlara konulan buğdayın üzerine sprey şişelerindeki ekstrakt ve kontrol solüsyonları (saf su ve % 70 metanol) buğdaya ortalama 15'er defa püskürtülerek uygulanmıştır. Kimyasalların uygulanmasında da pülverizasyon denilen bu teknik kullanılmaktadır. Kavanozlar sallanarak, buğdayın solüsyonu emmesi sağlanmış ve yaklaşık bir dakika beklendikten sonra aynı tarih aralığında yetiştirilmiş populasyondan oluşan kültür stoklarından alınan 20'şer adet ergin *S. granarius* içerisine bırakılmıştır. Daha sonra kavanozların ağızları çift kat tülbentle paket lastiği kullanılarak kapatılmıştır. Hazırlanan bu kültür kavanozların üzerine uygulanan ekstraktların yoğunluk oranları yazılmıştır.

3.1.2.3 Uygulama



Şekil 3.8 Konsantrasyon oranlarına göre parfüm şişeleri ve kültürler (Orijinal)

Optimum düzeyde sonuç alabilmek için çalışmanın akışı esnasında yapılan fikir alışverişine göre şekillenen ve birbirini izleyen değişik zamanlarda hazırlanan böcek kültürleri, uygulanan ekstrakt türüne göre gruplanmış, yoğunluklarına göre sıralanarak 24 saat aralıklarla sayımlar sürdürülmüş ve kaydedilmiştir. Sayımlar sonucu tespit edilen ölü böcekler; uygulanan ekstrakt türü, konsantrasyon oranı ve tarihleri not edilerek etiketlenmiş; Real-Time PCR çalışmasında kullanılmak üzere -20 ^{0}C'de derin

dondurucuda beklemeye alınmıştır. Günlük sayım sonuçları laboratuar defterine ve excel tablolarına kaydedilmiştir.

3.1.3 Bulgular ve tartışma (Biyoinsektisit Aşama)

Kimyasal çalışmalarda dahi ancak 7-14. gün aralığında istenen letal etki gözlemleniyor olması (Kljajic ve Peric 2009) ve incelediğimiz birden çok kimyasal çalışmada çok etkili kimyasallarda dahi yaygın olarak 7-14 gün çalışma süresinin temel alınıyor olması nedenleriyle, ilk başta 24, 48 ve 72 saat olarak planlamış olduğumuz çalışmamız birer gün arayla yaklaşık 2,5 ay boyunca sürdürülmüştür. Böylece hem ekstraktların rezidüel etkileri gözlemlenmiş hem de sonuçlar kontrol grubu olan metanol kullanılan farklı örneklerde yaklaşık aynı tarih aralığında (6-10. gün) görülen mortalitenin yanıltıcı etkisinden arındırılmıştır. Tüm çalışma kayıtları önce günlük laboratuvar defterinden excel tabloya aktarılmıştır. Günlük listenin istatistiksel yorumlanması pek mümkün olmaması nedeniyle moleküler aşamadaki çalışma hafta hesabına göre planlanmıştır. Excel tablosundaki ham verilerinden yararlanılarak haftalık kaba mortalite değerlerini veren tablolar düzenlenmiştir. Bunun üzerine arındırılmış letal etki yüzdeleri hesaplanarak aynı şekilde excel tablolara aktarılmış ve bu excel tablolar üzerinden daha anlaşılır olması için grafikler oluşturulmuştur. Son olarak en etkin solüsyonların One-Way ANOVA yöntemiyle değerleri hesaplanarak grafiğe aktarılmıştır. Çalışma değişen parametrelere göre değişik periyotlar da sonlandırılmıştır. Örneğin kekik uygulanan, kısaca aK olarak kodlanan, ilk örneklerde %75 ve %100 konsantrasyonları 17. gün hiçbir canlı örnek kalmaması nedeniyle mecburen bu gruplar mevcut veriler kaydedildikten sonra sonlandırılmıştır. Çalışmamızın son aşamalarında eklenen biyolojik tekrarlarla, 30 kavanoza kadar çıkarılan kültürlerde, petri kabına boşaltılarak yapılan günlük sayımlarda ister istemez oluşan küçük aksaklıklar sonucu canlı sayıları bazen bir iki rakam düşük veya yüksek olduğu görüldüğünde; bu rakamlar aynen not edilmiş olup kesinlikle yuvarlama veya sayıyı tamamlama yoluna gidilmemiştir. Bu nedenle toplam ölü böcek sayısıyla kalan canlı böcek sayılarının arasında bazı farklı sütunlar olmuştur. Ancak bu örneklerde, solüsyon etki değerleri bu fark dikkate alınarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.2 Sadece distile su uygulanan buğdaylarla hazırlanan kontrol gruplarının haftalık mortalite kayıtları

HAFTA	SS1	SS2	SS3	SS4
1.	0	1	1	0
2.	4	0	1	0
3.	3			0
4.				0
5.				1
6.				0
Müteakip Mortalite	1	1	1	0
Kalan Canlı Böcek	(23.Gün)10	(19. Gün) 18	(16. Gün)18	(44. gün) 19
61. Gün Canlı Böcek	-	-	-	60+

Çizelge 3.3 Sadece distile su tatbik dilen buğdaylardan hazırlana kontrol gruplarının haftalık mortalite oranları

Hafta	Ss1	Ss2	Ss3	Ss4
1.	0,00%	5,00%	4,76%	0,00%
2.	20,00%	0,00%	4,76%	0,00%
3.	15,00%			0,00%
4.				0,00%
5.				5,00%
6.				0,00%
Kalan canlı sayısına göre total etki yüzdesi	44,44%	10,00%	14,28%	5,00%

Çizelge 3.2 ve 3.3 incelendiğinde distile suyla hazırlanan örneklerde yüksek bir letal etki gözlenmemiştir. Bu örneklerde metanol kullanılmadığı için etki yüzdelerine ilk hafta sonuçları da eklenmiştir. En son hazırlana Ss4 örneği 6 haftadan daha fazla (44 gün) günlük sayım yapıldığı halde toplam mortalite tüm bu geniş zaman aralığında %5'i geçememiştir. Böylece çalışmamızda ekstraktın dolaylı etkisi olan rutubetin herhangi bir toksik etkisinin olmadığı görülmüştür.

Çizelge 3.4 Sadece %70'lik metanol uygulanan buğdaylarla hazırlanan kontrol gruplarının haftalık ham mortalite kayıtları

Hafta	Met1	Met2	Met3
1.	**6**	**13**	**12**
2.	**0**	**0**	**1**
3.	**0**	**0**	**1**
4.	**0**	**0**	
5.	**0**	**0**	
6.	**0**		
Müteakip Mortalite	**0**	**0**	**1**
Kalan Canlı Böcek	**14**	**6**	**4**
52. Gün Canlı Böcek		**(Üreme kısmen durmuş.)6**	
61. Gün Canlı Böcek	**(Üreme %60 azalmış.)21+**		

Çizelge 3.5 Sadece metanol uygulanan buğdaylarla hazırlanan kontrol gruplarının haftalık etki oranı hesapları

Hafta	Met1	Met2	Met3
1.	**30,00%**	**65,00%**	**60,00%**
2.	**0,00%**	**0,00%**	**5,00%**
3.	**0,00%**	**0,00%**	**5,00%**
4.	**0,00%**	**0,00%**	
5.	**0,00%**	**0,00%**	
6.	**0,00%**		
Kalan canlı sayısına göre total etki yüzdesi	**30%**	**70%**	**78%**

Çizelge 3.4 ve 3.5 incelendiğinde açık bir şekilde metanolun ilk hafta biyoinsektisit etki gösterdiği görülmektedir. Biyoinsektisit etkisinin ilk haftadan sonra görülmemesine rağmen Şekil 3.4'den güçlü olarak üremeyi inhibe edici ve veya yavaşlatıcı etkisinin devam ettiği anlaşılmıştır. Çizelge 3.6 incelendiğinde metanol gruplarında, üç biyolojik tekrarın ikisinde de 2. haftadan sonra biyoinsektisit etkinin kaybolduğu açık olarak görülmektedir. Çünkü Çizelge 3.4'de de anlaşılacağı üzere bu örneklerde halen canlı böcek varlığı devam etmektedir. Ancak diğer örneklerle karşılaştırıldığında üremenin %60 yavaşladığı görülmektedir.

Çizelge 3.6 Sadece metanol uygulanan kontrol gruplarında, birinci hafta sonrası etki oranları

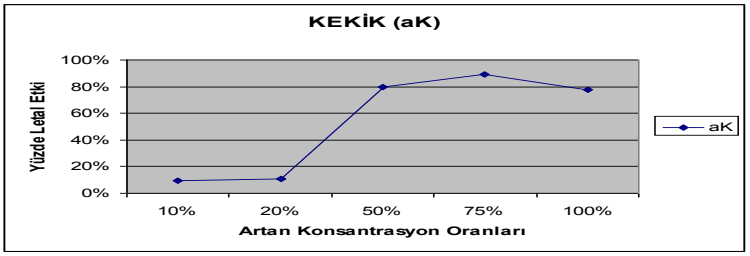
Hafta	Met1	Met2	Met3
1.			
2.	0,00%	0,00%	5,00%
3.	0,00%	0,00%	5,00%
4.	0,00%	0,00%	
5.	0,00%	0,00%	
6.	0,00%		
Kalan canlı sayısına göre total etki yüzdesi	0%	0%	43%

Çizelge 3.7 Kekik ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan birinci biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarına göre kaydedilen haftalık ham mortalite rakamları

Hafta	aK (10)	aK (20)	aK (50)	aK (75)	aK (100)
1.	0	2	5	11	11
2.	1	0	10	8	7
3.	0	2	2	1	2
Müteakip Mortalite	1	0	0	0	0
Kalan Canlı Böcek	19	16	3	0	0

Çizelge 3.8 Kekik ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan birinci biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında birinci hafta metanol etkisinden arındırılmış haftalık etki oranları

Hafta	aK (10)	aK (20)	aK (50)	aK (75)	aK (100)
1.					
2.	5,00%	0,00%	66,66	88,88%	77,77%
3.	0,00%	11,11%	13,33		
Kalan canlı sayısına göre toplam letal etki yüzdesi.					
	9,52%	11,11%	80,00%	88,88%	77,77%



Şekil 3.9 Kekiğin birinci biyolojik tekrarının artan konsantrasyon oranlarına göre etki yüzdeleri grafiği

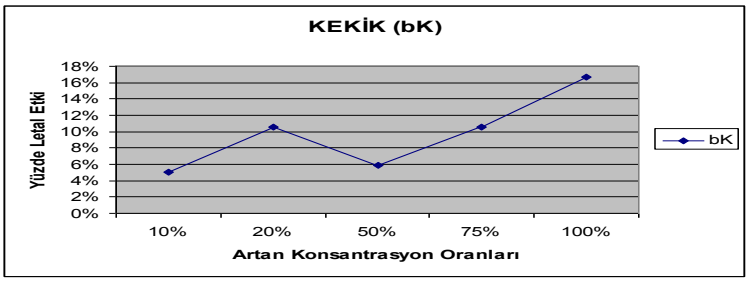
Çizelge 3.7, 3.8, ve Şekil 3.9 incelendiğinde kekik ekstraktında (üstelik çok sayıda mortalite görülen ilk hafta hesaplamalardan çıkarılmasına rağmen) %9,52'den başlayarak doğru orantılı bir şekilde çizgisel olarak artarak ve azalarak %88,88'leri gören bariz güçlü bir biyoinsektisit etki gözlemlenmiştir. Ancak %75 konsantrasyon oranından sonra doz arttırılmasına rağmen mortalite oranının da düşme eğilimi bize optimum konsantrasyon aralığını vermektedir. Bu durum Bell ve Glanville'nin optimum konsantrasyon çalışması ile (1973) uyumludur.

Çizelge 3.9 Kekik ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan ikinci biyolojik tekrarın %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarına göre kaydedilen haftalık ham mortalite sayıları

Hafta	bK (10)	bK (20)	bK (50)	bK (75)	bK (100)
1.	0	1	2	1	1
2.	0	1	0	1	2
3.	1	0	0	0	0
4.	0	0	0	0	0
5.	0	0	1	1	0
6.	0	0	0	0	1
Müteakip Mortalite	0	1	0	0	0
Kalan Canlı Böcek	19	17	16	17	15
61. Gün Canlı Böcek	40+	50+	50+	50+	50+

Çizelge 3.10 Kekik ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan ikinci biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında birinci hafta metanolun yanıltıcı etkisinden arındırılmış) haftalık etki oranları

Hafta	bK 10)	bK (20)	bK (50)	bK (75)	bK (100)
1.					
2.	0,00%	5,26%	0,00%	5,26%	10,52%
3.	5,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
4.	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
5.	0,00%	0,00%	5,55%	5,26%	0,00%
6.	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	10,52%
Kalan canlı sayısına göre toplam letal etki yüzdesi.	5,00%	10,52%	5,88%	10,52%	16,66%



Şekil 3.10 Kekiğin ikinci biyolojik tekrarının artan konsantrasyon oranlarına göre etki yüzdesi grafiği

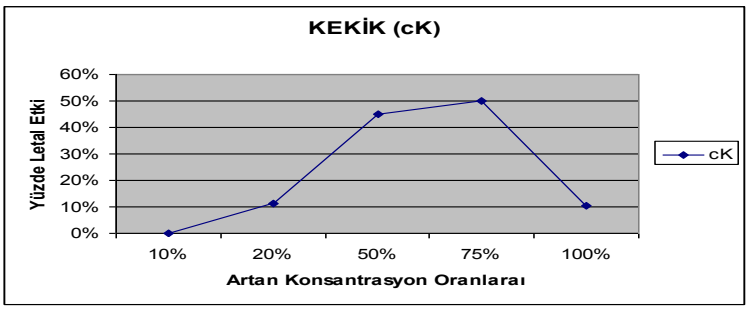
Kekiğin ikinci biyolojik tekrarında zayıfta olsa biyoinsektisit etki gözlemlenmiştir. Ancak görülen mortalite farklarının dikim ve hasat mevsimi değişen bitkilerin farklı oranlarda etken madde içeriyor olmasıyla açıklanabilir (Özel ve Özgüven 2002).

Çizelge 3.11 Kekik ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan üçüncü biyolojik tekrarın %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarına göre kaydedilen haftalık ham mortalite sayıları

Hafta	cK (10)	cK (20)	cK (50)	cK (75)	cK (100)
1.	0	2	0	1	1
2.	0	0	3	6	0
3.	0	1	5	2	0
4.	0	1	1	3	2
5.	0	0	0	0	0
Müteakip Toplam Mortalite	0	0	0	0	0
Kalan Canlı Böcek	20	16	11	8	17

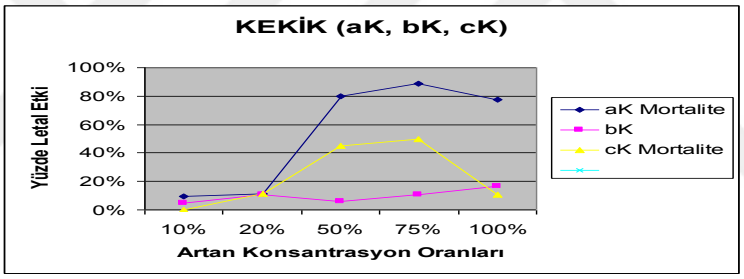
Çizelge 3.12 Kekik ekstraktı uygulanmış üçüncü biyolojik tekrarın birinci hafta metanolun yanıltıcı etkisinden arındırılmış yüzde etki oranları

Hafta	cK (10)	cK (20)	cK (50)	cK (75)	cK (100)
1.					
2.	0,00%	0,00%	0,00%	31,57%	0,00%
3.	0,00%	5,55%	15,00%	10,52%	0,00%
4.	0,00%	5,55%	25,00%	15,78%	10,52%
5.	0,00%	0,00%	5,00%	0,00%	0,00%
Kalan canlı sayısına göre toplam letal etki yüzdesi.	0,00%	11,11%	45,00%	50,00%	10,52%



Şekil 3.11 Kekiğin üçüncü biyolojik tekrarını artan konsantrasyon oranlarına etki yüzdeleri grafiği

Çizelge 3.11, 3.12 ve Şekil 3.11 incelendiğinde kekiğin üçüncü biyolojik tekrarında (cK) %75 konsantrasyona kadar aynı yönde artış eğiliminden sonra Bell ve Granlille'nin de çalışmasına (1973) uyumlu olarak bariz bir şekilde düşüş görülmektedir.



Şekil 3.12 Kekiğin üç biyolojik tekrarının artan konsantrasyon oranlarına göre karşılaştırılmalı olarak etki yüzdeleri grafiği

Kekik ekstraktıyla hazırlanan grupların üçünde de az veya çok biyoinsektisit etkinin gözlemlendiği, birinci biyolojik tekrarın (aK) sonuçlarının sağlıklı ve doğru olduğunu üçüncü biyolojik tekrarın (cK) kanıtladığı, %20 konsantrasyonda her üçünün de aynı derecede etkili olduğu görülmektedir. Ayrıca her üç grupta %50 - %75 bandın yükseliş eğilimi görülmüştür. Üç biyolojik tekrara ek olarak Çizelge 3.13, 3.14 ve Şekil 3.5'de tafsilatı verilen ek iki kontrol grubu daha oluşturulmuştur. Bu gruplar daha net anlaşılması için %100 konsantrasyon oranlarındaki solüsyonlarla hazırlanmıştır. Sonuç olarak kekiğin güçlü biyoinsektisit etkisi bu iki çalışmada da net olarak görülmektedir. Ayrıca bu iki grupta canlı böcek kalmadığından dolayı ekstraktın üreme üzerindeki etkisini gözlemlemek mümkün olmamış ve mevcut veriler kaydedilerek bu gruplar

sonlandırılmıştır.

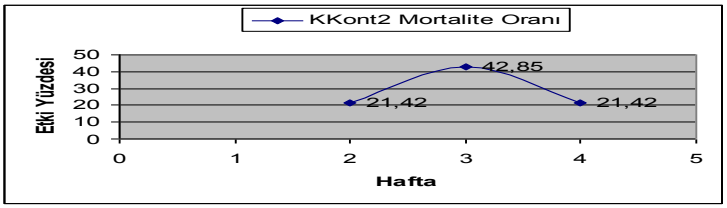
Çizelge 3.13 Kekiğin %100 konsantrasyon oranıyla hazırlanmış iki adet kontrol deneyinin kaydedilen haftalık mortalite sayıları

Hafta	KKont1	KKont2
1.	5	6
2.	11	3
3.		6
4.		3
Müteakip Mortalite	4	1
Kalan Canlı Böcek	0	0

Çizelge 3.14 Kekiğin %100 konsantrasyon oranıyla hazırlanmış iki adet kontrol deneyinin birinci hafta metanolun yanıltıcı etkisinden arındırılarak hesaplanan % etki oranları

Hafta	KKont1	KKont2
1.		
2.	73,33%	21,42%
3.	0,00%	42,85%
4.	0,00%	21.42%
Kalan canlı sayısına göre toplam letal etki yüzdesi.	100,00%	100,00%

Şekil 17'de %100 kekik konsantrasyon ile hazırlanan ve kısaca KKont1, KKont2 olarak kodlanan kontrol gruplarının biyoinsektisit etkisi sonucu 4. haftaya kalmadan her ikisinde de %100 başarıya ulaşılmıştır.



Şekil 3.13 Kekiğin %100 konsantrasyon oranındaki ekstraktıyla hazırlanan kontrol gruplarının, metanolun birinci hafta etkisi çıkartılarak oluşturulan 2, 3 ve 4. hafta eğrisi

Çizelge 3.15 Maydanoz ekstraktı uygulanmış birinci gruptaki örneklerde haftalık mortalite sayım sonuçları

Hafta	aM (10)	aM (20)	aM (50)	aM(75)	aM (100)
1.	1	1	3	0	2
2.	0	0	0	0	0
Müteakip Mortalite	0	0	0	1	0
Kalan Canlı Böcek	19	18	18	19	16

Çizelge 3.16 Maydanoz ekstraktı uygulanmış gruplardan, birinci biyolojik tekrarın metanolun birinci hafta etkisinden arındırılarak hesaplanan % etki oranları

Hafta	aM (10)	aM (20)	aM (50)	aM (75)	aM (100)
1.					
2.	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Kalan canlı sayısına göre total etki yüzdesi	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Çizelge 3.15 ve 3.16 incelendiğinde maydanoz üzerinde yapılan çalışmada ilk biyolojik tekrarda ilk hafta görülen letal etkinin metanoldan kaynaklandığı düşünüldüğünde herhangi bir biyoinsektisit etki görülmemiş olup bu nedenden dolayı maydanoz moleküler çalışmaya da dâhil edilmemiştir.

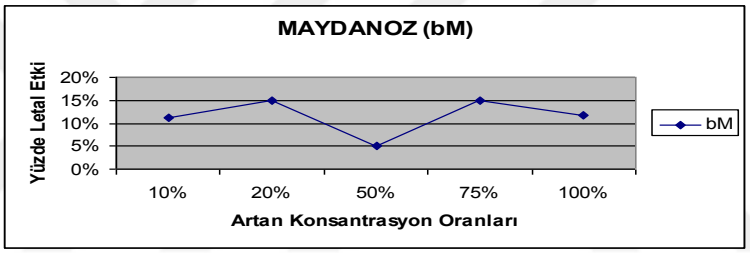
Çizelge 3.17 Maydanoz ekstraktı uygulanmış, ikinci biyolojik tekrar örneklerde kaydedilen haftalık mortalite sayıları

Hafta	bM (10)	bM (20)	aM (50)	aM(75)	aM (100)
1.	0	0	0	0	1
2.	0	0	1	2	1
3.	0	1	0	0	0
4.	0	0	0	1	0
5.	0	1	0	0	1
6.	1	0	0	0	0
Müteakip Mortalite	1	1	0	0	0
Kalan Canlı Böcek	18	17	19	17	17
61. Gün Canlı Böcek	50+	50+	50+	50+	40+

Çizelge 3.18 Maydanoz ekstraktı uygulanmış, İkinci biyolojik tekrar örneklerde metanolun birinci haftadaki tesirinden arındırılmış etki yüzdeleri

Hafta	bM (10)	bM (20)	bM (50)	bM(75)	bM (100)
1.					
2.	0,00%	0,00%	5,00%	10,00%	5,26%
3.	0,00%	5,00%	0,00%	0,00%	0,00%
4.	0,00%	0,00%	0,00%	10,00%	0,00%
5.	0,00%	5,00%	0,00%	0,00%	5,26%
6.	5,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Kalan canlı sayısına göre total etki yüzdesi	11,11%	15,00%	5,00%	15,00%	11,76%

Maydanozun ikinci biyolojik tekrarı Çizelge 3.17 ve 3.18'de 6 haftalık geniş zaman aralığında zayıf ve kısmı bir biyoinsektisit etki gözlemlenmektedir.



Şekil 3.14 Maydanoz ekstraktı uygulanmış ikinci biyolojik tekrar örneklerde metanolun birinci haftadaki tesirinden arındırılmış etki yüzdeleri grafiği

Çizelge 3.19 Maydanozun %100 konsantrasyondaki ekstraktı uygulanmış kontrol gruplarının kaydedilen haftalık mortalite sayıları

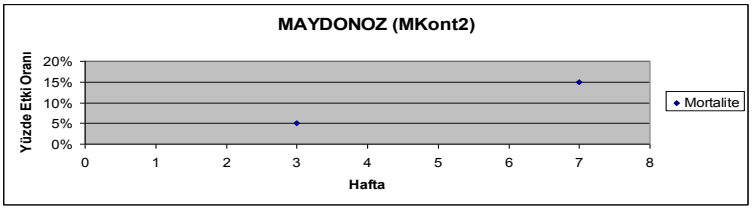
Hafta	MKontr1 100	MKont2 100
1.	0	0
2.	0	0
3.		1
4.		0
5.		0
6.		0
7.		3
8.		0
Müteakip Mortalite	0	0
Kalan Canlı Sayısı	19	17
(55. Gün sonrası sayımlar canlı böcek sayıları.)		
56. Gün Canlı Böcek Sayısı	-	17
57. Gün Canlı Böcek Sayısı	-	19
72. Gün Canlı Böcek	-	60+

Çizelge 3.19'daki MKont1 Çalışma grubu 19. gün sonlandırılmıştır. Bu çizelge incelendiğinde MKont2 grubunda 57. günden sonra (Yumurta bırakılmış buğdaylardan.) yavru bireylerin çıkmaya başladığı görülmektedir.

Çizelge 3.20 Maydanozun %100 konsantrasyondaki ekstraktı uygulanmış kontrol gruplarının metanolun birinci hafta etkisinden arındırılarak hesaplanan % etki oranları

Hafta	MKontr1 100	MKont2 100
1.		
2.	0,00%	0,00%
3.		5,00%
4.		0,00%
5.		0,00%
6.		0,00%
7.		15,00%
8.		0,00%
55. Gün Öncesi Kalan canlı sayısına göre total etki yüzdesi	0,00%	19,04%

Çizelge 3.19 ve 3.20 incelendiğinde maydanoz üzerinde yapılan her iki çalışmada da yeterli biyoinsektisit etki görülmediği için üçüncü biyolojik tekrar yapılmamıştır. Üstelik %100 maydanoz ekstraktlarıyla hazırlanan iki adet (MKont 1-2) kontrol grubu ile zayıf biyoinsektisit etki doğrulanmış. Ayrıca bu nedenle maydanoz moleküler çalışmadan da çıkarılmıştır. Bunun yanında maydanozun ikinci biyolojik tekrarın da tüm dozlarda kısmı bir çizgisel etki görülmektedir.



Şekil 3.15 Maydanozun %100 konsantrasyonlu kontrol gruplarının etkili olduğu hafta dağılımları

Şekil 3.15 ve Çizelge 3.20 incelendiğinde Özellikle zayıf biyoinsektisit etki gözlemlenen maydanoz grupları için hazırlanan %100 konsantrasyonlu üçüncül kontrol gruplarında, örneğin MKont2'de yedi (7) hafta gözlemler devam ettirilmesine rağmen birbiriyle kopuk ve grafikte noktasal olarak ifade edilebilecek mortalite gözlemlenmiş

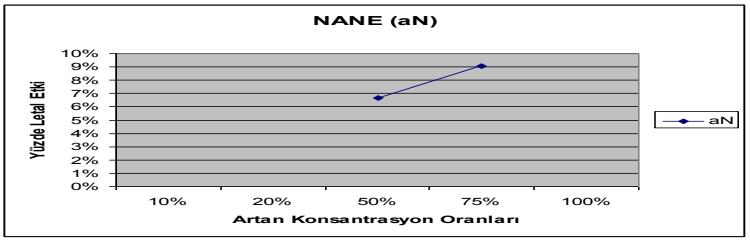
olması nedeniyle bilimsel değerlendirmeye alınmamıştır ve ayrıca söz konusu bitkinin gruplardaki zayıf etkisiyle örtüşmektedir.

Çizelge 3.21 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan birinci biyolojik tekrarın %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarına göre kaydedilen haftalık ham mortalite sayımları

Hafta	**aN (10)**	**aN (20)**	**aN (50)**	**aN (75)**	**aN (100)**
1.	**2**	**5**	**5**	**8**	**9**
2.	**0**	**0**	**1**	**1**	**0**
Müteakip Mortalite	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Kalan Canlı Böcek	**18**	**16**	**14**	**10**	**8**

Çizelge 3.22 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan birinci biyolojik tekrarın %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında birinci hafta metanol etkisinden arındırılmış haftalık etki oranları

Hafta	**aN (10)**	**aN (20)**	**aN (50)**	**aN (75)**	**aN (100)**
1.					
2.	**0,00%**	**0,00%**	**6,66%**	**8,33%**	**0,00%**
Kalan canlı sayısına göre total etki yüzdesi	**0,00%**	**0,00%**	**6,66%**	**9,09%**	**0,00%**



Şekil 3.16 Nane ekstraktıyla hazırlanan ikinci biyolojik tekrarın etkin konsantrasyon aralığı

Grafik 3.21, 3.22 Şekil 3.8 incelendiğinde nane ekstraktı uygulanmış birinci biyolojik tekrarda %50 - %75 konsantrasyon bandında çizgisel tutarlı bir etki olduğu görülmüştür. Üstelik nanenin (aN) grubunun etkin konsantrasyon aralığı kekiğin aK ve cK gruplarıyla da örtüşmektedir.

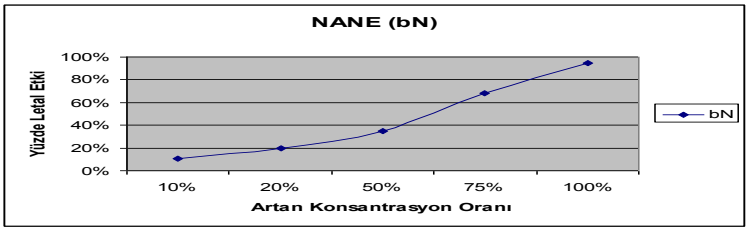
Çizelge 3.23 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan ikinci biyolojik tekrarın %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarına göre kaydedilen haftalık ham mortalite sayımları

Hafta	bN (10)	bN (20)	bN (50)	bN (75)	bN (100)
1.	1	0	0	0	1
2.	0	0	1	2	6
3.	1	3	2	5	9
4.	0	0	4	3	1
5.	1	1	0	2	0
6.	0	0	0	1	1
Müteakip Mortalite	0	0	0	0	0
Kalan Canlı Böcek	17	16	13	6	1
61. Gün Canlı Sayısı	60+	50+	50+	20+	14+

Şekil 3.23 incelendiğinde 75 ve 100'lük konsantrasyonlarda üremenin baskılandığı görülmüştür. Bu iki örnek 28.04.2018 tarihinde başlanılan tüm örneklerde olduğu gibi hiçbir canlı böcek kalmayıncaya kadar muhafaza edilmiştir. Muhafaza edilen bu örnekler son olarak incelendiğinde bu iki örnek ve KKon2 hariç tüm örneklerde sağlam buğday tanesi kalmayıncaya kadar üreme faaliyetinin devam ettiği; bu iki örnekte sağlam buğday taneleri kaldığı halde üreme ve yaşamsal faaliyetin durduğu görülmüştür. KKont2'de ise (Canlı böceğin kalmadığı 29. günden sonra.) 02.05.2019 tarihinde yapılan kontrollerde dahi hiçbir üremeye, dolayısıyla buğday tüketimine rastlanmamıştır. Bu durum Çizelge 3.23'de de kendini göstermektedir. KKont2'deki bu durum 29 gün zaman aralığının stres koşulları altında üreme için yeterli olmamasıyla; % 75 ve 100'lük bN grubundaki durum nanenin üremeyi ve beslenmeyi inhibe edici etkisiyle açıklanabilir.

Çizelge 3.24 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan ikinci biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında birinci hafta metanol etkisinden arındırılmış haftalık etki yüzdeler

Hafata	bN (10)	bN (20)	bN (50)	bN (75)	bN (100)
1.					
2.	0,00%	0,00%	5,00%	10,00%	31,57%
3.	5,26%	15,00%	10,00%	25,00%	47,36%
4.	0,00%	0,00%	20,00%	15,00%	5,26%
5.	5,26%	5,00%	0,00%	10,00%	0,00%
6.	0,00%	0,00%	0,00%	5,00%	5,26%
Kalan canlı sayısına göre total etki yüzdesi	10,52%	20,00%	35,00%	68,42%	94,44%



Şekil 3.17 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan ikinci biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında 1. hafta metanol etkisinden arındırılmış haftalık etki yüzdeler grafiği

Kısaca aN olarak kodlanan birinci biyolojik tekrarla bN olarak kodlanan ikinci biyolojik tekrarın %50 - %70 bandında artan çizgisel letal etkileri paralel görüntü vererek bir birini teyit etmektedir.

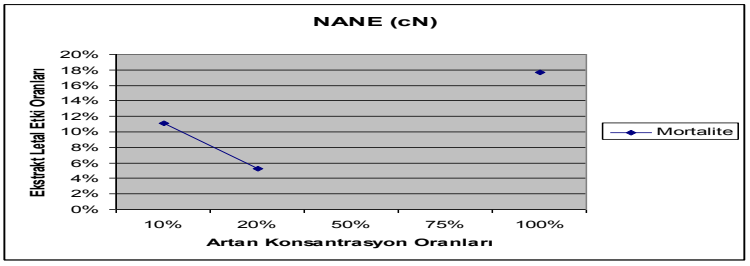
Çizelge 3.25 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan üçüncü biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarına göre kaydedilen haftalık ham mortalite sayımları

Hafata	cN (10)	cN (20)	cN (50)	cN (75)	cN (100)
1.	2	1	0	0	3
2.	1	1	0	0	1
3.	0	0	0	0	1
Müteakip Mortalite	1	0	0	0	1
Kalan Canlı Böcek	16	18	20	20	14

Çizelge 3.26 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan üçüncü biyolojik tekrarın %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında birinci hafta metanol etkisinden arındırılmış haftalık etki yüzdeler

Hafata	cN (10)	cN (20)	cN (50)	cN (75)	cN (100)
1.					
2.	5,55%	5,26%	0,00%	0,00%	5,88%
3.	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,88%
Kalan canlı sayısına göre total etki yüzdesi	11,11%	5,26%	0,00%	0,00%	17,64%

aN ve bN olarak kodlanan gruplarda %50 - % 70 bandının örtüşmüş. Ancak bN grubunda bu bantta bir kopukluk oluşmuştur.



Şekil 3.18 Nane ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan üçüncü biyolojik tekrarın, %10, %20, %50, %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında 1. hafta metanol etkisinden arındırılmış haftalık etki yüzdeleri grafiği

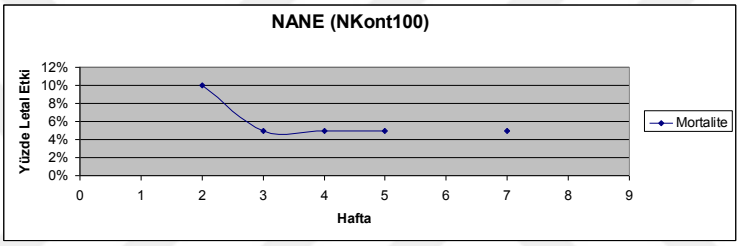
Çizelge 3.27 Nanenin %100 konsantrasyondaki ekstraktı uygulanan buğdaylarla hazırlanan kontrol gruplarının 55. gün öncesi mortalite 55. gün sonrası canlı böcek sayıları

Hafta	**NKont 100**
1.	**0**
2.	**2**
3.	**1**
4.	**1**
5.	**1**
6.	**0**
7.	**1**
8.	**0**
Müteakip Mortalite	**0**
(55. gün sonrası kalan canlı böcek sayım sonuçları.)	
55. Gün Kalan Canlı	**14**
56. Gün Canlı Böcek Sayısı	**15**
57. Gün Canlı Böcek Sayısı	**17**
72. Gün Toplam Canlı Sayısı	**60+**

Çizelge 3.27 incelendiğinde 55. günden sonra (Yumurta bırakılmış buğdaylardan.) yavru böceklerin çıkmaya başladığı görülmektedir.

Çizelge 3.28 Nanenin %100 ekstraktı uygulanan kontrol gruplarını metanolun birinci hafta etkisinden arındırılmış etki yüzde oranları

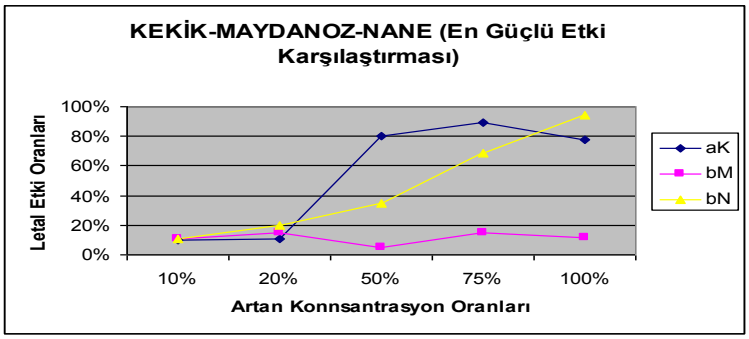
Hafta	NKont 100
1.	
2.	10,00%
3.	5,00%
4.	5,00%
5.	5,00%
6.	0,00%
7.	5,00%
8.	0,00%
Kalan canlı sayısına göre total etki yüzdesi	30,00%



Şekil 3.19 Nane ekstraktı uygulanmış kontrol gruplarının etki etmiş olduğu hafta dağılımları

Çizelge 3.29 En güçlü letal etki görülen ekstrakt gruplarının (aK, bM, bN) karşılaştırılması

Doz	10%	20%	50%	75%	100%
aK	9,52%	11,11%	80,00%	88,88%	77,77%
bM	11,11%	15,00%	5,00%	15,00%	11,76%
bN	10,52%	20,00%	35,00%	68,42%	94,44%



Şekil 3.20 Kekik, maydanoz ve nane ekstraktların en güçlü letal etki göstermiş olduğu çalışma gruplarının (aK, bM, bN) karşılaştırılması

Kısaca farklılaşmanın analizini yapan ANOVA gruplar arası farklılaşmanın grup içi farklılaşmaya oranını tespit etmeye yöneliktir. Çok sayıda grup olduğu durumlarda kullanılır. Çalışmamızda çok sayıda otomatik anova hesaplayıcı görevi yapan internet sayfalarından hesaplamalar için yararlanılmıştır. Farklı grupları karşılaştırmada yapılan One-Way ANOVA hesaplamalarda aşağıdaki değerler bulunmuştur.

1- Bütün grupların en güçlü etki eden birimleri arasında.
(aK, bM, bN) = *p*-value 0.11552
2- En güçlü etki gösteren iki (2) grup (aK, bN) arasında.
(aK, bN) = *p*-value 0.750545
3- Kekik içerisinde benzer eğri sergileyen iki (2) grup arasında.
(aK, cK) = *p*-value 0,177692
4- Zayıf ancak benzer oranlarda etki gösteren iki (2) grup arsında.
(bM, bN) = *p*-value 0,062496

Dördüncü hesaplamada *p* değeri 0,05'e en yakın değer (0,062496) olarak hesaplanmış olsa da $p < 0.05$'e göre "hiçbir sonuç bilimsel olarak anlamlı çıkmamıştır". Bunun üzerine üç (3) tam biyolojik tekrarları yapılan kekik ve nanenin gruplar içerisindeki ortalama değerleri hesaplandıktan sonra (Çizelge 3.30) otomatik One-Way ANOVA hesaplayıcı üzerinde hesaplanmıştır.

Çizelge 3.30 Üç tam biyolojik tekrar yapılan kekik ve nane gruplarının One-Wan ANOVA testine tabi tutulmak üzere hesaplanan avarage değerleri ve *p*-value değeri

aK	9.52%	11.11%	80.00%	88.88%	77.77%
bK	5.00%	10.52%	5.88%	10.52%	16.16%
cK	0.00%	11.11%	45.00%	50.00%	10.52%
Avarege (K)	4.84%	10.91%	43.62%	49.80%	34.81%
aN	00.00%	00.00%	06.66%	09.09%	00.00%
bN	10.52%	20.00%	35.00%	68.42%	94.44%
cN	11.11%	05.26%	00.00%	00.00%	17.64%
Avarage (N)	07.21%	08.42%	13.88%	25.83%	37.36%

5- Kekik Ortalama – Nane Ortalam
f-ratio value = 0,93468 *p*-value 0,93468 = (*p> 0.05)*

Sonuç olarak ANOVA kapsamında değerlendirildiğinde (5. hesaplamada yapılan

ortalam değerler dâhil.) hiçbir sonuç $p< 0.05$ kriterine göre bilimsel olarak anlamlı çıkmamıştır.

3.2 Çalışmanın Real-Time PCR Aşamasının Materyal ve Yöntemi

Daha önceden Rapid-PCR yöntemi düşünülen çalışmamızda bu yöntemle genetik bir sonuca ulaşmanın zorluğu ve söz konusu bu metodun bilimsel çalışmalarda da çokça tercih edilmiyor olması nedenleriyle en güncel ve revaçta yöntem olan Real-Time PCR yönteminde karar kılınmıştır. Real-Time PCR yöntemi izole edildikten sonra sentezlenerek çoğaltılan genetik materyali spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmesi mantığına dayanmaktadır. İzole edilen mRNA kalıbından revers transkriptaz kullanılarak cDNA sentezlenmektedir. Total mRNA izolasyonu manüel olarak, saflık değerlerinin ölçümü NanoDrop ND-1000 spectrometer cihazı vasıtasıyla, cDNA'nın çoğaltılması ve spektrofotometrik ölçümler ROCHE marka Light Cycler Nano Real Time PCR cihazı vasıtasıyla hazır kit kullanımı ve cihazın kendi protokolünün tamamen otomatik olarak çalıştırılmasıyla yapılmıştır. Söz konusu çalışma Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prof. Dr. Sümer ARAS'ın Laboratuvarında Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI gözetiminde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 Materyal

Biyoinsektisit çalışmamız sonucu çok zayıf etkisini görmüş olduğumuz *Petroselinum sp.* uygulanan örnekler moleküler çalışmaya dâhil edilmemiştir. Sırasıyla güçlü letal etki gösteren *Thymus* ve *Mentha* ekstraktı uygulanan kültürlerden 4. hafta ölen böceklerden alınan örneklerin artan doz oranlarına göre çalışması kararlaştırılmış. Ancak nanenin %10 ve %20'lik konsantrasyon uygulanan kültürlerde dördüncü hafta örnek çıkmaması nedeniyle 3. haftada bu çalışmaya dahil edilmek mecburiyetinde kalınmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılan metanol uygulanan böcek kültürlerinden zaten neredeyse sadece ilk hafta mortalite gözlemleniyor olması nedeniyle bu zaman aralığında ölen örnekler kullanılmıştır. Real-Time PCR için dizayn edilen primerler ve gerekli sarf malzemeler kabul edilen 18L0430013 nolu BAP Projemiz kapsamında

Ankara Üniversitesi Satın Alma Birimi tarafından serbest piyasadan ihale usulüyle temin edilerek bize teslim edilmiştir.

3.2.1.1 Primer dizaynı

Çalışmamızda Target gen olarak kullanılan sitokrom oksidaz 1 (COI) geni ve Housekeeping gen olarak kullanılan gliseraldehit 3 fosfat genlere ait diziler www.ncbi.nlm.nih.gov (NCBI) ücretsiz biyoteknolojik bilgi merkezinden bölgeye özgü primerler dizayn edilebilmektedir. Housekeeping gen araştırmada normalizasyon işleminde kullanılmak üzere, eksprasyon seviyesi genelde bilinen ekstrakt tatbik edilmemiş kontrol grubunda (Saf su uygulanmış örneklerde.) ifade düzeyi normal olan değişiklik göstermeyen geni ifade eder. Ekstrak uygulanmış böceklerdeki ifade düzeyine bakılan Target (hedef) genin primerleri –asıl çalışmamız olduğumuz organizma- *Sitophilus granarius'a* aittir. Ancak Housekeeping gen veri bankasında bulunmaması nedeniyle *S. granarius'*un filogenetik olarak yakın akrabası (Manueke vd. 2015 – Obrepalska-Steplowska vd. 2008) olan *S. oryzae*'nin gen bölgesine aittir. Bu gen kontrol grubu olarak kullanılmakta ve değeri bir sayılmaktadır. Target gen ise çalışmamızdan etkileneceği düşünülen hedef ve veya forward/ileri gen olup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ifadesinde azalma veya çoğalma beklediğimiz geni ifade etmektedir. Bu genle ilgili primerlerin işaretli bölge dizileri Target geninkiler Çizelge 3.31'de Housekeeping gen dizileri de Çizelge 3.32'de verilmiştir.

Çizelge 3.31 Target gen bölgeleri için seçilen ve işaretlenen primer dizileri

Sitophilus granarius cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial
GenBank: DQ453486.1
GenBank Graphics

GAGCCCCAGATATAGCCTTCCCACGGTTAAACAATATGAGATTCTGACTACTTCCCCCATCTTTAA
TTCTTCTATTAATAAGAAGATTTATTGAAAAAGGTGCTGGAACAGGGTGAACAGTTTACCCACCT
CTATCATCCAATATTGCCCATGAAGGAGCTTCTGTAGATCTAGCAATCTTTAGATTACATATAGCA
GGAATTTCATCTATCCTTGGAGCAATTAATTTTATTACTACAGCATATAATATACGACCCTCAGGT
ATATTATCAGATCGAATAACTCTATTTATTTGAGCTGTTAGAATCACAGCTATTCTACTTCTACTA
AGACTTCCTGTCTTAGCTAGAGCAATTACTATACTTCTTACTGATCGAAATATCAATACTTCATTTT
TTGACCCTGCGGGAGGAGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTCTGATTCTTTGGTCACCCAG
AAGTTTATATCTTAATTTTACCAGGATTTGGAATAATCTCCCATATTATTAGTTATGAAAGAGGGA
AAAAAGAAGCTTTTGGAGTACTAGGAATAATTTATGCAATAATCGCTATTGGTTTACTAGGATTC
GTAGTATGAGCCCATCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACACTCGAGCTTACTTTACATCA
GCTACTATAATCATTGCTGTCCCAACAGGAATTAAAATCTTCAGTTGACTAGCAACTTTCCATGGA
GCTCGAATTACTTACACTCCAGCATCCCTTTGATCCTTAGGATTTATCTTCCTATTTACTATTGGAG
GACTAACCGGAG

F: GCCTTCCCACGGTTAAACAA
R: ACCCTGTTCCAGCACCTTTT
AAAAGGTGCTGGAACAGGGT

F: TGCTGTCCCAACAGGAA
R: CCGGTTAGTCCTCCAATAGT
ACTATTGGAGGACTAACCGG

F: GCCCCAGATATAGCCTTCCC
R: ACCCTGTTCCAGCACCTTTT
AAAAGGTGCTGGAACAGGGT

* *F: Forward(İleri); R: Reverse(Geri).*

Çizelge 3.32 Housekeeping gen bölgeleri için seçilen ve işaretlenen primer dizileri

Sitophilus oryzae glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAP mRNA, partial cds
GenBank: KX353928.1
GenBank Graphics

AAAAAACTGTAGACGGGCCATCTGGAAAGCTGTGGCGTGACGGGCGCGGAGCTGCGCAGAATAT
CATTCCGGCTTCAACAGGAGCAGCCAAGGCCGTCGGAAAAGTTATTCCATCGTTACAAGGAAAAT
TGACGGGCATGGCCTTCAGAGTACCAGTACCAAATGTGTCCGTAGTTGATTTAACTTGTCGATTGGG
AAAAGCAGCATCTATGGATGAAATTAAAAAGAAAATTAAAGAAGCTAGTCTGAATGAATTTAAA
GGAATTATGGGATATACTGAAGAACAAGTAGTTTCTTCAGATATGAATGATGATCCCAGAAGCTG
CATTTTTGATGCCGGCGCCTGCATATCCCTTAATGACAACTTTGTGAAATTGATTGCATGGTATGA
TAACGAATTTGGATATTCTAATAGAGTACTTGATTTAATTAATTATATTCATTCAAAAAAATAA

F: GGAGCTGCGCAGAATATC
R: CGGACACATTTGGTACTGG
CCAGTACCAAATGTGTCCG

F: GGAGCTGCGCAGAATATC
R: TGGTACTGGTACTCTGAAGG
CCTTCAGAGTACCAGTACCA

F: GTACCAAATGTGTCCGTAGT
R: GCTTCTGGGATCATCATTCA
TGAATGATGATCCCAGAAGC

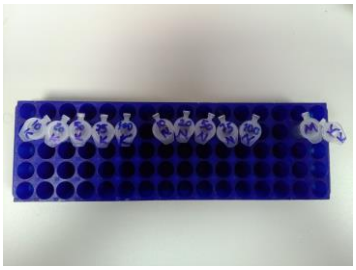
* *F: Forward(İleri); R: Reverse(Geri).*

3.2.1.2 Faz ve reaksiyon sayısı planı

2. ve 4. hafta kekik ve nanenin %10, %20, %50, %75 ve %100'luk dozları olmak üzere on faz bir kontrol grubu olarak 11 faza ek olarak (İlk birinci haftadaki mortalitelerin metanolden kaynaklandığı anlaşılmış olması nedeniyle.) 12. faz olarak metanolun ilk haftası çalışılmıştır. Toplam 12 örnek seçilmiştir. Her bir örnek üç teknik tekrara tabi tutulduğu için toplam 12 x 3 = 36 reaksiyon çalışılmıştır. Bir başka deyişle 12 cDNA = DNA dolayısıyla 11 Target, 1 Housekeepin toplam 12 gen, üçer faz çalışıldığı için 12 X 3 = 36 reaksiyon çalışılmıştır. Deneyin biyoinsektisit aşamasından sonra -20 ^{0}C'de muhafaza altına alınan örnekler ekstrakt tatbik edilenlerin 3 - 4. haftası ve %10, %20, %50, %75 ve %100 oranlarına soğuk zinciri bozmaksızın tasnif edilmiştir. Ekstraktın hazırlanmasında çözücü olarak kullanılan metanol uygulanmış örneklerden etkisinin ilk hafta görülmesi nedeniyle 0-7 gün zaman aralığında ölenler alınarak kontrol grubuna dâhil edilmiştir. Saf su uygulanmış örnekler ikinci kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Bu örnekteki böcekler 61. günkü kontrollerde halen canlı kalan ancak sağlam buğday taneleri bittiğinde ölen örneklerden alınmıştır.

3.2.2 Yöntem

3.2.2.1 Total RNA ekstraksiyon



Şekil 3.21 On iki (12) adet genetik materyalı izole edilmiş böcek kültürlerine ait eppendorf tüpleri (Orijinal)

Total RNA İzolasyonu Dr Ekrem BÖLÜKBAŞI tarafından optimize edilmiş Trizol (TRIGent) protokolü baz alınarak yapılmıştır.

- İzolasyon işlemi başlamadan önce (-20 ^{0}C muhafaza edilen örnekler) örnekler -80 C dolaba alınarak burada 10-15 dk bekletilmiş;
- Daha sonra mekanik karıştırıca 10-15 dk karıştırılarak berrak kıvama gelmesi beklenen (sıvı azot içeren) buffer solüsyonu içerisinde havan yardımıyla ezilmiş;
- Üzeri etiketli 2 ml eppendorf tüplerine sırasıyla aktarılmıştır.
- Üzerlerine 1ml TRİZOL Reagent solüsyon eklenmiştir.
- Hücre çeperinin daha iyi dağılıp genetik materyalin ortaya tamamen çıkması için Chlereform eklenerek birkaç saniye vorteksde çalkalanmıştır.
- 45 dk orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.
- 14000 rpm devirde 15 dk sanrifüje edildikten sonra alttaki tortuya temas etmeksizin üstte bulut şeklinde kümelenen genetik materyal her defasında tek kullanımlık başlıkları değiştirilen otomatik pipet yardımıyla farklı temiz eppendorf tüplerine aktarılmış;
- Üzerlerine 0,5 ml izopropil alkol eklenmiştir.
- Alkol eklendikten sonra (genetik materyale zarar vermeksizin hafifce) alt üst yapılan 15 dk 14000 rpm, 5 ^{0}C devirde tekrar sanrifüje edilen örneklerde miselyum şeklinde genetik materyal (pellet) kısmen ayırt edilebilmeye başlanmıştır.



Şekil 3.22 14000 devir, 5 0C'de çalışan santrifüj (orijinal)

NanoDrop ND-1000 Spectrometer cihazı ile saflık değerleri ölçülmek ve sonra sekizlik striplere dizilen örnekler RT-PCR reaksiyonu için hazır kit kullanılan ROCHE marka Light Cycler Nano Real Time PCR cihazına otomatik kendi protokolüne uygun olarak üç teknik tekrar yapması için yüklenmek üzere;

- 4 ^{o}C'de beş (5) saat genetik materyalin sedimante ve inkübe olması için bırakılmıştır.



Şekil 3.23 NanoDrop ND-1000 Spectrometer (Orijinal)



Şekil 3.24 ROCHE marka Light Cycler Nano Real Time PCR cihazı (Orijinal)

Çizelge 3.33 Real-Time PCR reaksiyonu komponentleri

Bileşenler	**Son Konsantrasyon**
cDNA	2 µg
İleri (Forward)	10 µM
Geri (Revers)	10 µM
SYBR Green Master Mix	1X
Toplam hacim 20 µl	

Çizelge 3.34 Real-Time PCR döngüsü protokolü

PRİMER	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü Sayısı**
Denatürasyon	95 ^{0}C	7 dk	1
Denatürasyon	95 ^{0}C	10 s	
Bağlanma	58-60 ^{0}C	30 s	40
Erime Eğrisi Analizi	58-95 ^{0}C	Okuma	1

Son olarak edinilen veriler ışığında değerlendirilme yapılmıştır.

3.2.2.2 cDNA'nın saflık değerleri

Elimizdeki cDNA'nın saflık değerlerinin ölçüm yapıldığı cihaz NanoDrop ND-1000 olup değerler ayrıca agoroz jelde yürütülmesine gerektirmeyecek düzeydedir. Ek olarak RNA materyalinin bantlarda net görüntü verme ihtimalide zayıftır. Saflık değeri 1.80 - 2.00 arası yüksek kabul edilmektedir.

Çizelge 3.35 NanoDrop ND-1000 spectrometer, cDNA saflık değerleri

	Ekstrakt Uygulaması	**260/280**	**ng/µL**
Kontrol-a	Kekik	1,81	1496,39
Kontrol-b	Kekik	1,82	1552,08
%10-a	Kekik	1,81	1533,65
%10-b	Kekik	1,82	1500,08
%20-a	Kekik	1,82	1532,22
%20-b	Kekik	1,83	1525,22
%50-a	Kekik	1,82	1496,39
%50-b	Kekik	1,82	1525,13
%75-a	Kekik	1,83	1468,29
%75-b	Kekik	1,82	1480,56
%100-a	Kekik	1,82	1523,96
%100-b	Kekik	1,82	1533,65
Kontrol-a	Nane	1,81	1496,39
Kontrol-b	Nane	1,82	1552,08
%10-a	Nane	1,82	1512,98
%10-b	Nane	1,84	1536,17
%20-a	Nane	1,82	1504,58
%20-b	Nane	1,82	1547,56
%50-a	Nane	1,85	1538,29
%50-b	Nane	1,82	1573,99
%75-a	Nane	1,85	1512,98
%75-b	Nane	1,82	1536,17
%100-a	Nane	1,82	1536,17
%100-b	Nane	1,84	1573,99
Metanol-a	-	1,80	1245,78
Metanol-b	-	1,79	1524,05

3.2.2.3 (RT PCR Aşama) Bulgular ve sonuçların normalizasyonu

Grupların CT değerleri her bir örneğe ait transkript profilleri kontrol grubunda bakılan Housekeeping gen gliseraldehit 3-fosfat primerlerinin sonuçlarıyla karşılaştırılarak

yorumlanmıştır. Ham değerlerin Ortalama; Standar Sapma ve Standart Hata değerlileri 3.37'de verilmiştir. Bir kontrol grubu birden çok grupla karşılaştırılması gerektiğinde One-Way ANOVA (Dunnett) yöntemi önerilmektedir (Dunnet 1955)

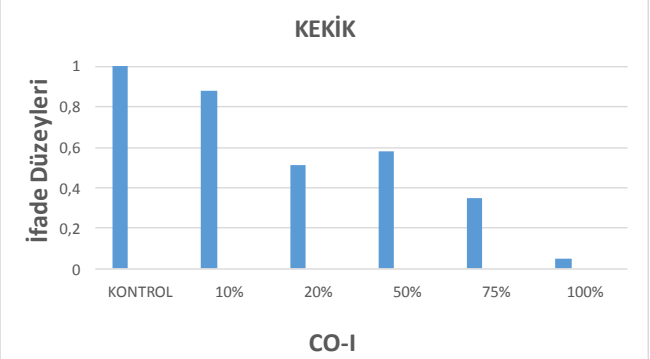
Çizelge 3.36 Kekik ve nane ektraktı ve metanol uygulanmış örneklere ait normalize edilmiş CO-I geninin ekspresyon verileri

	Konsantrasyon	***CO-I***		
KEKİK	%10	0,087899575	0,259354984	0,321078952
	%20	0,056838016	0,07705327	0,255607133
	%50	0,102308648	0,101180277	0,230525779
	%75	0,086030975	0,072594296	0,092782723
	%100	0,009813612	0,014239083	0,01060582
	Konsantrasyon	***CO-I***		
NANE	%10	0,613867842	1,164733586	0,388234438
	%20	0,601651513	0,568802614	1,2397077
	%50	0,470087101	0,498270131	1,135242102
	%75	0,333555792	0,163458919	0,157672176
	%100	0,079000194	0,023963792	0,01979116
METANOL		0,353063601	0,352818961	0,541112322

Çizelge 3.37 Kekik ve nane ektraktı ve metanol uygulanmış örneklere ait CO-I geninin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

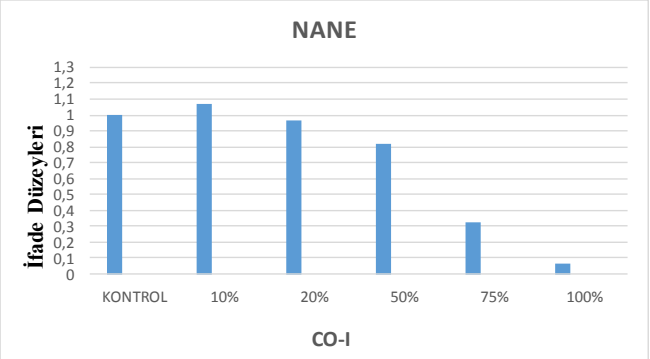
	Konsantrasyon	**Ortalama**	**Standart Hata**	**Standart Sapma**
KEKİK	Kontrol	1	-	-
	%10	0,88365	0,24336	0,42151
	%20	0,51231	0,22778	0,39453
	%50	0,58307	0,14629	0,25338
	%75	0,34634	0,03275	0,05673
	%100	0,04740	0,00476	0,00825
	Konsantrasyon	**Ortalama**	**Standart Hata**	**Standart Sapma**
NANE	Kontrol	1	-	-
	%10	1,06883	0,43762	0,75798
	%20	0,96235	0,07140	0,12366
	%50	0,82017	0,02761	0,04781
	%75	0,32648	0,14821	0,25671
	%100	0,06547	0,04029	0,06978
METANOL		0,52913	0,07333	0,12700

3.2.3 Bulgular ve tartışma (RT-PCR Aşama)



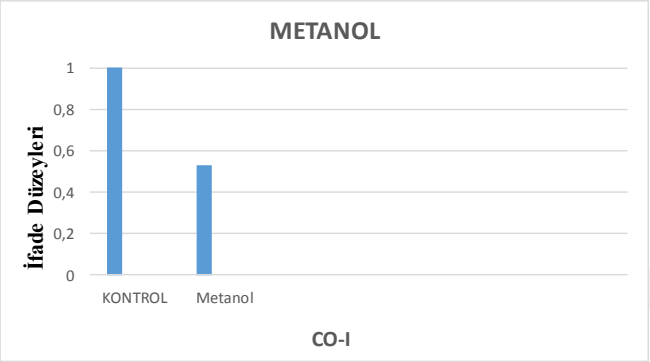
Şekil 3.25 Saf su uygulanmış kontrol grubunun Housekeeping geni (Glyceraldehyde-3-phosphate GAP) geni ifade düzeyine oranla kekik uygulanmış örneklerin konsantrasyon oranlarına bağlı olarak Target gen (Cytochrome oxidase 1 CO1) gen ifade düzeyleri

Şekil 3.25 İncelendiğinde kontrol grubunun geni ifade düzeyine oranla kekik uygulanmış örneklerin konsantrasyon oranlarına bağlı olarak mRNA gen ifade düzeylerinin düştüğü görülmektedir. %50 konsantrasyondaki kısmı yükselmenin bu gruptaki böceklerde veya bu dozda herhangi bir savunma mekanizmasının devreye girmiş olabileceği olarak yorumlanmıştır.



Şekil 3.26 Saf su uygulanmış kontrol grubunun Housekeeping geni (Glyceraldehyde-3-phosphate GAP) geni ifade düzeyine oranla nane uygulanmış örneklerin konsantrasyon oranlarına bağlı olarak Target gen (Cytochrome oxidase 1 CO1) gen ifade düzeyleri

Şekil 3.14 incelendiğinde kontrol grubuna oranla nane uygulanan örneklerin -konsantrasyon oranına bağlı olarak- Target genlere ait mRNA ifade düzeyinin %10'luk konsantrasyonda arttığı diğer konsantrasyon oranlarında doz arttıkça ifade düzeyinin düşüş gösterdiği görülmektedir.



Şekil 3.27 Saf su uygulanmış kontrol grubunun Housekeeping geni (Glyceraldehyde-3-phosphate GAP) geni ifade düzeyine oranla metanol uygulanmış örneklerin konsantrasyon oranlarına bağlı olarak Target gen (Cytochrome oxidase 1 CO1) gen ifade düzeyleri

Şekil 3.15 incelendiğinde kontrol grubu Housekeeping gen ifade düzeyine oranla metanol uygulanmış örneklerin Target gen ifade düzeyinin anlaşılır şekilde düştüğü açık olarak görülmektedir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Genel anlamda tüm ekstraktların az veya çok biyoinsektisit etkisi olduğu görülmüştür. En güçlü etkinin *Thymus sp*.'de en zayıf etkinin *Petroselinum sp.*'de gözlemlenmiştir. Örneğin kekik tatbik edilen, kısaca aK olarak kodlanan, ilk örneklerde %75 ve %100 konsantrasyonları 17. gün hiçbir canlı örnek kalmamıştır. Bunun aksine *Petroselinum*'da görülen zayıf letal etkiden dolayı maydanoz moleküler çalışmaya dâhil edilmemiştir.

Kısaca SSn olarak kodlanan distile su uygulanan örneklerde birinci tekrardaki mortalite sayısının (Ss1'in 2. hafta 4 mortalitesi.) değişik olması özellikle nane ve kekikte de hissedilen 11-12-13/04/2018 tarihindeki yüksek letal etki farklı bir parametreden etkilendiği düşünülerek sonradan (Ss2, Ss3, Ss4 olarak kodlanan) kontrollerde eklenerek toplam dört biyolojik tekrar yapılmıştır. Ancak saf su uygulanan bu örneklerle ilgili çizelge 3.2 ve 3.3 incelendiğinde örneğin altı haftadan daha uzun süre (44 gün) takip edilen bu kontrol grubu Ss4'de bu uzun zaman aralığında ancak %5 mortalite görülmüştür. Saf su uygulanan kontrol grupları değerlendirildiğinde uygulamış olduğumuz ekstraktın nemlendirici etkisinin toksik olmadığını kanıtlamıştır. Hatta saf su uygulanan Ss4'te günlük kontrolün bittiği tarihten sonrada, 61. gün son kontrolünde böcek üremesinin gerçekleştiği ve 40 kadar yavru böcekle toplam canlı böcek sayısının yaklaşık 60'ın üzerine çıktığı görülmüş ve not edilmiş böylece üreme konusunda da bir sıkıntı olmadığı anlaşılmıştır.

Metanolde ilk hafta kuvvetli biyoinsektisit etkinin yanı sıra 55 gün üzeri yapılan kontrollerinde üremeyi kısmen inhibe edici etkisi görülmüştür. Ancak Çizelge 3.4 ve 3.5 incelendiğinde ilk haftadan sonra letal etkisi ortadan kalktığı anlaşılmaktadır. Kaynaklarda 30-45 gün olarak belirtilen *Sitophilus granarius*'un üreme döngüsünün 44 gün sürdürülen (Ss1, Met1, bK %10, %20, %50, %75 ve %100, bM %10, %20, %50, %75 ve %100) gruplarında üreme gözlemlenememiştir. Ancak 57. güne kadar günlük sayımları yapılan Mkont2 (Şekil 3.19), NKont (Şekil 3.27) gruplarında 55. günden sonra yavru bireylerin ortaya çıkmaya başladığı görülmüştür. Bu sonuçlar Karakaş'ın

(2016) çeşitli bitkilerin böceğin verimli üzerindeki etkisin araştırıldığı çalışmasını da desteklemektedir. Bu hususla ilgili olarak (Çalışmamızın asıl amacı üremenin üzerindeki etkiler olmadığı için.) 44. gün günlük sayımları sonlandırılan (İçerisinde bitki özütü olmayan.) Ss4 kontrol grubunda da diğer 44 günlük birimlere uyumlu olarak halen hiçbir üreme görülmemiştir (Şekil 3.2). Böylece ilk 44 günde henüz üreme döngüsünün tamamlanmadığı anlaşılmıştır. Kısaca aK olarak kodlanan ekstrakta özellikle %50 – %75 bandında yükselen biyoinsektisit etkinin bu doz üzerinde düşüş göstermeye başladığı üçüncü biyolojik tekrar (cK) grubunda aynı şekilde tekrarlanmış ve doğruluğu kanıtlanmıştır. Bu durum optimum Konsantrasyon-Zaman (CT) analizi ile ilgili çalışmalarla da uyuşmaktadır (Bell ve Glanville 1973).

Kekik uygulanan ikinci biyolojik tekrarla ilgili Çizelge 3.9, 3.10 ve Şekil 3.10 incelendiğinde, ekstraktlar arsında bariz etki farkı ortaya konmuştur. Ancak aynı ekstrakta -husus en *Thymus sp*.'de görülen- gruplar arası mortalite farklarının dikim ve hasat mevsimi değişen bitkilerin farklı oranlarda etken madde içeriyor olmasıyla açıklanabilir. Özel ve Özgüven'in (2002) yaptığı çalışmada bitkilerin yüksek etken madde içerdiği dönemi sonbahar olarak açıklanmıştır. *Thymus sp.* İçerisinde en güçlü insektisit etki Aralık 2017 tarihinde piyasadan temin edilen bitkiden elde edilen ekstrakta, en zayıf etki Şubat 2018 tarihinde temin edilen bitki ekstraktında görülmüştür, bu iki ekstraktın karışımından elde edilen üçüncü (cK) ekstrakta ortalama bir etki ile birinci biyolojik tekrarın sonuçlarının doğru hesaplandığını kanıtlamakla birlikte hasat mevsimi ile ilgili çalışmalarla uyuşmaktadır. Çalışmamızda üç biyolojik tekrar yapılmasının nedenlerinden biri de bu etki farklarının açıklığa kavuşturulmak istenmesidir. Ayrıca güz dönemine yakın hasat edilen ve diğer gruplara göre zayıf biyoinsektisit etki gösteren bK grubundaki (ikinci biyolojik tekrar) ekstraktın etkisinin doz arttıkça arttığı görülmektedir.

28.04.2018 tarihinde çalışılmaya başlanan tüm örnekler çalışma sonrası muhafaza edilmiş olup Nisan 2019'da yapılan kontrollerde sağlam buğday tanesinin tükenmesine müteakip bütün örneklerde canlı hiçbir böceğin kalmadığı görülmüştür. Canlı böcek kalmayan örneklerin -%100 ekstrakt uygulanan - KKont2 haricinde üreme olmuştur. *S. granarius*'un ergin bireyleri yumurtalarını sağlam buğday tanelerine yerleştirip

ağızlarını salgılarıyla kapatarak üremektedir. KKont2'de zaten ilk 29 gün içerisinde canlı böcek kalmamıştır. Üreme olmayışı bu nedenle açıklanabilir. Üstelik bu grupta yaklaşık tüm buğday tanelerinin sağlam kaldığı görülmüştür. Bu grubun dışında bN %75 ve bN %100 kısmen diğerlerinde ise tamamen sağlam buğday taneleri içi oyulmak suretiyle tüketildikten sonra yaşamsal faaliyetlerin son bulduğu görülmüştür. Ancak bN %75 ve %100'de yavaşlayarak devam eden üreme sağlam buğday taneleri tamamen bitmeden durmuş olduğu görülmüştür. Bu nedenle nanenin sindirim ve özellikle üreme metabolizması üzerinde de etkileri başka bir çalışma konusu olabilir. Ancak hiç üreme görülmeyen KKont2 örneğinde canlı böceklerin kültür ortamında ancak 29 gün kalmış olması stres altı koşullarda bu zaman aralığının üreme faaliyeti için yeterli olmadığı anlamına gelebilir. Kaynaklarda 30-45 gün olarak belirtilen üreme döngüsünün aksine nane grubunda bN %75 ve %100 grubunda sağlam buğdaylar tükenmeden üreme faaliyetinin durması; Mkont2, NKont gruplarında ancak 55. günden sonra yavru bireylerin ortaya çıkmaya başlaması ve 44. güne kadar takip edilen örneklerde henüz bir üreme faaliyetinin gözlemlenmemiş olması Karakaş'ın (2016) yapmış olduğu çeşitli bitkilerin *S. granarius*'un verimliliği üzerindeki etkisi konulu çalışmasını da desteklenmektedir. Ancak 44 gün günlük gözlemleri devam ettirilen saf su uygulanan Ss4 grubunda "bu zaman aralığında" henüz bir üreme faaliyetinin görülmemesi de incelenmesi gereken bir konudur. Tüm bu açıklamalar ışığında metanol ile ilgili eklememiz gereken ikinci konu şudur ki; Sonlandırılmadığı için 52. ve 61. gün sayımları yapılan metanol gruplarında 52. günde henüz hiçbir üreme görülmemesi 61. günde sayımları yapılan diğer örnekler göre üremesinin yaklaşık %60 baskılandığı görülmüş olup metanolun biyoinsektisit etkisinin yanı sıra kısmen üremeyi inhibe edici etkisinden de söz edilebilir. Çünkü 2019 yılına kadar takip edilen KKont2, bN %75 ve %100'ün dışında Met3'de dahil olmak üzere sağlam buğday tanesi kalmayıncaya kadar üreme ve yaşamsal faaliyetlerin devam ettiği bu aşamadan sonra canlı böceğin kalmadığı görülmüştür. Kekikten sonra en güçlü biyoinsektisit etki görülen nanenin özellikle %75 ve %100 konsantrasyon oranlarında sırasıyla %68,42 ve %94,44 güçlü letal etkisinin yanı sıra %33–%23 üremenin yavaşladığı görülmüştür.

Çalışmış olduğumuz bitki ekstraktlarının tamamının birinci hafta etkili olduğu ancak söz konusu bu etkinin daha tamamen uçmamış metanolden kaynaklanıyor olabileceği

ihtimaline istinaden %70'lik saf metanol uygulanan örnekler (Met1, Met2, Met3) üç biyolojik tekrar yapıldığında metanolun gerçekten ilk hafta içerisinde güçlü biyoinsektisit etki gösterdiği anlaşılmıştır. Bunun üzerine çalışmanın bu aşamadan sonraki hesaplamalarında ekstrakt uygulanan kültürlerin biyoinsektisit ve moleküler etkisi hesaplanırken bu hesap birinci haftadaki metanol etkisi çıkarılarak yapılmıştır. Kekiğin ilk biyolojik tekrarında 3. gün 07/04/18 tarihindeki yüksek mortalite ve nanenin ilk biyolojik tekrarında 1. gün 12/04/18 tarihindeki yüksek mortalite, (Ekstraktların hazırlanması aşamasında metanol buhar kazanında benmari yöntemiyle uçurulduğu halde.) tedbiren metanolun biyoinsektisit etkisi olarak yorumlanmıştır. Eğer bu etki hesaba katılmış olsaydı, tatbik ettiğimiz ekstraktların biyoinsektisit etki oranları çok daha yüksek olduğu düşünülecekti. Yirmişer (20) böcek konularak hazırlanan kültür ortamlarınızda ilk hafta metanol etkisiyle öldüğü düşünülen örnekler çıkartıldığında; örneğin bazısında 19 böcek bazısında 9 böcek kaldığı için 19'da 1 ve 9'de 1 -her ikisinde de bir (1) mortalite olmasına rağmen- yüzdesel etki oranının aynı olmayacağı açıktır. Bu aşamadan sonra, çalışmamızın sayısal değil de oransal hesaplanması gereği doğmuştur. Bu oransal hesaplamada hata oluşmadığı, farklı tarihli çalışmalar için düzenlenen grafiklerin kendini tekrarlamasından (örneğin aK ve cK) anlaşılmıştır. Aslında şekillerde de görüldüğü üzere çalışılan grupların ilk önce ham mortalite değerlerinin tabloları çıkarılmış ayrıca bunlara günlük çalışmanın sonlandırdığı aşamadaki sayımları 17.04.2018 tarihinden itibaren her 24 saatte bir yapılan kalan böcek sayıları da eklenerek tabloların daha anlaşılır olması amaçlanmıştır.

Farklı grupların kendi içinde ve gruplar arasındaki dağılımının ölçüldüğü One-Way ANOVA yöntemi internet üzerinden çok sayıda otomatik hesaplayıcı vasıtasıyla yapılmıştır.

1- Bütün grupların en güçlü etki eden birimleri arasında.
(aK, bM, bN) = *p*-value 0.11552
2- En güçlü etki gösteren iki (2) grup (aK, bN) arasında.
(aK, bN) = *p*-value 0.750545
3- Kekik içerisinde benzer eğri sergileyen iki (2) grup arasında.
(aK, cK) = *p*-value 0,177692

4- Zayıf ancak benzer oranlarda etki gösteren iki (2) grup arsında.
(bM, bN) = *p*-value 0,062496
5- Kekik Ortalama – Nane Ortalam
f-ratio value = 0,93468 *p*-value 0,93468 = (*p> 0.05)*

İlk dört grubun içerisinde grubun *p* değeri 0,05'e en yakın değer (0,062496) olarak hesaplanmış olsa da *p*< 0.05'e göre "hiçbir sonuç bilimsel olarak anlamlı çıkmamıştır".

Bunun üzerine üç (3) tam biyolojik tekrarları yapılan kekik ve nane gruplar içerisindeki ortalama değerleri çıkarıldıktan sonra (Çizelge 3.30) tekrar hesaplaması yapılmıştır. Beşinci olarak en etkili ekstraktların ortalamalarının hesaplanarak karşılaştırıldığı (Kekik Ortalama - Nane Ortalama) *p*-değeri 0,93468 olarak bulunmuş olup bu beşinci grup dâhil ANOVA kapsamında değerlendirildiğinde hiçbir sonuç p-value< 0.05 kriterine göre bilimsel olarak anlamlı çıkmamıştır.

S. granarius ile mücadele anlamında literatüre göz atıldığında örneğin; Üç Artemisia türünün (*A. absinthium, A. santonicum ve A. spicigera*) uçucu yağlarının denendiği bir çalışmada *S. granarius* üzerinde güçlü biyoinsektisit etki gösterdikleri görülmüştür (Kordali vd. 2006). Bazı çalışmalarda *S. granarius*'un midesindeki amilaz yapısı incelenmiştir (Baker 1983). İçlerinde *S. granarius*'un da olduğu bir kaç böcek üzerinde yapılan diğer bir çalışmada karbonhidrat aktivitesinde görev alan alfa amilazın birçok izoformunun bitki özleri tarafından inhibe edildiği anlaşılmıştır (Mehrabadi vd. 2011). Mewis ve Ulrichs (2001) tarafından içerisinde *S. granarius*'unda bulunduğu böcekler üzerinde sentetik kimyasalların zararlı etkisine sahip olmayan biyolojik bir yöntem olarak Diatom Toprağı (DT) denenmiş ve böceğin su bariyer yapısını bozarak letal etki gösterdiği görülmüştür. Farklı bir çalışmada da bitkiler üzerinde toksik etkisi olmayan Amorf Silika Tuzu (Dryacide) *S. granarius* üzerinde denenmiş ve letal etkinliği görülmüştür (Aldryhim 1990). Haritos ve Dojchinov'un yaptığı *Sitophilus oryzae* üzerinde yapılan bir çalışmada (Fransa'da yaygın olarak kullanılan) biyoinsektisit ajan metil bromürün etki mekanizması araştırıldığında sitokrom oksidaz c üzerinde inhibe edici etkisi saptanmıştır. Ancak örneğin Varian Cary 300 spectrofotometre gibi cihazlar kullanılan çalışmada gen ifade düzeylerine veya moleküler içeriğe girilmemiştir (Haritos ve Dojchinov 2003). Bu ve diğer bahsedilen çalışmalarda da etki

mekanizmasını gen ifade düzeyleri üzerinden RT-PCR yöntemi kullanarak yorumlamaya çalışan bir başka çalışmaya rastlanmamıştır. *Sitophilus granarius*'la kontamine olmuş buğday ve un üzerinde Obrepalska-Steplowska ve arkadaşları (2008) tarafından yapılmış olan çalışmada, *S. zeamais* ve *S. oryzea* yakın ilişkili tür olarak belirtilmiş olup TaqMan prob yöntemi ile Real-Time PCR örneklere uygulandığında, 100 kg un başına bir böceğin eşdeğeri tespit edilebilmiştir. Ancak bu çalışmanın asıl amacı kontaminasyonu tespitte RT-PCR'dan yararlanmaktır. Bizim amacımızdan farklı olarak, tespit amaçlı yapılan bu çalışmada bizim çalışmamızda da kullanılan mitokondrial COI kullanılmıştır ancak ek olarak COII'de çalışılmıştır (Obrepalska-Steplowska vd. 2008). Sola ve arkadaşlarının (2018) yaptığı diğer bir çalışmada yine aynı şekilde daha kaliteli gıdaya yönelik böcek kontaminasyonun tespitinde PCR yöntemi kullanılmıştır. Vallier ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada ise RT-PCR yöntemiyle *Sitophilus spp*. üzerinde gelişme evreleri incelenmiştir. Literatür tarandığında *Sitophilus granarius* üzerinde toksik etki bırakan ajanların etki mekanizmasını RT-PCR yöntemiyle analizini yapan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu anlamda çalışmamız orijinaldir.

Çalışmamızda Şekil 3.25, 3.26 ve 3.27 incelendiğinde, kekik ve nane ekstraktının *Sitophilus granarius* üzerinde görülen biyoinsektisit etkisinin moleküler ve genetik mekanizması araştırıldığında bu ikinci aşamada kontrol grubu olarak ele alınan ve sadece distile su uygulanmış örneklerdeki *S. granarius*'lerin Houskeeping Gen (Gliseraldehit 3 fosfat*)* gen ifade düzeyleri bir (1) kabul edildiğinde, solunumu elektron taşıma zincirinin son komponenti hedef genimiz Target Gen (Sitokrom oksidaz subunit 1 - COI) geninin ifade düzeyinin hem kekik hem de nanede konsantrasyon oranlarının artışına bağlı olarak anlaşılır bir şekilde düşüş gösterdiği görülmüştür. Bu üç örnek incelendiğinde biyoinsektisit olarak kullanılan bu maddelerin böceğin solunum fonksiyonu üzerinde toksik etki yaptığı söylenebilir.

Hazırlanan ekstraktların çözücü solüsyonu metanolün solunumu regüle eden genler üzerindeki inhibe edici etkisinden ve bu etkinin ekstraktların etkisini tespitte yanıltıcı olabileceği tartışılabilir. Hatta metanolun üremeyi inhibe edici etkisi dahi gözlemlenmiştir. Tüm bunlarda aromatik bitki üzerinde yapılacak çalışmalarda solvent

olarak sadece saf su kullanılması gereği ortaya çıkmaktadır. Ancak metanolün bu yanıltıcı etkisi kekik ve nane ile hazırlanan örneklerde etkili olduğu gibi maydonoz ile hazırlanan örneklerde neden etkili olmamıştır? Üstelik ilk haftadan sonra etkisini kaybeden ve %50 civarı Target gen ifadesi üzerinde etkisi görülen metanolün aksine ekstraktların etkisi 3. 4. haftalarda da devam etmekte ve yaklaşık %90'lara kadar ulaşmaktadır (Şekil 3.25, 3.26 ve 3.27). Kekik ve nanenin etki mekanizması ekstrakt çözücü solüsyon metanolu tutma kapasitesinden mi kaynaklandığı sorusu akla gelebilir ancak, kekik ve nanenin nitel gözlemlerde aromatiklik açısından aynı etkiyi göstermeyen maydanozdan daha güçlü olduğu da açıktır. Üstelik ekstrakt hazırlama protokolünde metanol sıcak su kazanı içerisinde uçurulmaktadır ve metanolün ilk haftanın dışında etki etmediği görülmüştür. Sonuç olarak kullanmış olduğumuz ekstraktların metanolden bağımsız olarak hedef gen ifade düzeylerine düşürdüğü söylenebilir. Şekil 3.25'de kekik ekstraktında %50 konsantrasyonda ki gen ifade düzeyi %20 konsantrasyona göre yükselme göstermesi bu oranda farklı bir savunma mekanizmasının devreye girdiği ihtimalini akla getirmektedir. Aynı şekilde nanede de %10 konsantrasyonda gen ifade düzeyinde bir artış görülmektedir. Kekiğin üç biyolojik tekrarının birleştirildiği Şekil 3.12 ile solunumla ilgili Target gen (COI*)* ifade düzeylerini gösteren Şekil 3.25 ile karşılaştırıldığında özellikle %20-%75 konsantrasyon aralığındaki yükseliş ve düşüşler kısmen örtüşmektedir. Nanenin ikinci biyolojik tekrarıyla ilgili (bN) Şekil 3.17'de görülen yükselen etkisi kısmen Şekil 3.26'da solunumla ilgili COI gen ifade düzeylerinde görülen düşüşle açıklanabilir. Metanolün letal etki değerlerindeki ilk haftada görülen yükselişi gösteren Çizelge 3.5'teki sonuçlar aynı örneklerin çalışıldığı Şekil 3.27'deki solunumla ilgili Target gen (COI) ifade düzeylerinin düşüşüyle uyumludur.

Sonuç olarak, çalışmamızda literatürde ki geçen diğer benzer çalışmalarda da olduğu gibi depo zararlısı böceklerle biyolojik ve veya kimyasal olmayan mücadelede yöntemlerinin etkili sonuçlar verdiği görülmüş ve doğrulanmıştır. Ayrıca aynı konuyla ilgili bundan sonraki çalışmalar için sayımlarda sadece mortalitenin değil aynı zamanda canlı böceklerinde sayılması; sayımların haftalık yapılması; kullanılan bitkilerin çalışmacı tarafından canlı olarak temin edilerek yetiştirilen veya araziden toplanan örneklerden seçilmesi; ekstrakt çözücüsü olarak sadece saf su kullanılması gereği önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Aldryhim, Y. N. (1990). Efficacy of the amorphous silica dust, Dryacide, against *Tribolium confusum* Duv. and *Sitophilus granarius* (L.)(Coleoptera: Tenebrionidae and Curculionidae). Journal of Stored Products Research, 26(4), 207-210.

Anonim. (2016). Hububat Raporu. Toprak Mahsulleri Ofisi TMO. 32, 33, 98, 182, 178s. Ankara.

Anonim. (2017a). Wep Sitesi: www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist., Erişim Tarihi: 16/07/2018.

Anonim. (2017b). Wep Sitesi : www.tmo.gov.tr/Upload/ Document/ hububat/ Hububat Raporu2017. pdf 30s., Erişim Tarihi 14.05.2019.

Anonim. (2018). Wep Sitesi: https://arastirma. tarimorman.gov. tr/tepge/Belgeler/ PDF

%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Piyasalar%C4%B1/2018Temmuz%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Raporu/2018Temmuz%20Bu%C4%9Fday.pdf, Erişim Tarihi: 25.04.2019.

Anonim. (2019a). Wep Sitesi: http://www. Tmo .gov. tr/ Upload/ Document/ piyasabulteni/ piyasabulteni_tr.pdf, Erişim Tarihi: 24/04/2019.

Anonim (2019b). Wep Sitesi: http:// www. tmo.gov. tr/ Upload/ Document/ istatistikler/ tablolar/1bugdayeuva.pdf, Erişim Tarihi: 25.04.2019.

Atamanalp, M., & Cengiz, M. (2002). Bir sentetik piretroit insektisit (cypermethrin)'in subletal dozlarının *Capoeta capoeta* (Güldenstaedt, 1772)'da hemoglobin, hematokrit ve sediment seviyeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi. Ege Üniv. Su Ürünleri Derg, 19(1-2), 169-175.

Atik, A. D., Öztekin, M., & Erkoç, F. (2010). Biyoçeşitlilik ve Türkiye'deki Endemik Bitkilere Örnekler. Gazi University Journal of Gazi Educational Faculty (GUJGEF), 30(1).

Baker, J. E. (1983). Properties of amylases from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granarius*. Insect Biochemistry, 13(4), 421-428.

Bell, C. H., & Glanville, V. (1973). The effect of concentration and exposure in tests with methyl bromide and with phosphine on diapausing larvae of *Ephestia elutella* (Hübner)(Lepidoptera, Pyralidae). Journal of Stored Products Research, 9(3), 165-170.

Çizmecioğlu M. (2015). Depo Tahıllarında Deltamethhrın'ın *Sitophilus granarius* (L.)'a (Coleoptera: Curculionidae) rezidüyel etkisi üzerinde araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, 25 Ankara

Dizlek, H. (2012). Tahılların Depolanmasında Etkili Olan Başlıca Etmenler. Electronic Journal of Food Technologies, 7.2 : 48-59.

Donahaye, E. J., & Messer, E. (1992). Reduction in grain storage losses of small-scale farmers in tropical countries. Research Report RR-91-7, The Allan Shawn Feinstein World hunger Program, Brown University, USA,, 19s.

Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Journal of the American Statistical Association, 50(272), 1096-1121.

Ferizli, A. G., ve Emekci, M., (2010). Depolanmış ürün zararlılarıyla savaşım, sorunlar ve çözüm yolları. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, 11/15.

Haritos, V. S., & Dojchinov, G. (2003). Cytochrome c oxidase inhibition in the rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.) by formate, the toxic metabolite of volatile alkyl formates. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 136(2), 135-143.

İpek, G., Vural, E. Ö., Şenkal, B. Ç., Bingöl, Ü., İpek, A., Tüfekçi, A. R., & Fatih, G. Ü. L. (2014). Türkiye Florasında Endemik Olan *Salvia Albimaculata*'nın Uçucu Yağ Bileşenleri Ve Oranları. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, (2), 25-27.

İpek, A., & Gürbüz, B. (2010). Türkiye florasında bulunan *Salvia* türleri ve tehlike durumları. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 19(1-2).

Karakaş, M. (2016). Toxic Effect of Some Plant Extracts on the Productivity of Wheat Granary Weevil, *Sitophilus granarius* (L.)(Coleoptera: Curculionidae). Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences, 6(1).

Karakas, M. (2016). Toxic, repellent and antifeedant effects of two aromatic plant extracts on the wheat granary weevil, *Sitophilus granarius* L.(Coleoptera: Curculionidae). International Journal of Entomology Research, 1(6), 24-28.

Karakaş, M., and E. Bolukbasi., (2017). Bio-insecticide effect of black cumin against Granary weevil, *Sitophilus granarius* L.(Coleoptera: Curculionidae) on stored wheat. Internasyonel Journal of Entomology Research, 2-4 38/40

Kibar, H., ve Öztürk, T., (2010). "Depolamada Ortaya Çıkan Ürün Kayıplarının Nedenleri ve Çözüm Önerileri." Ulusal Sulama ve Tarımsal Yapılar Sempozyumu, 806-815.

Kljajic, P., & Peric, I. (2009). Residual effects of deltamethrin and malathion on different populations of *Sitophilus granarius* (L.) on treated wheat grains. Journal of stored products research, 45(1), 45-48.

Kordali, S., Aslan, I., Çalmaşur, O., & Cakir, A. (2006). Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia species* and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.)(Coleoptera: Curculionidae). Industrial crops and products, 23(2), 162-170.

Korkmaz, H., Mumcu, Ü., & Yalçın, E. (2017). Terme Florasındaki Nadir ve Endemik Bitki Türleri. Terme'nin Biyoçeşitlilik ve Doğal Ortam Özellikleri Yayını, 113.

Leblanc, M. P., Fuzeau, B. and Fleurat-Lessard., F. (2014). "Influence of grain storage practices or kind of structure and pesticide use on insect presence in wheat bulks after a long-term storage: a multi-dimensional analysis." IOBC-WPRS Bulletin 98: 403-420.

Longstaff, B. C. (1981). Biology of the grain pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae): a critical review. Protection Ecology, 3(2), 83-130.

Lorini, I., & Galley, D. J. (1999). Deltamethrin resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.)(Coleoptera: Bostrichidae), a pest of stored grain in Brazil. Journal of Stored Products Research, 35(1), 37-45.

Madduri, K., Waldron, C., Matsushima, P., Broughton, M. C., Crawford, K., Merlo, D. J., & Baltz, R. H. (2001). Genes for the biosynthesis of spinosyns: applications for yield improvement in *Saccharopolyspora spinosa*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 27(6), 399-402.

Manueke, J., et al. (2015). "DNA profile of *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* in rice and corn kernels." Internasyonel Journal of Chem Tech Research, 11-9 2194-2202

Mehrabadi, M., et al. (2011). "α-Amylase activity of stored products insects and its inhibition by medicinal plant extracts." Journal of Agricultural Science and Technology, 13: 1173-1182.

Mewis, I., & Ulrichs, C. (2001). Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum, Tenebrio molitor, Sitophilus granarius* and *Plodia interpunctella*. Journal of stored products research, 37(2), 153-164.

Ndong, A., et al. (2015). "Diversity and Genetic Structure of *Sitophilus Spp.* Haplotypes, Primary Pest of Stored Maize in Senegal and Guinea: Genetic Impact of Storage Infrastructure and Agro-Climatic Zones." Internasyonel Journal of Research Studies in Biosciences, 3-1 122/140.

Obrepalska-Steplowska, A., et al. (2008). "Molecular techniques for the detection of granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) in wheat and flour." Food Additives and Contaminants, 25.10: 1179-1188.

Özderin, S., Fakir, H., & Dönmez, I. E. (2014). Muğla-Ula yöresinde doğal yayılış yapan bazı kekik türlerinin uçucu yağ oranları ve bileşenlerinin belirlenmesi. II. Ulusal Akdeniz Orman ve Çevre Sempozyumu, 22-24.

Özel, A., & Özgüven, M. (2002). Effect of different planting times on essential oil components of different mint (*Mentha spp.*) varieties. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 26(5), 289-294.

Plarre, R. (2013). An attempt to reconstruct the natural and cultural history of the granary weevil, *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). EJE, 107(1), 1-11.

Sehgal, B., Subramanyam, B., Arthur, F. H., & Gill, B. S. (2014). Variation in susceptibility of laboratory and field strains of three stored‐grain insect species to β‐cyfluthrin and chlorpyrifos‐methyl plus deltamethrin applied to concrete surfaces. Pest management science, 70(4), 576-587.

Sola, M., Riudavets, J., & Agusti, N. (2018). Detection and identification of five common internal grain insect pests by multiplex PCR. (Journal&Book Elsevıer) Food Control , 84, 246-254.

Talukder F A & Howse P R. (1993). Deterrent and insecticidal effects of extract of pithraj, *Aphanamixis polystachya* against *Tribolium castaneum* in storage. J. Chern. Ecol. 19(11):2463-24.

Tunaz, H., & Uygun, N. (2004). Insect growth regulators for insect pest control. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 28(6), 377-387.

Tanker, N., Koyuncu, M., Çoşkun., (1998) Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi M. Farmasotik Botanik Ders Notları. A.Ü. Ecz. Fak. Yayınları, 78

Türe, C., & Köse, Y. B. (2000). An investigation on the weed distribution in some agricultural fields of Eskişehir and environs. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 24(3), 327-332.

Vallier, A., Vincent-Monégat, C., Laurençon, A., & Heddi, A., (2009). RNAi in the cereal weevil *Sitophilus spp*: systemic gene knockdown in the bacteriome tissue. BMC biotechnology, 9(1), 44.

Yağdı, K. (2004). "Bursa koşullarında geliştirilen ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) hatlarının bazı kalite özelliklerinin araştırılması." Ulud. Üniv. Zir. Fak. Derg, 18.1: 11-23.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Rüstem DUYAR
Doğum Yeri : Niğde
Doğum Tarihi : 12/06/1977
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Niğde Atatürk Sağlık Meslek Lisesi (1995)
Lisans : Kafkas Üniversitesi, Sağlık Yüksek Okulu (2003)
Lisans : Anadolu Üniversitesi, A.Ö.F. Kamu Yönetimi (2012)
Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji A.B.D. (2015)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2016)

Çalıştığı Kurum/Unvan

Sağlık Bakanlığında (Çankaya İlçe Sağlık Müdürlüğü) Sağlık Memuru olarak görev yapmakta 2001- Halen: