

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EKİN KAMBURBİTİ [*Rhyzopertha dominica* (F.)
(Coleoptera: Bostrychidae)] POPÜLASYONLARININ
FOSFİNE KARŞI DİRENÇ DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

Abdullah YILMAZ

**Danışman
Prof. Dr. Erhan KOÇAK**

**DOKTORA TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2018**



© 2018 [Abdullah YILMAZ]

TEZ ONAYI

Abdullah YILMAZ tarafından hazırlanan "**Ekin Kamburbiti [*Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae)] Popölasyonlarının Fosfine Karşı Direnç Düzeylerinin Belirlenmesi**"adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

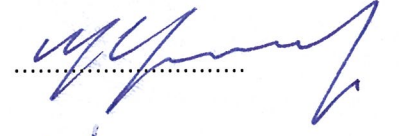
Danışman

Prof. Dr. Erhan KOÇAK
Süleyman Demirel Üniversitesi



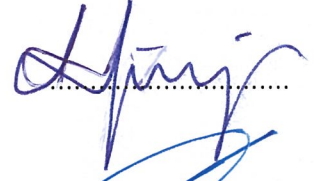
Jüri Üyesi

Prof. Dr. M. Faruk GÜRBÜZ
Süleyman Demirel Üniversitesi



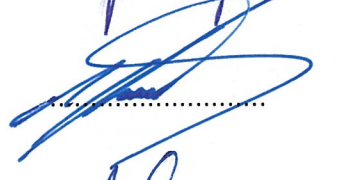
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hüseyin ÇETİN
Akdeniz Üniversitesi



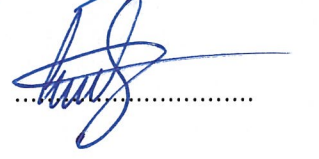
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Nabi Alper KUMRAL
Uludağ Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Sibel YORULMAZ SALMAN
Süleyman Demirel Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yasin TUNCER

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Abdullah YILMAZ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Fosfin (PH3)	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. <i>Rhyzopertha dominica</i> (F.) popülasyonlarının toplanması.....	27
3.2.2. <i>Rhyzopertha dominica</i> (F.)'nın yetiştirilmesi	28
3.2.3. Bioassay Denemeleri (Toksikolojik Çalışmalar)	29
3.2.4. Bioassaylerde ayırıcı doz çalışmaları	30
3.2.5. İstatistiksel değerlendirme	31
3.2.6. Genomik DNA (gDNA) izolasyonu	31
3.2.7. Genomik DNA'nın PCR yöntemiyle çoğaltılması.....	32
3.2.8. PCR ürünlerinin (amplikonların) MboI kesim enzimi ile kesimi ve değerlendirilmesi	32
3.2.9. Direnç gen frekanslarının hesaplanması	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Çalışma alanlarından elde edilen <i>Rhyzopertha dominica</i> (F.) popülasyonları	34
4.2. Biyoassay Sonuçları	35
4.3. Moleküler çalışmalara ait sonuçlar.....	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	698
KAYNAKLAR	754
ÖZGEÇMİŞ.....	865

ÖZET

Doktora Tezi

EKİN KAMBUR BİTİ *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) POPÜLASYONLARININ FOSFİNE KARŞI DİRENÇ DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Abdullah YILMAZ

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Erhan KOÇAK

Ekin kambur biti [*Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae)] depolanmış hububatın en önemli zararlılarından biridir. Fosfin uzun yıllardır dünya genelinde bu zararlıya karşı kullanılmaktadır ve yapılan çalışmalar fosfine karşı direnç geliştiğini göstermektedir. Ancak, ülkemizde bu zararlıda fosfine karşı direnç gelişiminin araştırılması yönünde henüz bir araştırma yapılmamıştır. Bundan hareketle, Ankara, Konya, Şanlıurfa, İzmir, Tekirdağ, Kütahya, Karaman, Samsun, Mersin, Hatay, Diyarbakır, Batman olmak üzere bu iller deki Toprak Mahsulleri Ofisi veya özel hububat depolarından *R. dominica* ile bulaşık buğday örnekleri toplanmış ve 18 popülasyon elde edilmiştir. Bu popülasyonlar laboratuvarında 25±1°C sıcaklık ve %65±5 orantılı nem koşullarına ayarlanmış iklim dolaplarında kültüre alınmıştır. Kültüre alınan böceklerden 1-3 haftalık erkek ve dişi erginler karışık olarak denemelere alınmıştır. Tüm popülasyonların fosfine karşı direnç durumu FAO metodu modifiye edilerek LC₅₀ değerlerinin elde edilmesiyle belirlenmiştir. Direnç oranları, bu popülasyonların LC₅₀ değerlerinin hassas popülasyon (AVS) ile kıyaslanmasıyla hesaplanmıştır. *R. dominica* popülasyonlardan elde edilen test sonuçları fosfine karşı farklı seviyelerde direnç oranlarını ortaya çıkarmıştır. Fosfine karşı elde edilen en yüksek direnç oranları sırasıyla, Şanlıurfa 537, Tekirdağ 537, Mersin 533, Hatay 377, Ankara 357, Konya 335, İzmir 316, Kütahya 99 ve Samsun'da 96 kat olarak bulunmuştur. Karaman, Diyarbakır ve Batman illerinden alınan popülasyonlar dirençli olarak değerlendirilmemiştir. *R. dominica* popülasyonlarında olası mutasyon varlığını tespit etmek amacıyla toplanan bireylerden fosfine karşı direnç kaynağı ile bağlantı gösteren genler moleküler markerler kullanılarak belirlenmiştir. Toplanan popülasyonlardan her popülasyon için en az 18 birey moleküler çalışmalarda kullanılmıştır. Toplam 324 *R. dominica* bireyinden ekstrakte edilen DLD geninde aminoasit (P49S) mutasyonu, bu mutasyonu içeren PCR ürünleri, dirençli aleli belirleyen ve bu alel ile genotiplerin belirlenmesini sağlayan MboI kesim enzimi ile

kesilmiştir. Buna göre; 324 bireyin 201 tanesi (%62) homozigot dirençli, 61 tanesi (%18,8) heterozigot dirençli ve 62 (%19,1) adedinin ise homozigot hassas olduğu görülmüştür. Fosfin direnci ile ilişkili DLD geninin işlevini değiştiren rph2 lokusundaki genetik varyasyonların görüldüğü popülasyonların fenotip olarak yüksek dirençli olduğu ve popülasyonlarda yaygın olduğu görülmektedir.

Kesim sonrasında Ankara, Konya, Şanlıurfa, İzmir, Tekirdağ, Kütahya, Samsun, Mersin, Hatay illerindeki popülasyonlarda fosfin direnci ile ilişkili DLD geninin işlevini değiştiren rph2 lokusundaki genetik varyasyonların görüldüğü popülasyonların fenotip olarak yüksek dirençli olduğu, Karaman, Diyarbakır ve Batman popülasyonlarında genetik varyasyonların henüz oluştuğu fenotip olarak dirençli olmadığı belirlenmiştir. Genel olarak Türkiye’den toplanan dirençli popülasyonlarda, DLD geninin işlevini değiştiren rph2 lokusundaki genetik varyasyonların yaygın olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Depo Zararlıları, Direnç, Ekin Kambur Biti, Fosfin, *Rhyzopertha dominica*,

2018, 90 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF PHOSPHINE RESISTANCE LEVELS IN POPULATIONS OF *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae)

Abdullah YILMAZ

Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Erhan KOÇAK

The lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera, Bostrychidae) is one of the most important pests of stored grain. Phosphine has been used for many years against this pest. It has been determined in studies conducted in the world that the pests develop resistance to phosphine. However, there is no such study about this pest in Turkey. For that reasons, wheat samples were collected from a total of 12 local soil crops offices or special grain stores, including Ankara, Konya, Şanlıurfa, İzmir, Tekirdağ, Kütahya, Karaman, Samsun, Mersin, Hatay, Diyarbakır and Batman provinces and totally 18 populations of *R. dominica* were obtained. The resistance of all populations to phosphine was determined by modifying the FAO method to obtain LC₅₀ values. Resistance rates were calculated by dividing LC₅₀ values of these populations by sensitive population (AVS) values. Bioassay results from *R. dominica* populations revealed that the resistance rates against phosphine were at different levels. These ratios were as follows; 537 times in Şanlıurfa and Tekirdağ, 533 in Mersin, 377 in Hatay, 357 in Ankara, 335 in Konya, 316 in İzmir, 99 in Kütahya and 96 in Samsun. Karaman, Diyarbakır and Batman populations have not been evaluated as resistant according to discriminating dose studies.

In order to identify the possible presence of mutation in *R. dominica* populations, genes associated with resistance to phosphine in individuals were identified using molecular markers. 18 individuals from each population were used in molecular studies. PCR products for the amino acid mutation (P49S) in the DLD gene extracted from a total of 324 individuals tested in different populations across the country were cut with the MboI cutting enzyme, which allows identification of resistant alleles and genotypes. As a result, 201 (62%) of the 324 individuals were found to be homozygous resistant, 61 (18.9%) were heterozygous resistant and 62 (19.1%) were homozygous sensitive. Populations of Ankara, Konya, Şanlıurfa, İzmir, Tekirdağ, Kütahya, Samsun, Mersin and

Hatay provinces were homozygous for phenotypic changes in the rph2 locus that altered the function of the DLD gene related to phosphine resistance. Genetic variations in Karaman, Diyarbakır and Batman populations heterozygote resistance) have yet been established, whereas homozygote resistance has not detected. Overall it was determined that populations collected from Turkey has high phosphine resistance. Parallel to these results, genetic variations in the locus of rph2 that alter the function of the resistance-associated DLD gene and homozygous resistance as a phenotype in the populations have been identified.

Key words: Lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, Phosphine, Resistance, DLD, Molecular genetics

2018, 90 pages



TEŞEKKÜR

Bu araştırma için değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Erhan KOÇAK'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarımın sağlıklı yürütülmesindeki katkı ve desteklerinden dolayı Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Yaşar KARAKURT ve Prof. Dr. Hüseyin ÇETİN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımın bir bölümünü yürüttüğüm ve mesleki tecrübe olarak kazanımlar edinmemi sağlayan Dr. Pat Collins ve Dr. Ramandeep Kaur'a (Tarım Bakanlığı, Queensland, Avustralya), Dr. David Schlipalius ve Dr. Paul Ebert'e (Queensland Üniversitesi, Avustralya) teşekkür ederim.

Çalışmalarımızı yürüttüğüm, maddi ve manevi her türlü desteğini hissettiğim Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsüne, önceki ve şimdiki yöneticilerine, Dr.Sait Ertürke, arazi çalışmalarımda yardımcı olan TMO Genel Müdürlüğüne saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda her zaman desteklerini gördüğüm çalışma arkadaşlarım Yasin N. Alpkent, Ercan Koca, Gamze Erdurmuş, Başak Çoşkun ve Duygu Demiröz'e teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

TAGEM –BS- 13/12-06/03-04 sayılı proje ile tezimi destekleyen Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

3510-D2-13 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin gerçekleşmesinde 2214/A-Yurt Dışı Araştırma Burs Programı kapsamında çalışmalarımın bir kısmını yurt dışında yapmam için maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Abdullah YILMAZ
Isparta, 2018

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. <i>Rhizoperta dominica</i> (F.) (Ekin kambur biti)	25
Şekil 3.2. Fosfinin açık formülü	26
Şekil 3.3. İklim kabini ve bazı laboratuvar malzemeleri	29
Şekil 3.4. Bioassay denemeleri	30
Şekil 3.5. Fosfin üreteçleri, desikatör ve fosfin ölçer	30
Şekil 4.1. <i>Rhyzopertha dominica</i> (F.) popülasyonlarının toplandığı iller	34
Şekil 4.2. Ankara RD46 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	37
Şekil 4.3. Ankara RD47 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	38
Şekil 4.4. İzmir RD36 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	39
Şekil 4.5. İzmir RD37 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	39
Şekil 4.6. Konya RD6 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	40
Şekil 4.7. Konya RD17 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	41
Şekil 4.8. Şanlıurfa RD32 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	42
Şekil 4.9. Şanlıurfa RD33 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	42
Şekil 4.10. Şanlıurfa RD38 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	43
Şekil 4.11. Hatay RD13 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	44
Şekil 4.12. Tekirdağ RD21 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	45
Şekil 4.13. Tekirdağ RD44 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	45
Şekil 4.14. Mersin RD7 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	46
Şekil 4.15. Kütahya RD45 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	47
Şekil 4.16. Samsun RD54 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu	48
Şekil 4.17. (A) DLD genini kodlayan genomik DNA'dan amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü. (B) Her jelin üzerindeki homozigot hassas (RR), homozigot dirençli (rr) ve heterozigot (Rr) kesilmiş ürünler	54

Şekil 4.18. TRD7 ve TRD37 nolu populasyonların popülasyonlarından DLD genlerinin izole edilip, sekansı yapılarak, karşılık gelen amino asit dizileri.....	55
Şekil 4.19. <i>Rhyzopertha dominica</i> (F.) popülasyonlarından DLD genlerini izole edilip, sekansı yapılarak, karşılık gelen amino asit dizileri ve elde edilen primerler, DLD'nin ClustalW2 tarafından indirgenmiş amino asit dizileri, mutasyona uğramış amino asit sekanslarının kısmı, ABD ve Avustralya <i>R. dominica</i> 'nın duyarlı ve dirençli bireylerden gelen dizilerin hizalanmasında P49S fosfin dirençli mutasyonları göstermektedir (Chen vd., 2015).....	56
Şekil 4.20. DLD genindeki primer bağlanma bölgeleri ve mutasyon noktasının şematik gösterimi.....	56
Şekil 4.21. Ankara RD46 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	57
Şekil 4.22. Ankara RD47 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	57
Şekil 4.23. Konya RD6 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	57
Şekil 4.24. Konya RD17 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	58
Şekil 4.25. Şanlıurfa RD32 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	58
Şekil 4.26. Şanlıurfa RD33 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	58
Şekil 4.27. Şanlıurfa RD38 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	59
Şekil 4.28. İzmir RD36 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	59
Şekil 4.29. İzmir RD37 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	59
Şekil 4.30. Tekirdağ RD21 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile eksiminin jel görüntüsü.....	60
Şekil 4.31. Tekirdağ RD44 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile eksiminin jel görüntüsü.....	60
Şekil 4.32. Kütahya RD45 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	60
Şekil 4.33. Mersin RD7 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	61
Şekil 4.34. Hatay RD13 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	61
Şekil 4.35. Samsun RD54 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	62
Şekil 5.1. İnsektisit aktif madde miktarı ve dirençli böcek türü sayısındaki artış (Sparks, T.C. ve Nauen, R., 2015).....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Depo zararlılarında fosfin için direnç ayırıcı dozlar	22
Çizelge 3.1. Türkiye de farklı illerde depolanmış buğdaylardan elde edilen <i>Rhizoperta dominica</i> (F.) popülasyonları	26
Çizelge 3.2. <i>Rhyzopertha dominica</i> (F.)'nın sistematikteki yeri	26
Çizelge 3.3. Reaksiyonda kullanılan DLD genine ait spesifik CAPS primerleri	32
Çizelge 4.1. <i>Rhyzopertha dominica</i> (F.)' popülasyonlarının Rph2 için CAPS markerleri kullanılarak tespit edilen genotipler ve alellerin frekansı	63
Çizelge 4.2. <i>Rhyzopertha dominica</i> (F.)' popülasyonları genotiplerine uygulanan Hardy -Weinberge testi	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AGIRD	Avustralya Tahıl Böcekleri Veri Tabanı
ATP	Adenozin Tri Fosfat
AVS	Avustralya
bp	Baz çifti
CAPS	Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler
°C	Derece santigrat
DLD	Dihydrolipoamide dehydrogenase
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DO	Direnç oranı
ETC	Elektron Taşıma Zinciri
FAO	Dünya Tarım Örgütü
g	Gram
GCS	Glisin Bölünme Sistemi
h	Heterejonite
H ₂ SO ₄	Sülfürik Asit
IRAC	İnsektisit Direnç Çalışma Komitesi
kb	Kilo baz
kg	Kilogram
KGDH	α -ketoglutarat dehidrogenaz ()
l	Litre
LC ₅₀	Letal Konsantrasyon-50
LC ₉₉	Letal Konsantrasyon-99
LD ₅₀	Letal Doz-50
LT ₉₉	Letal Zaman-99
m ³	metreküp
mg	miligram
ml	mililitre
n	birey sayısı
PCR	Polimer zincir reaksiyonun
PH ₃	Fosfin
ppm	milyonda bir kısım
ROS	Reaktif oksijen türü
Rph1	Zayıf dirençten sorumlu 1.gen
Rph2	Kuvvetli dirençten sorumlu DLD geni
µl	mikrolitre

1. GİRİŞ

Buğday insanların temel besin kaynağını oluşturan ürünler içerisinde en büyük paya sahip olan üründür. Buğdayın tüketimi gelişmiş ülkelerde daha az olmasına karşın, ülkemizde ve kişi başına gelir düzeyi düşük olan ülkelerde ekmeğe dolayısıyla buğdaya dayalı beslenme oldukça fazladır. Türkiye’de tarım yapılabilir 23,9 milyon hektarlık alan içerisinde %49 ile en büyük payı tahıllar (hububatlar) (buğday, arpa, darı, çavdar, mısır gibi) almaktadır. Toplam hububat alanları içerisinde ise %67’lik pay ile ilk sırada buğday yer almaktadır. Buğdayı %24’lük pay ile arpa, %6’lık pay ile mısır, %1’lik pay ile çeltik, yulaf ve çavdar takip etmektedir. 2016 Yılında Türkiye’nin hububat üretimi 20,6 milyon ton buğday, 6,7 milyon ton arpa, 6,4 milyon ton mısır 920 bin ton çeltik, 300 bin ton çavdar ve 225 bin ton yulaf olarak gerçekleşmiştir (Anonim, 2016). Hububatın üretim miktarları fazla olmasına rağmen, kısa zamanda tüketilememeleri, doğal afetler ve savaş gibi özel durumlar nedeniyle uygun koşullarda depolanmaları gerekir. Depolama esnasında meydana gelebilecek kalite ve ağırlık kayıplarının önlenmesinde ürün kaybına yol açan böcek türleri ile mücadele önemlidir. Zararlıların vücut kalıntıları, pislikleri ve salgılamış oldukları ağ ve benzeri maddeler nedeniyle ürün kalitesi düşmektedir. Ayrıca ürünlerde beslenme sonucu ağırlık kayıpları, tohumluk özelliğinin düşmesi, kalite ve besin değerlerinde olumsuz değişiklikler meydana gelmekte ve böylece ürünün ticari değeri düşmektedir (Boxall, 2001). Türkiye’de *Sitophilus* spp. (Coleoptera: Curculionidae), *Tribolium* spp. (Coleoptera: Tenebrionidae), *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrychidae), *Trogoderma granarium* Evert. (Coleoptera: Dermestidae), *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: Silvanidae) ve *Ephestia kuehniella* Zell. (Lepidoptera: Pyralidae) gibi depolanmış ürün zararlıları özellikle hububatın depolanması sırasında ağırlık, çimlenme ve kalite kayıplarına neden olmaktadır (Anonim, 1995; Özer vd., 1989; Erakay, 1974). Hububat ambar böcekleri içinde önemli zararlılardan biride Ekin kambur biti olarak bilinen *R. dominica*’dır. Bu zararlının gerek Türkiye’de gerekse yurt dışında yapılan bazı çalışmalarda hububatlara bulaşma oranları çok yüksek

bulunurken, erginlerinin depolanmış tanelerde ağırlık kaybına neden oldukları ve bulaşmadan 122 gün sonra zararın ekonomik düzeye ulaştığı bildirilmektedir (Malagon ve Trochez, 1985; Işıkber vd., 2005). *R. dominica* erginleri 2,24 mm boyda kırmızımsı sarı kahve renktedir. Bu türde baş thorax'ın altına doğru yöneldiğinden üstten bakıldığında görülmez. Dişiler çiftleştikten hemen sonra yumurtalarını tek tek veya 2- 40'lık gruplar halinde hububat tanelerinin bulunduğu ortama bırakırlar. Bir dişi ortalama 300 kadar yumurta bırakabilir. Yumurtadan çıkan larvalar hububat tanelerini delerek içine girer ve burada gelişimlerini tamamlarlar. Erginler taneyi delerek dışarı çıkar ve bir yılda 4-5 nesil verirler. Erginlerin ortalama yaşama süresi 80-100 gündür. Ürün zararını larvalar bütün hububat çeşitlerinin tanelerinde tanenin iç kısmını yiyerek veya un ve undan yapılmış maddelerde yapar. Erginler ise taneleri dıştan kemirerek zararlı olur (Şayeste, 1971).

Dünyada ve ülkemizde depolarda diğer birçok zararlının mücadelesinde olduğu gibi *R. dominica* ile mücadelede en etkili ve en çok kullanılan yöntem fümigasyondur. Fümigantlar içerisinde en yaygın olarak kullanılan kimyasallar metil bromit ve fosfin'dir (Bond, 1984; Evans, 1987; Taylor, 1994). Ancak Birleşmiş Milletler Montreal protokolüne göre metil bromit gelişmiş ülkelerde 2005 ve gelişmekte olan ülkelerde ise 2015 yılına kadar kullanımdan kaldırılması planlanmıştır (UNEP, 1995). Ülkemizde ise metil bromit 2004 yılı itibariyle (karantina uygulamaları hariç) kullanımdan kaldırılmıştır. Bu nedenle ülkemizde fümigant olarak sadece fosfin (PH₃) bulunmaktadır. Fosfin 1700'lerin sonunda keşfedilmiştir, 1930'lardan beri Dünya'da, 1950'den bu yana Türkiye'de fümigant olarak kullanılmaktadır. Bu fümigantın dünya genelinde depolanmış ürünlerdeki kullanım miktarları tam olarak bilinmemekle birlikte, Türkiye'de 2011 yılında 157 ton Aliminyum fosfit ve 12 ton Magnezyum fosfit ithalatı gerçekleşmiştir (Anonim, 2012). Bu kullanım yaklaşık rakamlarda devam etmektedir. Fosfin veya hidrojen fosfin (PH₃) düşük molekül ağırlıklı (34.04), düşük kaynama noktalı (-87.4 °C), materyal içinde hızlı yayılma ve penetre olma özelliği olan toksik bir gazdır. Gazın düzenli salınımı, kolay kullanımı ve fosfinin alev almasını engellemek için metalik formülasyonlarından

gaz üretimi gerçekleştirilir. Metalik fosfidlerin formülasyonu için alüminyum veya magnezyum fosfid, amonyum karbamat, amonyum bikarbonat ve parafin gibi ek materyaller ile formüle edilerek kullanılır (FAO, 2013). Değişik formülasyonlardaki fosfin gazı (PH_3) uygulama sonrası hava ile temasında ve rutubetin etkisiyle açığa çıkar. Gazın insanlar tarafından fark edilmesini sağlamak için formülasyonlara karpit veya sarımsak kokusu ilave edilerek uyarıcı özellik kazandırılmıştır. Böceklerle mücadelede toksik gazlardan biri olan fosfine maruz kalma süresi, yeterli olursa çok düşük konsantrasyonlarda dahi etkisi görülebilir. Böceklere fosfin toksisitesi, sıcaklık 5°C 'ye düştüğünde azalır, bu sıcaklığın altında kullanım tavsiye edilmez. Maruz kalma süresinin doz ile ilişkisi kurulamamıştır yani dozun arttırılmasıyla maruziyet süresi kısaltılamaz, yüksek konsantrasyonlar, azalan ölümlerle birlikte narkoz etkisi oluşturmaktadır (FAO, 2013). Fosfin O_2 varlığında böceklere toksik etkisi olan tek bileşiktir. O_2 yokluğunda emilmez ve böceklere toksik değildir. Bununla birlikte fosfinin hareketi CO_2 ile yönlendirilir ve maruz kalma süresi, her iki gaz mevcut olduğunda azalabilir (FAO, 2013; FAO, 2017b).

Fosfinin böceklerdeki etki mekanizması çeşitli organizmalarda araştırılmış ancak böceklerdeki biyokimyasal değişiklikleri aydınlatmak için çeşitli çalışmalar yapılmasına rağmen, yine de fosfinin etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Nath vd. (2011) fosfinin toksisite mekanizmalarını potansiyel olarak birbirine bağlı sinirsel, redoks ilişkili ve metabolik modele göre gruplandırmışlardır. Fosfinin sinir sistemine etkili olduğu çalışmada; yüksek konsantrasyonlarda narkotik etki oluşturduğu düşünülen fosfinin aynı etkiyi düşük konsantrasyonlarda sağlaması, fosfin kaynaklı ölüme dirençli bireylerin, nesillerinin de narkotik olarak fosfine dirençli olması gösterilmiştir (Winks ve Waterford, 1986). Fosfin ile çalışanlarda insektisit ile çalışan insanların karakteristik bir semptomu olan asetilkolin esteraz enziminin yüksek olduğu gözlenmiştir (Potter vd., 1993). Böceklerde asetilkolin esteraz aktivitesi üzerinde doğrudan bir inhibitör etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Al-Hakkak vd., 1989). IRAC fosfini mitokondri bileşik IV (Sitokrom c oksidaz, elektron transfer zincirinin son bileşiği) aşamadaki elektron transferini engelleyici

olarak sınıflandırmaktadır. Fosfinin mitokondriyal elektron taşıma zincirinin (ETC) kompleks IV'le etkileşebileceği gözlemiyle ilgilidir. Bu etkileşim, ATP sentezi için gerekli olduğu gibi, iç mitokondriyal zar boyunca proton degradasyonunun muhafaza edilmesine müdahale eden, ETC boyunca azaltılmış elektron akışı ile ilişkilidir. Metabolik bozulma modelinde, kompleks IV inhibisyonuna bağlı ATP eksikliği ölüme yol açar. Fosfinin böcek mitokondriyasındaki kompleks IV (sitokrom c oksidaz) aktivitesini kuvvetli bir şekilde etkilemesi ve bozması, ATP sentezini ve normal enerji metabolizmasını potansiyel olarak engellemektedir (Kashi and Bond, 1975; Chefurka vd., 1976; Nakakita, 1987).

Fosfin toksisitesi için diğer bir durum, fosfinin reaktif oksijen türleri (ROS)'nin oluşumunu indüklemeye kabiliyetine dayanır. Fosfin maruziyetine tepki olarak üretilen ROS kaynağı olarak iki model önerilmiştir. Birincisi, mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki (ETC) son kompleksin kısmi inhibisyonu olan sitokrom c oksidaz, elektronların ETC üzerinden hareketinin yavaşlamasıdır. Buna göre, ETC komplekslerinden moleküler oksijene uygun olmayan elektron transferinin olasılığını arttırdığı ve bunun sonucunda süperoksit (O_2^-) radikalinde kısmi azalma sağlandığı, ayrıca fosfin ile sistein arasında reaktif disülfid'te doğrudan bir redoks ilişkisi olması nedeniyle fosfin, glutatyon redüktaz enzimini engelleyerek sistein'deki sülfid bağlarını parçalamaktadır (Nath vd., 2011). Sonuç olarak, toksisite bir metabolik krizin, ROS'in oluşumunun sonucudur. Zuryn vd. (2008), fosfinin toksisite mekanizmalarının anlaşılmadığını bildirmektedir. Ancak, fosfinin mitokondri üzerindeki etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada, fosfinin mitokondriyal morfolojiyi hızla bozduğunu, oksidatif solunumu %70 inhibe ettiğini, maruziyetin 5 saati içinde mitokondriyal membran potansiyelinde ciddi bir düşüşe neden olduğunu, mitokondriyal genom kopyasına sahip olan mutant hayvanlarda oksijen tüketiminin %70 azaldığını tespit etmişlerdir. Çalışma, fosfinin mitokondriyi hedeflediğini, metabolizmayı etkileyen birçok faktörün ve özellikle mitokondriyal fonksiyonun, fosfin toksisitesi üzerinde doğrudan etkiye sahip olduğunu doğrulamıştır. Mitokondriyal membran potansiyeli, mitokondriyal

solunum zincirindeki elektron akış hızı, ATP seviyeleri, metabolik arz talebi ve mitokondriyal üretilen oksidatif stress, fosfin direncini etkileyecek metabolik faktörlerdir. Mitokondriyal solunum zinciri genlerinin bastırılmasının fosfin direncinde 10 kat artışa neden olduğu ve mitokondriyal işlevin fosfin hassasiyetini etkilediği bildirmektedir (Zuryn vd., 2008).

Fosfinin uzun süreli kullanımı sonucu depolanmış ürün zararlılarında direnç gelişimine sebep olduğu bilinmektedir. Dünya genelinde 1972-73 yıllarında FAO'nun yapmış olduğu araştırmalar sonucunda alınan böcek örneklerin %10'unun fosfine dirençli olduğu tespit edilmiştir. Fosfin direnci görülme oranı göz önüne alındığında özellikle *R. dominica* (F.) ve *Tribolium* türleri en yüksek düzeyde bulunmuştur (Champ ve Dyte 1976; Taylor 1989). Bu türlerle ilgili Bangladeş (Tyler vd., 1983), Hindistan (Rajendran, 1992), Çin (Ren vd., 1994), Avusturalya (Collins, 1998), Filipinler (Acda, 2000) ve Brezilya (Ansell vd., 1990) gibi ülkelerde de fosfine karşı yüksek düzeyde direnç geliştiği tespit edilmiştir.

Böceklerde direnç terimi, ilk kez Melander isimli bir araştırmacı tarafından Journal of Economic Entomology'de yayınlanan "Can insects become resistant to sprays?" adlı yayında, 1908 yılında San Jose Kabuklubitinin her zaman kullanılmakta olan kükürt-kireç karışımından eskisi kadar etkilenmediğinin tespitiyle farkına varılmıştır (Melander, 1914). 1990'larda 500'ün üzerinde türün dirençli hale geldiği kaydedilmiştir (Soderlund ve Bloomquist 1990). Günümüzde 586 böcek türünün 325 insektisite karşı direnç kazanmış olduğu belirtilmektedir (Sparks ve Nauen, 2015). Ürünlere zarar veren böcek popülasyonları arttıkça, üreticiler zararı azaltabilmek için bu duruma pestisit kullanımı ile karşılık vermektedir. Sonuçta, zararlılar pestisitlere karşı dirençli hale gelmekte ve dirençli böcekler artık kontrol edilememektedir. Bu durum ise pestisit uygulama sayısının, sıklığının ve dozunun artmasına neden olmaktadır. Tüm bunların sonucunda da insan ve çevre sağlığı olumsuz yönde etkilendiği gibi ekonomik olarak maliyetler artmaktadır.

Direnç konusunda yapılmış farklı tanımlar bulunmaktadır. Ancak, IRAC'a göre direnç, 'bir zararlı böcek türüne karşı pestisit etiket önerisine göre kullanıldığında, tekrarlanan bir başarısızlık görülmesi ve beklenen başarının sağlanamaması ve zararlı popülasyonun duyarlılığındaki kalıtsal değişiklik' olarak tanımlanmaktadır (Anonim 2016). Birçok böcek ve akar türünde hızlı direnç gelişiminden, zararlıların genetik yapıları ve yoğun pestisit uygulamaları sorumlu tutulmaktadır. İnsektisitlerin kullanımıyla oluşan doğal seleksiyon nedeniyle, direnç genlerine sahip bazı böcekler hayatta kalmakta ve direnci nesillerine aktarmaktadırlar. Hassas böcekler insektisitler tarafından elimine edilirken, popülasyondaki dirençli böceklerin oranı artmakta ve pestisitler artık etkili olamamaktadır. İnsektisit direncinin gelişmesi böcekten ve mücadelede uygulanan faktörlerden kaynaklanabilmektedir (FAO, 2012; FAO, 2017b). Böcekten kaynaklanan faktörler;

1. Böcekler tarımsal faaliyetler sırasında birçok uygulamaya maruz kalmaktadır. Bu uygulamalar sırasında hayat döngüsünün kısılması birçok uygulamadan etkilenmemesini sağlar ve direnç gelişimini hızlandırır.
2. Yüksek bulaşmalarda ve popülasyonun hızlı artması, mücadelenin başarılı olması halinde bile çok sayıda bireyin canlı kalması direnç gelişimine neden olmaktadır.
3. Dişilerin çok sayıda birey meydana getirmesi, popülasyonların yeniden oluşmasını sağlar ve direnç gelişimini teşvik edebilir.
4. Böceklerin çok sayıda konukçuya sahip olması; yılda birkaç ürün üzerinde bulunarak direnç gelişimi hızlanmaktadır.

İnsektisit uygulamasından kaynaklanan faktörleri ise;

1. İnsektisitlerin yetersiz kaplaması dirençli heterozigotların hayatta kalmasını ve dolayısıyla dirençli genlerin frekansını arttıran düşük kullanım oranıyla aynı etkiyi göstermektedir.
2. İnsektisitlerin uygulamasında yanlış zamanlama, böceklerin döneminin uygun olmadığı zamanlarda uygulanması heterozigot bireylerin seçilmesine

ve yetersiz mücadele nedeniyle çok sayıda dirençli bireyin canlı kalmasına neden olmaktadır.

3. Kimyasal olarak sadece bir sınıfa ait bileşiklerin kullanılması direnç gelişimini artırmaktadır.
4. Etki süresi uzun olan insektisitlerin kullanımı ilerleyen dönemlerde yetersiz etkidten dolayı heterozigot bireylerin hayatta kalmasına sağlayacak şekilde parçalanır ve böylece direnç genlerinin frekansını artırır.
5. Geniş spektrumlu insektisitlerin kullanımı, parazitoit ve predatörlerin ölümüne neden olduğundan dolayı, hedef zararlının direncinin artmasına neden olabilir diye sıralanmıştır (FAO, 2012; FAO, 2017b).

Fosfin kullanım kolaylığı, maliyetinin düşük olması, kalıntı sorunun önemli düzeyde olmaması gibi birçok avantaja sahip olması yanı sıra önemli bir dezavantaj zararlıların bu kimyasala karşı direnç geliştirebilmesidir. Depo zararlılarının 45'ten fazla ülkede fosfine karşı direnç geliştirdiği tespit edilmiştir (Zettler ve Keever, 1994; Benhalima vd., 2004; Pimentel vd., 2010). Direnç oluşumu, depolarda normal kullanımda uzun sürede meydana gelebileceği gibi, fümigasyonun düzgün yapılmaması, konsantrasyonun takip edilmemesi ve sızdırmazlığın sağlanmaması sonucu da oluşabilmektedir. Bazı depolarda ise çok sık fümige edildiği için seleksiyon baskısıyla mücadeleden sonuç alınamamakta ve yüksek doz fosfin kullanımı da dirençli bireylerin meydana gelmesine olanak sağlamaktadır (Collins vd., 2005; Lorini vd., 2007). Bugüne kadar fosfin direncinin mekanizmaları konusunda bazı düşünceler ileri sürülmüştür. İlk olarak fosfin emiliminin azaltılmasından direncin olabileceği öne sürülmüştür, buna göre böceklerde dirençli bireylerin hassas olanlara kıyasla daha az fosfin emdiği (Price, 1984). Daha sonra canlı dirençli böceklerin fosfin gazını solunum sisteminden attığı öne sürülmüştür (Chaudhry, 1997). Bir araştırmada fosfine dirençli böceklerin hassas bireylere oranla daha fazla fosfin emilimine karşın, fosfini metabolize ederek hipofosfit olarak atması diğer detoksifikasyon mekanizmalarının varlığını da ortaya koymaktadır (Chaudhry ve Price, 1989). Detoksifikasyon çalışmalarında ise *R. dominica* ve *T. castaneum* daki yüksek düzeyde fosfin direnci, sitokrom P450

monooksijenazların, toksik maddeyi hedef bölgeye ulaşmadan önce toksik olmayan bir forma dönüştürmeyle ilgili tezi ortaya çıkarmıştır. Ancak P450'ye bağlı monooksijenazların bilinen inhibitörleri olan sinerjistler piperonil butoksit ve SKF 525 A (2- (dietilamino) etil 2,2 difenilvalerat) *T. castaneum*, *S. granarius*'a fosfinin toksisitesi üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığı görülmüştür (Rajak ve Hewlett, 1971). Fosfin direncinin oluşmasına neden olan diğer bir hipotez ise oksidatif metabolizmanın önlenmesi olarak öne sürülmüştür. Bazı çalışmalar fosfinin oksijensiz ortamda toksik olmadığını göstermektedir (Bond, 1963; Kashi and Bond, 1975; Banks ve Annis, 1990; Cheng vd., 2003; Kuang vd., 2008). Bu nedenle dirençli böceklerin, oksidatif solunumunu azaltarak ve enerji talebini desteklemek için anaerobik metabolizmayı başlatarak fosfine duyarsızlaşabileceği düşünülmektedir. Depolanmış ürün böceklerinin metabolik oranda azalan oksijen ve artmış karbon dioksit atmosferine toleranslı oldukları bilinmektedir (Banks ve Annis, 1990; Mitcham vd., 2006). Ayrıca, böcekler pupa, yumurta veya diyapoz dönemlerinde trakealarındaki oksijen konsantrasyonunu düzenleyebilir (Hetz ve Bradley, 2005). Schlipalius vd., (2006), dirençli böceklerde fosfine karşı hedef bölgenin modifikasyonu veya duyarsızlığını ilişkilendirerek, dirençli böceklerin mitokondriyal oksidatif solunum yollarını inhibe ederek ve anaerobik solunuma geçiş yaparak fosfinin toksik etkisini azaltabileceğini ileri sürmüştür. Cheng (2003), fosfine dirençli *Caenorhabditis elegans*'ın fosfin toksisitesini doğrudan oksijen metabolizmasının azalmasına bağlı bir mekanizma ile önlediğini göstermiştir. Fosfin toksisitesinin kesin mekanizması belirlenmeye çalışılmakla birlikte, metabolizmayla fosfin direnci arasında bir ilişki vardır. Son çalışmalar da fosfin direncinin metabolik temelli olduğunu göstermektedir. *R. dominica*, *T. castaneum*'da rph2 geni olarak ve fosfin direnci için bir gen olan dihidrolipoamit dehidrogenaz (DLDH) 'nın belirlenmesidir (Schlipalius vd., 2012). DLDH, trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün bileşeni olan dört protein kompleksinin bir altbirimi (Carothers vd., 1989) ve enerji metabolizmasında yer alan flavine bağımlı bir oksidoredüktazdır (Patel ve Roche, 1990). DLDH, piruvat dehidrojenazın bir alt birimi, TCA döngüsü içinde anahtar bir enzimdir. Dormant dönemin uyarılmasında rol oynayan piruvat

dehidrojenaz inhibitör regülatörü olan piruvat dehidrojenaz kinaz (pdhk), fosfin maruziyetinden sonra yükseltgenir ve bu da enerji metabolizmasında fosfin toksisitesinin rolünü belirler. Fosfinin toksik etkisinin enerji metabolizması ile ilişkili olduğu, lipid ve karbonhidrat metabolizmasına katılan genler ile desteklendiği ileri sürülmüştür (Jagadeesan, 2010). Depo zararlısı koleopterlerde yapılan çalışmalarda fosfin direncinin ana nedeninin, rph2 olarak tanımlanan ve oldukça korunmuş metabolik bir gen olan dihidrolipoamid dehidrojenaz (DLD) geninde meydana gelen mutasyon olduğu, rph1 geninin zayıf direnç nedeni olduğu, diğer genlerin ise doğrudan fosfin direncine neden olamayacağı bildirilmektedir (Mau vd. 2012a, 2012b; Jagadeesan vd., 2012; Schlipalius vd., 2012).

Farklı kın kanatlı familyalarına bağlı olmalarına rağmen *T. castaneum* ve *R. dominica* türleri arasındaki genotipik benzerlikten yola çıkılarak, fosfin direncinde rol oynayan mekanizmaların birbirine benzer olduğu vurgulanmaktadır (Jagadeesan vd., 2012). Fosfin direncinin tanımlanmasına ilave olarak, rph2 olarak tanımlanan DLD geninde prolin'in serin'e dönüşmesiyle meydana gelen mutasyonun, fosfin direncinin nedeni olduğu, rph1 geniyle birlikte bulunması durumunda ise kuvvetli dirence neden olduğu tespit edilmiştir. İlaveten, bu genlerin oldukça korunmuş bölgeler olduğu bilinmektedir (Schlipalius vd., 2012). Jagadeesan vd. (2012) *T. castaneum*'da rph1'in kromozom 8 ve rph2'nin ise kromozom 9 üzerinde olduğunu bildirmektedirler.

Fosfine karşı direncin ortaya çıkması fosfinin sürdürülebilir kullanımını tehdit etmektedir. Dolayısıyla, fosfinin depolanmış ürün zararlılarına etkinliğinin korunması ve sürdürülebilir kullanımının sağlanması için zararlılarda fosfine karşı meydana gelen direnç durumunun belirlenmesi önemlidir. Bununla birlikte direnç mekanizmalarının anlaşılması, direnç gelişiminin önlenmesi ve izlenmesi fosfin kullanımında yeni stratejilerin oluşmasını sağlayacaktır. Böceklerde fosfin direncini izlemede hız kazandıracak olan moleküler markerlerin belirlenmesi önemlidir. Zararlı böcek popülasyonlarında insektisitlere karşı direncin ekolojik genetiğinin çalışılabilmesi ve direnç

yönetim stratejilerinin geliştirilebilmesi için dirence neden olan genlerin belirlenerek tanımlanmaları gerekmektedir. Zararlı bir böcekte fosfin direncinin moleküler temellerinin anlaşılması ile direnç yönetiminin geliştirilebileceği, yeni sinerjistlerin tanımlanması ya da bileşiklerin bulunması için yapılacak harcamaların da azalacağı bilinmektedir (Bell, 2000; Zettler ve Arthur, 2000; Rajendran, 2001; Chaudhry vd., 2004). Dünya’da bugüne kadar fosfin direncinin gen düzeyinde belirlendiği zararlıların başında *R. dominica* ve *T. castaneum* gelmektedir. Ülkemizde stratejik olarak üretilen ve depolanan hububatın zararlılarından *R. dominica* mücadelesinde kullanılan fosfine karşı direnç düzeyinin toksikolojik ve moleküler yöntemlerle tespiti ve izlenmesi uygun direnç yönetim stratejilerinin geliştirilmesinde önemli rol oynayacaktır. Dünyada özellikle son 50 yıldır insektisitlere direnç konusunda gerek biyokimyasal gerekse moleküler biyoloji alanında araştırmalar yapılmaktadır. Ülkemizde ise bu konuyla ilgili yapılan araştırmalar sınırlıdır. Türkiye’deki hububat depolarının yapısal özellikleri dikkate alındığında dirençli bireylerin ortaya çıkması kaçınılmazdır. Dirençli böceklerin yayılmasındaki önemli bir etkende ürünlerin uluslararası taşınması sırasında dirençli türlerin ürün veya taşıma aracı ile birlikte taşınmasıdır (Benhalima vd. 2004). FAO, (2017a) ithalat verilerine göre Türkiye 2012-2017 yıllarında ortalama 6315 ton hububat ithal etmiştir. Oluşan bu sirkülasyonda fosfine dirençli bireylerin ülkemize girmemesi kaçınılmaz görünmektedir. Özellikle ambarlarda fosfinle yapılan fumigasyon uygulamalarından istenilen sonucun alınmadığına dair şikâyetler gelmektedir. Türkiye’nin dünyada hububat üretimindeki konumu, hububata arız olan zararlı popülasyonları ve bu zararlılarla mücadelede sadece bir adet fumigant maddenin bulunması dikkate alındığında fosfin kullanımının sürdürülebilirliğini sağlamak amacıyla direnç tespitinin yapılması önem kazanmaktadır. İnsektisit direnç sorununun çözümü için direnç yönetim programlarının geliştirilmesi ve pestisitlerin bu programlar kapsamında kullanılması gerektiği vurgulanmaktadır (Soderlund ve Bloomquist 1990). Bölgesel veya lokal düzeylerde direnç taraması yapılarak, zararlıların direnç durumunun ortaya çıkarılması, söz konusu programların ilk basamağını oluşturmaktadır (Croft, 1990). Bu tez çalışmasında, *R. dominica*’nın, Türkiye’nin

farklı illerindeki popölasyonlarının fosfine karşı direnç durumu ve direnç mekanizmaları araştırılarak, fosfine karşı direnç kaynağı ile bağlantı gösteren genler moleküler markerler kullanılarak belirlenmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Türkiye'nin tarımsal yapısı içinde bu denli önemli bir yeri olan hububat, depolama döneminde birçok zararlının saldırısına uğrayarak zarar görürler. Türkiye'de *Sitophilus* spp., *Tribolium* spp., *Rhizopertha dominica*, *Trogoderma granarium*, *Oryzaephilus surinamensis* ve *Ephesia kuehniella* gibi depo zararlılarının özellikle buğdayda depolanma sırasında ağırlık, çimlenme ve kalite kayıplarına neden olduğu bildirilmektedir (Erakay, 1974; Özer vd., 1989; Anonim, 1995).

Emekçi ve Ferizli (2000) hububat zararlılarının hububatta %10 zarara sebep olduğunu, *Sitophilus* spp., *Trogoderma granarium*, *Sitotroga cerealella* ve *Rhizopertha dominica*'nın primer zararlılar olduğu, *Trogoderma granarium*'un Güney ve Güneydoğu Anadolu'da yaygın olduğunu, diğerlerinin ise kozmopolit zararlılar olduğunu belirtmişlerdir.

Şayeste (1971) *R. dominica*'nın çeşitli ekolojik şartlarda biyolojisi incelemiş bu türe değişik sıcaklık ve orantılı nemde alüminyum fosfidin etkilerini araştırmıştır. Yazar ergin böceğin ortalama 2,24 mm boyunda olduğunu belirtmektedir. Erginlerin en az 1, en fazla 20 ve ortalama 4,5 gün sonra yumurta bırakmaya başladığını tespit etmiştir. Erginlerde yaşam süresinin 83 gün olduğunu ve ortalama 314 yumurta bıraktığını bildirmektedir. 25 °C de 9 g fosfin tablet/m³ dozda 24 saat uygulama sonucunda böceğin bütün dönemlerinde %100 ölüm sağlandığını tespit etmiştir.

Flinn vd. (2000), *R. dominica*'nın erginlerine 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 °C sıcaklıklarda 180 ppm (0,25 g/l) dozunda fosfin uygulanmış ve LT₉₅ değerleri elde edilmiştir. 15 °C sıcaklıkta erginlerde 1.2 günlük uygulama sonrası %95 ölüm tespit edilmiştir. 20 °C sıcaklıkta 0.7 günlük uygulama süresinin ve 25 °C sıcaklıkta ise 0,3 günlük uygulama süresinin % 95 ölüm meydana getirdiği bildirilmektedirler.

Philips vd. (1998), *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), *R. dominica*, *Sitophilus oryzae*, *Tribolium castaneum* ile 18 ve 32 °C sıcaklıklarda

200 ppm fosfinin (EcoFume = %2 fosfin+ %98 CO₂) yumurta, pupa ve ergin evreleri üzerindeki letal etkileri üzerine yapılan bir araştırmada; her üç türün erginlerinin sekiz saatlik uygulama sonrasında tamamen öldüğünü tespit etmişlerdir.

Cao vd. (2004), Çin'in değişik bölgelerinden toplanan *Sitophilus zeamais*, *S. oryzae* ve *R. dominica* erginlerinde fosfin konsantrasyonu ve uygulama zamanının etkileri üzerine yaptıkları çalışmada; *S. oryzae* ve *R. dominica*'da fosfine karşı direncin yaygın olmasına rağmen, *S. zeamais*'ta ise herhangi bir direnç tespit edilmemiştir. Hassas ve dirençli bireylerle, Çin'den toplanan bireyler 20-144 saat 25°C ve 70% nemdeki uygulamalarda LT_{99,9} değerleri karşılaştırıldığında; Çin'den toplanan bireylerin direnç katsayılarının daha yüksek tespit edildiğini bildirmektedirler.

Rajendran vd. (2001), *R. dominica*'nın dirençli ve hassas ırklarının 0-24 saat yaşlı yumurtaları ve erginlerinde 24, 28 ve 120 saatlik uygulama sürelerinde farklı fosfin (PH₃) konsantrasyonlarındaki ölümleri belirlemişlerdir. Araştırmacılar, ölümlerin maruziyet süresinin artmasına paralel olarak arttığını; örneğin 0,25 mg/l PH₃ konsantrasyonunda hassas ırkta yumurta ölüm oranının 24 saatlik uygulamada %71,3 ve 48 saatlik uygulamada ise 95,8 olduğunu; dirençli ırkta ise ölüm oranlarının 24 saatlik uygulamada %7,6 ve 48 saatlik uygulamada ise %0,0 olduğunu; fakat 0,1 mg/l konsantrasyonda 120 saatlik uygulamada ölüm oranının %99,6 olduğunu belirlemişlerdir. Ergin evre ile yapılan çalışmalarda ise 48 saatlik uygulamada LD₉₉ değerinin hassas ırkta 0,303, yumurta evresi için ise LD₉₉ değerinin 0.56 mg/l olduğunu; dirençli ırkta bu değer ergin için 6,44 ve yumurta evresi için ise 3,25 mg/l olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar dirençli olmayan ırklarda ergin evrenin en hassas evre olduğunu, fakat dirençli ırkta ise bunun aksine ergin evrenin daha dayanıklı olduğunu bildirmektedirler.

Opit vd. (2012), Oklohoma'nın farklı coğrafik bölgelerinden toplanan *T. castaneum* ve *R. dominica* popülasyonlarının fosfine karşı direnci üzerinde yapmış oldukları çalışmada; ayırıcı doz denemelerinde direnç frekansları *R.*

dominica için %98, *T. castaneum* için %94 bulunmuştur. Doz karşılaştırma testlerinde LC_{99,9} hassas *T.castaneum* popülasyonunda 3 ppm, dirençlilerde 377 ppm, hassas *R. dominica* popülasyonlarında LC_{99,9} 2ppm, dirençlide ise 3.430 ppm olarak belirlenmiştir. En dirençli olarak *T. castaneum*'da 119 kat ve *R. dominica*'da ise 1,5 kat direnç tespit etmişlerdir.

Collins vd. (2005), *Rhyzopertha dominica*'nın fosfine hassas ve dirençli iki ırkında fosfinin etkinliğini bir dizi uygulama süresi ve fosfin konsantrasyonlarında araştırmışlardır. Fosfine dirençli popülasyonda tüm evrelerini içeren karışık yaşlı örnekler ile yapılan çalışmada 0,15 mg/l (107,7 ppm) dozda fosfinle muamelede LT_{99,9} 12,74 gün ve 0,3 mg/l (214,4 ppm) dozda fosfin muamelesinde LT_{99,9} değeri 7,144 gün olarak saptanmıştır.

Rajendran vd. (2001), *Rhyzopertha dominica*'nın hassas ve dirençli ırkında fosfinin yumurta evresi (0-24 saatlik) ile erginlerine etkinliğini 27°C sıcaklık ve %55 orantılı nem koşullarında çalışmıştır. Ergin 48 saatlik sürede değişik dozlarda fosfinle muamelelerde hassas ırkta LD₅₀ 0,002 ve LD₉₉ 0,303 mg/l; dirençli ırkta ise LD₅₀ 1,79 ve LD₉₉ ise 6,44 mg/l olarak belirlenmiştir. Hassas ırkın yumurtalarında 24 ve 48 saatlik uygulamada, yumurta açılımındaki gecikme özellikle ilk dört gün içerisinde görülmüş ve bu sürelerdeki yumurta açılımı kontroldekine oranla daha düşük olarak belirlenmiştir. Dirençli ırkın yumurtalarında 24 saatlik uygulamada 3 ve 4 mg/l fosfin dozunda 1. ve 2. günde; 48 saatlik uygulamada 2-4. günlerde ve 120 saatlik uygulamada ise 2-5. günlerde görülmüş ve bu sürelerdeki yumurta açılımı kontroldekine oranla daha düşük olarak belirlenmiştir.

Pimentel vd. (2010), Brezilya 'daki *T. castaneum*'un 13 popülasyonu, *R. dominica*'nın 10 popülasyonu ve *O. surinamensis*'in sekiz popülasyonunda fosfin direncini araştırmışlardır. Denemelerde FAO standart metodu kullanılmıştır. Ayırıcı dozların etkisi ve coğrafik dağılıma göre direnç durumları arasında korelasyon aramışlardır. Her üç türde de ayırıcı dozlarda %90'ın üzerinde ölüm görülmemiştir. Ayırıcı dozda mortalite *R. dominica* ve *O. surinamensis* türlerinde coğrafi uzaklığa göre artmıştır. Bununla birlikte, *T. castaneum* popülasyonları

için değişkenler arasında belirgin bir linear tepki gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, *R. dominica* ve *O. surinamensis* popülasyonlarında fosfin direncinin oluşumunun böceklerin seleksiyonu ile ilgili olduğunu ortaya koymuştur. *T. castaneum* popülasyonlarındaki fosfin direncinin evrimini belirleyen faktörlerin ise hububat ticaretinden dolayı oluşan hareketlilik ve seleksiyondan kaynaklandığını bildirmektedirler.

Song vd. (2011), Çin'de 16 adet *R. dominica* popülasyonunda fosfin direnç seviyesi belirlemek için FAO standart metodunu kullanarak *R. dominica* popülasyonlarının LC₅₀ değerinin 0.017 - 4.272 mg/L arasında değişmekte olduğunu tespit etmişlerdir. Popülasyonlardan, beşi düşük dirençli, altısı orta dirençli ve beşi yüksek dirençli olarak sınıflandırmışlardır.

Lorini vd. (2007), Brezilya'da yürütmüş oldukları çalışmada, *R. dominica*'nın hassas ve dirençli ırkları ile Brezilya popülasyonunun 20 ve 48 saatlik sürelerde fosfine maruz bırakılmaları sonucu, popülasyonun 14'ünün kuvvetli dirençli ve beşinin ise zayıf dirençli olduğu belirlenmiştir. Örneğin bazı arazi popülasyonlarının 0,1, 0.5 ve 1 mg/l dozda LT_{99,9} ve ölüm zamanları (TPE) 21.0, 6.4, 3.7, 17.0, 6.2 gün olarak karşılaştırılan kuvvetli dirençli popülasyonla aynı seviyede bulunmuştur. Her iki popülasyonda da iki kat dozda LT_{99,9} ve TPE sağlanabilmiştir.

Lorini ve Collins (2006), 1991 ve 2003 yılları arasında Brezilya'nın güneyindeki fosfin uygulamalarının başarısızlığından dolayı, ayırt edici dozlar kullanarak fosfine karşı direnç durumunu çalışmışlardır. Test edilen 19 numunenin beşinde zayıf direnç, 14'ünde ise kuvvetli direnç tespit etmişler. Yazarlar Brezilya'da fosfin direncinin yüksek olduğu popülasyonların yaygın olduğunu bildirmektedirler. Fosfin direncini yönetmek için fümigasyon ve zararlı yönetimi uygulamalarının geliştirilmesine acil ihtiyaç olduğu kanaatine varmışlardır.

Collins vd. (2002), tarafından Queensland (Australia)'dan toplanan *R. dominica*'nın iki ırkının fosfine karşı kalıtsal direnci çalışılmış ve dirençler

Zayıf Direnç (ZD) ve Kuvvetli Direnç (KD) olarak sınıflandırılmıştır. ZD ve KD gösteren bireyler referans olan hassas (H) ırka göre sırasıyla ZD'liler 20 saat maruz kalmada 23,4 kat, KD'liler 48 saat maruz kalmada 600 kat daha dirençli bulunmuştur. Her bir dirençli ırk ile hassas ırk çaprazlanmış ve elde edilen F₁, F₂, and F₁-backcross (F₁-BC) nesillerinin fosfin gazına olan tepkisi ölçülmüştür. Resiprokal F₁ nesli ile yapılan testten elde edilen veriler incelendiğinde, ZD'in otozomal olduğu ve dominantlık derecesinin -0,96 olduğu belirlenmiştir. Modifiye edilmiş Ki-kare ve olasılık (contingency) analizleri ile F₁-BC ve F₂ nesillerinde fosfin gazına olan tepkiler incelendiğinde direncin tek bir genden sorumlu olduğunu iddia eden hipotez reddedilmiştir. KDxH ırlardan elde edilen F₁, F₂, and F₁-BC nesillerinin fosfine yanıtları incelendiğinde de direncin tek bir genden kaynaklandığı hipotezi yok sayılmıştır. KD gösteren ırlarda autosomal ve tamamlanmamış resesif derecesinin -0,64 olarak bulunmuştur. F₁ ve F₂ nesillerinin resiprokal çaprazlanması göstermiştir ki; KD fenotipi, ZD genotipinde bulunan majör eksik resesif genlerin kombinasyonu ile kodlanmıştır. Ayrıca KD bireylerde ~%5 dominant bir gen bulunduğu ortaya konulmuştur.

Benhalimaa vd. (2004), Fas'ta depolanmış buğdayda en önemli üç zararlıya karşı fosfin direnci olup olmadığının araştırmasını yapmışlardır. Alınan örneklerden %32'si bir ya da daha fazla depolanmış ürün zararlısıyla bulaşık olarak bulunmuştur. Arazi popülasyonlarından elde edilen ilk nesil erginler FAO metodu kullanılarak ayırıcı doz testleri yapılmıştır. Sonuçlarda *S. oryzae*'nin bir popülasyonu hariç bütün popülasyonları fosfine karşı direnç göstermiştir. Fosfin uygulamaları 20 saatte 1.8 g m⁻³ ve 0,5 günde 18 g m⁻³'de yapılmıştır. Bu uygulamalarda bazı popülasyonlarda yüksek dereceli direnç olduğu belirlenmiştir.

Collins vd. (2005), tarafından *R. dominica*'nın ergin ve diğer dönemlerinden oluşan ve kuvvetli direnç gösteren karışık popülasyonu 25 °C'de bir seri belirli konsantrasyonlarda fosfin gazına maruz bırakılmıştır. Hassas ırk ve zayıf dirençli ırk da ayrıca test edilmiştir. Popülasyonun ölmesi için geçen zaman (TPE) ve lethal time (LT_{99.9}) hesaplanmıştır. Fosfine maruz kalma süresi ve

konsantrasyon arasındaki ilişki dirençli ırklarda şu şekilde bulunmuştur: KD'li ırk için; $LT_{99,9}C^{0.5457}t=3.852$ ve $TPE C^{0.6105}t=4.0404$, ZD'li ırk için; $LT_{99,9}C^{0.3553}t=3.6521$ ve $TPEC^{0.4507}t=3.4833$ olarak bulunmuştur. Sonuçlar KD gösteren popülasyonların kontrolü için gerekli minimum maruz kalma süresi x konsantrasyon sınırlarını ortaya koymuştur. Örneğin 1, 0.3 ve 0.2 mg/l fosfin dozları sırasıyla 5, 10 ve 14 günde tam bir kontrol sağlamaktadır. Bu sonuçların, sonraki ruhsatlandırmalarda fosfin gazı oranlarının tavsiyesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Daglish vd. (2002), fosfin direncinin kalıtımı, 'Zayıf-R' ve 'Güçlü-R' olarak etiketlenen *R. dominica*'nın iki suşunda incelenmiştir. Zayıf-R ve Güçlü-R, referans hassas bir popülasyon ile karşılaştırıldığında sırasıyla 23,4 kez (20 saat) ve 600 kez (48 saat) fosfine dirençli olduğu. Güçlü-R türlerindeki direncin otozomal ve tam olarak -0.64 derece ile resesif olmadığını, Güçlü-R bireylerin yaklaşık % 5'inde küçük bir dominant gen bulunduğunu bildirmiştir.

Ebert vd. (2003), fosfine karşı yüksek dirençli olan *R. dominica*'da hem klasik hem de ileri moleküler teknikler kullanarak direnç mekanizmasını incelemişlerdir. Yapılan çalışmada direncin iki önemli gen tarafından kontrol edildiği ortaya konulmuştur. İlk genin yıllardır *R. dominica* popülasyonunda bulunduğunu, ZD'ten sorumlu olduğunu ve düzgün bir fumigasyon ile direncin kontrol edilebildiğini göstermişlerdir. Daha sonra KD gösteren böcekler ilk kez 1997'de tespit edilmiştir. Bu böceklerde zayıf direnci kontrol eden genin yanı sıra bir gen daha ortaya konulmuştur. İkinci genin kendisine ait direnç üzerinde çok az etkisi olmasına karşın ilk gen ile birleştiğinde etkisini oldukça arttırdığı tespit edilmiştir. Direnç ile mücadelede fumigasyonun tam etkili olması gerektiğini belirterek, eğer eradikasyon yapılamadıysa böcek popülasyonu içinde direncin hızlı bir şekilde kendini tekrardan oluşturacağına işaret etmişlerdir.

Mau vd. (2012 a ve b), *R. dominica* ile yıllar boyunca fosfin fumigasyonu ile başarılı bir şekilde mücadele edildiğini ancak birçok ülkede bu zararlıya karşı kuvvetli direnç görülmesinin bu uygulamanın kullanılabilirliğini

sınırlandıracağını belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada; Avustralya'nın üç değişik coğrafi bölgesine [Queensland (SRQLD), New South Wales (SRNSW) and South Australia (SRSA)] yayılan ve kuvvetli direnç gösteren *R. dominica* ile daha önce yapılan genetik analizlerde her üç ırkta da rph1 geninde direnç aleli olduğu bulunmuştur. Hali hazırdaki çalışmalarda, rph1 geni Queensland'dan alınan dört kuvvetli dirençli ırkta (SR2QLD) bulunmuştur. Daha önce açıklanan rph2 geni ki bu gen sinerjistik olarak rph1 geni ile birleşerek, SRQLD and SRNSW ırklarında kuvvetli direnç meydana getirmektedir. Araştırmacılar Rph2 geninin zayıf alellerinin rph1 geni ile birleştiğinde SRSA ve SR2QLD ırklarında kuvvetli direnç fenotipi meydana getirdiğini belirtmektedirler. Rph1 ve rph2 genleri dirençli fenotip gösteren tüm *R. dominica* ırklarında bulunmuştur. Dört KD'li hattı kullanarak hibritleme ile yeni bir ırk oluşturarak yüksek fosfine maruz kalan ve yaşamını sürdürebilen bireyler kullanılarak yapılan tekrarlamalı denemelerde çok hafif bir miktarda direnç artışı olmuştur. Buna neden olarak genetik değişimin tekli diziliminin bu böceklerde direnç gelişiminden sorumlu olabileceği belirtilmektedir.

Collins vd. (2002) ve Schlipalius vd. (2002), *R. dominica*'daki direnç haritasını çıkarmışlar ve Schlipalius vd. (2002) kuvvetli direncin Queensland'dan kuvvetli dirençli suşta (QRD569) rph1 ve rph2 olarak adlandırılan iki lokus tarafından sağlandığını tespit etmişlerdir. Bu durum Collins vd. (2002) tarafından doğrulanmıştır. Avustralya'da *R. dominica*'nın fosfine karşı direncini kuvvetli ve zayıf direnç olarak ifade etmişlerdir. Devam eden genetik ve moleküler çalışmalar sonucunda zayıf direncin tek bir majör gen Rph1 tarafından kontrol edildiğini, Rph 1 geninin Rph 2 geni ile birleşerek kombinasyon oluşturduğunu ve kuvvetli dirence de aracılık ettiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca Rph1 ve Rph2 geninin resesif birbirine yakın sadece homozigot böceklerde tam fosfin direncinin olduğunu, bunları ayrı ayrı bulunmasının zayıf dirence işaret ettiğini bildirmişlerdir.

Schlipalius vd. (2006), homozigot izolasyonda farklı bireylerde bulunan rph1 (~30x) ve rph2 (~12x) lokusunun zayıf direnç sağladığını ancak rph2 birlikte

rph1 homozigot olarak bulunursa sinerjik etkileşime girererek (>250x) iki farklı direnç mekanizmasının ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Schlipalius vd. (2008), rph2'yi haritalayarak, dirençle bağlantılı bir genetik markörün geliştirilmesini sağlamışlardır. Rph2 aleline bağlı rp5.11 markerü (dominant marker) klonlanıp, dizilenmiş ve STS5.11 adında ko-dominant markere dönüştürülmüştür. Bu ko-dominat markerler dirençli bireylerin belirlenmesinde genotipik seviyede başarılı şekilde kullanmıştır.

Schlipalius vd. (2008), *R. dominica*'da fosfin direncinin gelişmesini engelleyen durumu araştırmışlardır. Zayıf direncin nasıl devam ettiğinin, tek majör direnç aleli rph1 vasıtasıyla elde edildiğini göstermişlerdir. KD'in aynı seviyedeki ikincil mutasyon yoluyla değil, iki ayrı lokusta ilave bir direnç aleli rph2'nin aşamalı olarak gelişmesi yoluyla ortaya çıktığı gösterilmiştir. Rph2 alelinin yarı-baskın fenotipi, heterozigotların hayatta kalmasını sağladığını ve hayatta kalan heterozigotların ardışık çiftleşmeleri ile homozigot yüksek dirençli yeni nesillerin meydana geldiğini bildirmektedirler.

Schlipalius vd. (2012), fosfin direncine hücre çekirdeğinde bulunan bir enzimin aracılık ettiğini tespit etmişlerdir. Genetik dirençten sorumlu polimorfizmlerin böceklerde (*R. dominica* ve *T. castaneum*) ve nematodlarda (*Caenorhabditis elegans*) redoks-aktif katalitik disülfid etrafında kümelendiğini veya DLD'nin dimerizasyon arayüzünü belirlemişlerdir. DLD, redoks-aktif bir metabolik toksin için direnç faktörünün yeni bir sınıfını temsil eden çekirdek bir metabolik enzimdir. Böceklerin fosfine maruz kalmalarının çekirdek metabolizmasını farklı şekilde etkilediğini bildirmektedirler. *C. elegans*'taki DLD'nin mutasyonunun arseniğe hassasiyetini artırdığını göstermiştir. Bu durumun fosfine dirençli böceklerle mücadelede kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence: Kesilip çoğaltılmış polimorfik diziler) restriksiyon enzimleriyle kesilen PCR ürünlerinin elektroforezde büyüklüklerine göre ayrılmasıyla fragmentlerin belirlenmesini amaçlayan bir tekniktir. Bu yöntem PCR-RFLP olarak da bilinir. PCR-RFLP analizinde ilk adım,

varyasyonu içeren bir fragmanın çoğaltılmasıdır. Bunu takiben, amplifiye edilmiş fragmanın uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilmesidir. Restriksiyon enzimi bölgenin varlığı veya yokluğuna göre, farklı boyutlardaki kesim fragmanlarının oluşumuyla sonuçlandığından alel tanımlaması, fragmanların kesilen gen bölgelerine özgü PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek, elektroforetik olarak görüntülenmesiyle yapılır. CAPS markırları gen bölgelerine özgüdür dolayısıyla homozigot-heterozigot alel ayrımı kolaylıkla yapılabilmektedir (Rasmussen, 2012).

Kaur vd. (2013), fosfin direnç alellerin, fosfin direnci ile solunum arasındaki ters ilişki nedeniyle, yürüyüş ve uçuş gibi enerji gerektiren aktiviteleri olumsuz etkisini incelemişlerdir. Test edilen *R. dominica*'nın kuvvetli dirençli, zayıf dirençli ve hassas bireyleri arasında yürüme süresinde belirgin bir farklılık gözlenmediğini bildirmişlerdir. *R. dominica*'da bilinen direnç alellerin böcek hareketliliğini etkilemediğini ve dolayısıyla dirençli böceklerin dağılımını engellemediğini bildirmiştir.

Malekpour vd. (2017), *T. castaneum*'da fosfin direncinin dağılma özelliklerini etkilediği, böceklerinin fosfin direnç durumu, kaynak lokalizasyon yeteneklerini ve uçuş aktivitelerini olumsuz etkilediği ve fosfine dirençli genlerin *T. castaneumun* hareket davranışı üzerinde pleiotropik etkileri olduğunu göstermiştir. Bu durumun ise fosfin uygulama alanlarının dışındaki fosfin direncinin yayılması ve gelişimi için etkilere sahiptir olduğu yapılan son çalışmalarda yayınlanmıştır.

Ahmad vd. (2013), Pakistan'da depolanmış hububat zararlılarının fosfine karşı direncini bioassay yöntemlerle belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada değişik bölgelerden toplanan *R. dominica* popülasyonlarından dördünün, hassas popülasyona oranla 86.5, 80.0, 78.6 ve 72.0 kat dirençli olduğunu tespit etmişlerdir.

Muralitharan vd. (2016), Hindistan'da hububat depolarından toplanan 23 farklı *R. dominica* popülasyonu iki ayırıcı doz (0.03 mg/l/20 saat zayıf direnç-0.25

mg/l/48 saat kuvvetli direnç) kullanarak direnç taraması yapmışlardır. Tüm popülasyonların fosfine karşı yüksek direnç gösterdiği, zayıf dirençli popülasyonun olmadığı belirlenmiştir. Fosfin direnç frekansı sırasıyla düşük ve yüksek konsantrasyonlarda yüzde 45.03 - 95.91 ve yüzde 9.18 - 89.14 arasında değişmiştir.

Koçak vd. (2015), dünya'da bugüne kadar fosfin direncinin gen düzeyinde belirlendiği zararlıların başında *R. dominica* ve *T. castaneum*'un geldiğini bildirmektedirler. Araştırmacılar, ülkemizde fosfinin depo zararlılarında oluşturduğu direnç oranı hakkında ilk çalışmayı, unbiti *T. castaneum*'daki fosfin direncini ortaya koymak üzere yapmışlardır. Bu çalışmada, Ankara, Konya ve Şanlıurfa illerinden toplanan beş popülasyon, zayıf ve kuvvetli direnç için sırasıyla ayırıcı fosfin konsantrasyonları olan 0.03mg/L ve 0.25mg/L dozları ile 20 saat süreyle uygulama temeline dayanan bioassaylerle test edilmişlerdir. Bu testlerde bu her üç ilden toplanan beş popülasyondan dördünde kuvvetli direnç olduğu belirlenmiştir. Ankara, Konya, Şanlıurfa, Elazığ, Karaman ve Mersin illerinden elde edilen popülasyonlarla yapılan genetik çalışmalar ve sekanslama, tüm popülasyonların kuvvetli direnç alellerine sahip olduklarını ve bu popülasyonların daha önce literatürde rapor edilenlere benzer olarak *rph2* lokusundaki direnç alelini taşıdıklarını ve *T. castaneum*'un Türkiye popülasyonlarında yüksek seviyede fosfin direncinin yaygın olduğunu göstermişlerdir. *T. castaneum*'da 196 kat fosfin direnci belirlenen Şanlıurfa popülasyonundaki direnç, moleküler seviyede tanımlanmıştır.

Depolanmış ürün zararlıları popülasyonlarındaki fosfin direncini tespit etmek için aşağıda verilen iki ayırıcı doz kullanılmaktadır (Çizelge 2.1). Düşük doz uygulamaları dirençli veya hassas popülasyonları ayırt ederken, yüksek doz uygulamasının ise direnç seviyesini belirlemede kullanılabileceği bildirilmektedir (Anonymous, 2013).

Çizelge 2.1. Depo zararlılarında fosfin için direnç ayırıcı konsantrasyonlar (Anonymous, 2013)

Türler	Direnç tipi	Ayırıcı doz (fosfin mg/l)	Maruz kalma süresi (saat)
<i>Rhyzopertha dominica</i>	Düşük	0.03	20
	Yüksek	0.25	48
<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	Düşük	0.04	20
	Yüksek	0.2	20
<i>Sitophilus oryzae</i>	Düşük	0.04	20
	Yüksek	0.25	20
<i>Sitophilus granarius</i>	Düşük	0.07	20
	Yüksek	0.2	20
<i>Cryptolestes ferrugineus</i>	Düşük	0.05	20
	Yüksek	1	168
<i>Tribolium castaneum</i>	Düşük	0.03	20
	Yüksek	0.25	20
<i>Tribolium confusum</i>	Düşük	0.05	20
	Yüksek	0.25	20

Chen vd. (2015), ABD’de *R. dominica* ve *T. castaneum* popülasyonlarında DLD genindeki tek nükleotid mutasyonuna göre fosfine karşı kuvvetli direnç gösteren alelleri taşıyan bireyleri tespit etmek için CAPS metodu geliştirmişlerdir. Kuvvetli dirençli *T. castaneum* ve *R. dominica* popülasyonlarında DLD’de tek bir aminoasit mutasyonu, ABD’den toplanan *R. dominica*’da P49S ve *T. castaneum* da P45S olarak tanımlanmıştır. Bu mutasyonları içeren PCR ürünleri, dirençli alelin varlığını veya yokluğunu ortaya çıkaran ve bu alel ile genotiplerin çıkarılmasına izin verilen MboI ve BstNI enzimleri ile kestirilerek, R alelinin yüksek dirençli popülasyonlarda yüksek frekansta olduğu ve zayıf dirençli popülasyonlarda daha düşük bir frekansta olduğu gösterilmiştir. CAPS markerlerinin yüksek fosfin direnci için, dirençli böcekleri tespit etmeye ve doğrulamaya yardımcı olacağı ve direnç yönetimi uygulamalarında yararlanılabileceği ifade edilmiştir.

Collins vd. (2016), son 20 yılda fosfin direnci ile ilgili veriler, görülme sıklığı, böcek örneklerinin toplanması ile ilgili faktörleri Avustralya Tahıl Böcek Direnç Veritabanı (AGIRD)’nda toplamışlardır. *R. dominica*’da yüksek direnç gelişmesine neden olan faktörlere dair bilgiler edinmek için tanımlayıcı istatistikler, doğrusal eğilim analizi ve Bayesian engelli modelleme kullanarak

analiz etmişlerdir. Yapılan istatistiki analizlerde özellikle yeraltı depolarında, çiftliklere kıyasla, yüksek direncin önemli ölçüde daha fazla olduğu görülmüştür. *R. dominica*'daki kuvvetli direnç aynı zamanda buğday, arpa ve sorgum ile de ilişkili bulunmuştur, ancak fosfin dışında herhangi bir kimyasalla bir bağlantı kurulamamıştır. Doğu Avustralya'daki analizler, direncin 1997'deki ilk tespitten 2014 yılına kadar düzenli bir şekilde arttığını göstermiştir. Zayıf direnç ise 1990'lı yılların başında doğu Avustralya'daki örneklerin yaklaşık %10'unda tespit edilmiştir. Bayesian engelli modeli yer altı depoları, silolar ve kontrolsüz depoların daha düşük bir frekansta kuvvetli direnç ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

Moleküler markörler, genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasıdır. DNA markerleri farklı genotiplere ait DNA diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan markerlerdir. Bu markerler, bir tür içerisindeki farklı bireylerde dizi polimorfizmi gösteren DNA bölgeleridir ve varyasyonun belirlenmesinde kullanılmaktadırlar (Yorgancılar vd., 2015).

Subramanian vd. (2016), *R. dominica* ve *Tribolium* türlerinde fosfin direncinin tespit edilmesinde DLD geninin işlevini değiştiren varyasyonların bulunması ve bunun direnç belirteci olarak kullanılmasının fosfin direncinin tespitini hızlandırdığını belirterek, Hindistanın Punjab eyaletindeki depolardan topladıkları *T.castaneum* bireylerine ayırıcı doz metodu ile yaptıkları direnç taramasında test edilen bütün popülasyonları kuvvetli dirençli bulduklarını, CAPS markerleri kullanarak R alelinin yaygın bulunmasıyla bunu doğruladıklarını ve bu moleküler yöntemlerin, *T. castaneum*'da fosfin direncinin izlenmesi ve yönetimi için yaygınlaştırılması gerektiğini vurgulamışlardır.

Guo vd. (2017), moleküler marker kullanımının son birkaç yıl içinde popülasyon genetiği alanında gelişmenin en önemli araçlarından birisi olduğunu ve türlerde ve/veya popülasyon düzeyinde farklı bireyler arasındaki DNA polimorfizmini tespit etmek için kullanılmakta olduğunu bildirmişlerdir. PCR temelli marker sistemlerinin ekonomik, kullanımının kolay ve polimorfik olmalarından dolayı genetik çalışmalarda yaygın olarak kullanıldığını ifade etmişlerdir.

Koçak vd. (2017), Türkiye genelinde 14 ilden 28 adet *S. oryzae*, 26 adet *S. granarius* ve 16 adet *O. surinamensis* popülasyonu ile yapılan bioassay çalışmaları sonucunda hassasla yapılan kıyaslamalarda *S. oryzae*'de 11 popülasyonda (%30.8), direncin 3.11-200.54 kat arasında olduğu, *S. granarius*'un beş popülasyonunda (% 19.0) 3.48 - 5.26 kat ve *O. surinamensis*'in üç popülasyonunda (%18.6) ise 388.98 - 459.57 kat olduğunu tespit ederek, depolanmış hububatlarda *S. granarius* dışındaki coleopterlerin Türkiye'deki ırklarında fosfin direncinin yaygın olduğunu bildirmişlerdir.

Işıkber vd. (2017), Mersin, Şanlıurfa ve Konya'dan toplanan *S. oryzae* popülasyonlarındaki fosfin direncini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada Mersin'den toplanan toplam sekiz *S. oryzae* popülasyonunun altı popülasyonunun fosfine zayıf direnç gösterirken, on iki *S. oryzae* popülasyonu, fosfine karşı yüksek direnç göstermiştir. Şanlıurfa'da sadece bir popülasyon fosfin duyarlılığına sahipken sekiz popülasyonun fosfine karşı yüksek dirençli olduğu, Konya'dan toplanan altı popülasyondan sadece birisinin orta derecede ve diğer dört popülasyonun fosfine karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir. LC₅₀ değerleri ile hesaplanan direnç oranına göre Mersin, Şanlıurfa ve Konya *S. oryzae* popülasyonları sırasıyla, 60-62 kat, 55- 57 kat ve 35-48 kat dirençli bulunmuştur. Sonuç olarak Mersin, Şanlıurfa ve Konya illerinde *S. oryzae* popülasyonlarında yüksek fosfin direncinin yaygın olduğunu bildirmişlerdir.

Price ve Mills (1988), Dirençli böceklerle mücadelede, uzun süre yüksek doz seviyesinin korunmadan hassas ve dirençli böceklerle etkin bir şekilde mücadelesinin mümkün olmadığını belirterek, depolar için kullanılan yapıların gaz geçirmez hale getirilmesi ve yığma halinde veya dökme hububat depolaması yapılıyor ise kesinlikle tabanının gaz geçirmez olması gerektiğini vurgulamışlardır.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bioassay çalışmalarda *R. dominica* popölasyonları (Şekil 3.1 ve Çizelge 3.1), *R. dominica*'nın yetiştirilmesinde buğday kırmısı ve kuru mayadan (*Saccaromyces cerevisiae*) oluşan karışım kullanılmıştır. Hububat depolarında, gıda ve hayvan yemi işleme tesislerinde bulunan *R.dominica*'nın sistematikteki yeri Çizelge 3.2'de verilmiştir. Bioassay çalışmalarda, iklim dolapları, inkübatör, sonda, değişik meshlerde elek, binoküler mikroskop, 1 l cam kavanozlar, fosfin (PH3) gazı, fosfin gaz üretci ve fosfin gazı ölçüm cihazları kullanılmıştır.

Moleküler çalışmalar da ise PCR-Thermocycler, DNA izolasyon kiti, UV transilluminatör, Thermo Scientific, Nanodrop-1000, yatay elektroforez aletleri ve güç kaynağı, farklı ebatlarda pipetler, derin dondurucular, çeker ocaklar, buz makinesi ve jel dökümantasyon sistemi kullanılmıştır.



Şekil 3.1. *Rhizoperta dominica* (F.) (Ekin kambur biti)

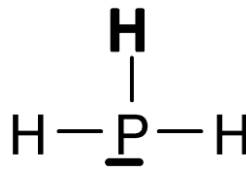
Çizelge 3.1. Türkiye de farklı illerde depolanmış buğdaylardan elde edilen *Rhizoperta dominica* (F.) popülasyonları

Örnek No	Tarih	Populasyon		Mevki	Çıkış Yapan <i>R. dominica</i> sayısı
		Alındığı İl	Örnek Kodu		
1	Ağustos 2013	Ankara	RD46	Polatlı TMO deposu	>100 canlı
			RD47	Sincan Katmer Un	>20 canlı
2	Ağustos 2014	Konya	RD6	Karatay esnaf deposu	>10 canlı
			RD17	Cihanbeyli TMO deposu	>50 canlı
3	Ağustos 2013	Şanlıurfa	RD32	TMO deposu	>100 canlı
			RD33	TİGEM deposu	>100 canlı
			RD38	Hububat Borsa	>100 canlı
4	Eylül 2013	İzmir	RD36	Tire TMO	>10 canlı
			RD37	TMO	>10 canlı
5	Eylül 2013	Tekirdağ	RD21	TMO yatay depo	>20 canlı
			RD44	Hayrabolu TMO	>1000 canlı
6	Aralık 2013	Kütahya	RD45	TMO deposu	>20 canlı
7	Aralık 2014	Mersin	RD7	Ticari depo	>50 canlı
8	Aralık 2013	Hatay	RD13	TMO	>100 canlı
9	Haziran 2014	Samsun	RD54	TMO	>100 canlı
10	Ekim 2013	Karaman	RD19	Çiftçi deposu	>20 canlı
11	Ekim 2015	Diyarbakır	RD55	Tarımsal Arş.Ens.	>50 canlı
12	Ekim 2015	Batman	RD56	Çiftçi deposu	>50 canlı

Çizelge 3.2. *Rhizopertha dominica* (F.)'nin sistematikteki yeri

Şube	Artropoda
Sınıf	Insecta
Takım	Coleoptera
Familya	Bostrichidae
Cins	Rhizopertha
Tür	<i>R. dominica</i> (F.)
Türkçe adı	Ekin kambur biti
İngilizce adı	The lesser grain borer

3.1.1. Fosfin (PH₃)



Şekil 3.2. Fosfinin açık formülü

Fosfinin kimyasal kapalı formülü PH₃'tür. Fosfin bileşiği renksiz, yanıcı ve zehirli bir gazdır (Şekil 3.2). Havadan daha ağır bir bileşiktir. Saf fosfin gazı kokusuzdur. Ticari olarak üretilen fosfin gazına sarımsak esansı ilave edilir.

Normal şartlarda gaz halinde bulunur. Fumigasyon uygulamaları için alüminyum veya magnezyum fosfid olarak bulunmakla birlikte silindir halinde saf fosfin, seyreltilmiş olarak azot veya karbondioksitle de bulunmaktadır. Fosfin havada yanıcı ve patlayıcıdır. Ortam sıcaklığında kendiliğinden ayrışır. Suda ve çoğu organik çözücü madde içinde çözünür. Metal fosfitler genellikle çeşitli renklerde tozlardır, hidrolize edilerek fosfin ve metal tuzları elde edilir. İnsanların 30 dakika boyunca 1400 mg/m³ fosfine maruz kalması ölüme yol açar. Havadaki hacmi %1,79 orana ulaştınca patlayıcıdır. Bakır ve değerli metaller ile reaksiyona girer (WHO, 1988).

3.2. Yöntem

3.2.1. *Rhyzopertha dominica* (F.) popülasyonlarının toplanması

Hububat depolarının bulunduğu illerdeki iki ayrı depodan, hububat depolama sırasında örnekler alınmıştır. Bu amaçla Ankara, Konya, Şanlıurfa, İzmir, Tekirdağ, Kütahya, Karaman, Samsun, Mersin, Hatay, Diyarbakır ve Batman illerindeki Toprak Mahsulleri Ofisi veya özel hububat depoları olmak üzere farklı illerden *R. dominica* popülasyonları elde edilmiştir. Örnekleme her depoda ürünün beş ayrı noktasından ve farklı derinliklerinden, büyük silolardan taşıma bandı üzerinden ve yığın halinde depolanmış hububattan ise 2 metre sonda aleti kullanılarak yaklaşık 4 kg örnek alınarak yapılmıştır. Alınan her örnek alındığı tarih, ürün cinsi, üretim yılı ve örnekleme yerinin yazıldığı bir etiket ile etiketlenerek, plastik torbalara aktarıldıktan sonra laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen 4 kg'lık örneklerden 1 kg'lık alt örnek alındıktan sonra 1 litrelik cam kavanozlara aktararak ağızları bir tül ile kapatılmıştır. Cam kavanozlar 2 ay süre ile 25°C ve %65±5 orantılı nem koşullarındaki iklim dolaplarında bekletildikten sonra, Retzsch marka metal eleklerden geçirilerek, *R. dominica* türleri Enstitümüz'de teşhis edilip Doç.Dr.Hüseyin ÖZDİKMEN'e teyid ettirilerek uygun besi ortamına alınmıştır (Esin, 1971; Şayeste, 1971; Işıkber, 2005).

3.2.2. *Rhyzopertha dominica* (F.)'nın yetiştirilmesi

Rhyzopertha dominica'nın yetiştirilmesinde buğday kırması ve kuru mayadan (*Saccaromyces cerevisiae*) oluşan karışım kullanılmıştır. Kültürün yetiştirilmesinde kullanılan buğday yem kırma makinesinde kaba irilikte olacak şekilde öğütülerek ve -18°C sıcaklıktaki inkübatörde 96 saat tutularak olası diğer zararlıların bulaşıklığı yok edilmiştir. Laboratuvar değirmeninde öğütülmüş ve 100 mesh elekten elenen kuru maya, buğday kırmasına % 5 oranında ilave edilerek besi ortamı hazırlanmıştır. Böcekler 25±1°C sıcaklık ve %65±5 orantılı nem koşullarına ayarlanmış iklim dolaplarında yetiştirilmiştir (Şekil 3.3). Ortamın sıcaklık ve nemi Hobo® ProTemp/RH marka veri kaydedici aracılığıyla kaydedilerek, belirli aralıklarla kontrol edilmiştir. Hazırlanan besin karışımı delikli kapakları olan 1 litrelik cam kavanozlara yaklaşık 100 g olacak şekilde ilave edilmiştir. Bulaşmalara engel olmak için kavanozlar, içine sıvı vazelin doldurulmuş küvetlerde plastik altlıklar üzerine yerleştirilmiştir (Pimentel vd., 2008; Opit vd., 2012). İçerisinde daha önceden hazırlanan kırma-maya karışımı bulunan kavanozlara aktarılan yumurtalardan çıkan bireyler gelişmelerini yaklaşık 30-35 günde tamamlayarak ergin olmaya başlamışlardır. Çıkan erginler yumurta elde etmek amacıyla 100 mesh'lik elekten elenmiş %95'i un ve %5'i mayadan oluşan ortam (100 g) yumurta elde etme kavanozlarına (0,5 l) aktarılmıştır. Kavanozlar çalışma süresince 25±1°C ve %65±5 orantılı nemdeki iklim dolaplarında tutulmuştur. Yumurta kavanozlarına bir miktar ergin konulmuştur. Daha sonra kavanoz içeriği 25 mesh'lik elekten elenerek erginler besin ortamdan uzaklaştırılarak, yumurtalar 80 mesh'lik elekten besinden ayrılmıştır. Elde edilen 0-24 saatlik yumurtalar buğday kırması ve maya içeren besin ortamına yerleştirilmiştir. *R. dominica* üretim kavanozlarına yumurta ilave edilmesinden yaklaşık 30-40 gün sonra bu kavanozlarda günlük olarak ergin çıkışı takip edilmiştir. İlk ergin çıkışı belirlenen kavanozlara ilk ergin çıkış tarihi kaydedilmiştir. İlk ergin çıkışından 7. haftaya kadar içerisinde ergin döneme geçen tüm erginler ortamdan tek tek alınarak denemelerde 1-3 haftalık erkek ve dişiler karışık olarak kullanılmıştır (Esin, 1971; Şayeste, 1971; FAO, 1975; Işıkber, 2005; Opit vd., 2012).



Şekil 3.3. İklim kabini ve bazı laboratuvar malzemeleri

3.2.3. Bioassay Denemeleri (Toksikolojik Çalışmalar)

Çalışmalarda kullanılan gaz halindeki fosfin, gaz üreticide fosfin pellet veya tabletlerinden (%57 ALPH₃; %8 Mg₃P₂) üretilmiştir. İlk olarak alüminyum fosfit tableti, içerisinde %5 oranında H₂SO₄ içeren 1000 ml'lik cam silindirdeki suya atılmıştır (FAO, 1975). Cam küvetin üst kısmında toplanan fosfin gazı septumdan 100 ml'lik şırınga ile alınmıştır. İkinci olarak ise %8'lik magnezyum fosfit tabletleri kullanılmıştır. Bu tabletler 3 l'lik kapalı plastik kaplara 50 ml su ile birlikte yerleştirilmiştir. Açığa çıkan fosfin gazı şırınga ile alınarak kullanılmıştır. Denemeler için kapalı devre gaz dolaşımı olan 3 l hacimli desikatörler kullanılmıştır (Şekil 3.4). Desikatör içerisinde istenen nemi sağlamak amacıyla deneme öncesi desikatöre yaklaşık %60-65 nem verecek düzeyde KOH çözeltisi (Solomon 1951) yerleştirilmiştir. Desikatörle bağlantılı gaz boruları fosfin gaz ölçüm cihazının (Ati PortaSense) gaz çıkış ve gaz emiş kısımlarına bağlanmıştır. Gereken miktarda fosfin gazı, desikatör gaz girişinden şırınga ile verilmiştir (Şekil 3.5). Düzenekte gereken gaz konsantrasyonuna ulaşılmasının ardından fosfin ölçüm cihazı kapatılmıştır. Desikatöre bağlanmış olan vanalardan bağlantı boruları çekildikten sonra desikatörler 25°C ve %65±5 nemdeki inkübatöre yerleştirilmiştir (FAO, 1975; Kahraman, 2009; Opit vd., 2012). Her bir desikatöre içerisinde 25 adet cinsiyet ayrımı yapılmamış ergin birey ve 1-2 g besin bulunan 3x3x3 cm ebatlarında PVC kaplar yerleştirilmiştir. Denemeler en az 5 farklı fosfin konsantrasyonunda 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Böcekler fosfine 20 saat maruz bırakıldıktan sonra içerisinde

besin bulunan kavanozlara aktarılmış, inkübatörde 14 gün bekletilerek canlı-ölü sayımı yapılmıştır.



Şekil 3.4. Bioassay denemeleri



Şekil 3.5. Fosfin üreteçleri, desikatör ve fosfin ölçer

3.2.4. Bioassaylerde ayırıcı doz çalışmaları

Laboratuarda kültüre alınan bireylerin fosfine karşı direnç oranlarını belirlemeden önce ayırıcı doz uygulaması yapılmıştır. *R. dominica* için ayırıcı

doz 20 ppm fosfin konsantrasyonunda 20 saatlik uygulama süresidir. Bu konsantrasyon ve sürede canlı birey görülmesi durumunda ele alınan popülasyon için LC₅₀ çalışmaları yürütülmüştür. Canlı birey görülmemesi durumunda ise popülasyon hassas kabul edilmiştir (Anonymous, 2013).

3.2.5. İstatistiksel değerlendirme

Ölüm yüzdeleri, Abbott formülü kullanılarak kontrolden elde edilen veriler ile düzeltilmiştir. Düzeltilmiş ölüm yüzdelerinin probit değerleri ile dozların logaritması alınarak, logaritmik doz-probit doğrularına ait grafikler çizilmiştir. Grafiklerin çizimi ve logaritmik doz-probit doğru denklemi ile regresyon hesapları Excel programında yapılmıştır (Busvine 1971). Probit analizi beş dozda hesaplanmıştır, doz aralığı %5-95 arasında değişmektedir.

Probit analizi için LeOra Software, PoloPlus 2002-2009 programları kullanılmıştır. Direnç düzeyleri, arazi popülasyonunun LC₅₀ değerlerinin daha önce Collins ve arkadaşları tarafından bildirilen referans hassas popülasyonun (QRD14, 0.00174 mg/l → 1.25 ppm) LC₅₀ değerine bölünmesiyle elde edilmiştir (FAO Method, 1975; Collins vd., 2002; Song vd., 2011; Pimentel vd., 2008).

3.2.6. Genomik DNA (gDNA) izolasyonu

Toplanan *R. dominica* popülasyonlarının her birisini temsilen en az 15 birey moleküler çalışmalarda kullanılmıştır. Bu çalışmadaki genomik DNA izolasyonları Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit adlı ticari kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerinde, izolasyon verimini artırmak için kite ait ekstraksiyon tamponu içerisinde ezme aparatı kullanılarak mekanik olarak parçalanan her bir böcek, kit talimatlarına uyularak gDNA'sı izole edilmiştir. Elde edilen böceklere ait gDNA, %1,5'lik agaroz jelde UV transilluminatör yardımıyla görsel olarak incelenip, bilgisayarda kayıt edilmiştir. Spektrofotometrik (Thermo Scientific, Nanodrop-1000) olarak konsantrasyonu ve saflığı ölçülmüştür. Saflık kriteri açısından gDNA örneklerinin, OD_{260/280} değerinin 1,70-1,90 aralığında olmasına dikkat edilmiştir. Elde edilen gDNA'lar çalışma süresince -20 °C de saklanmıştır.

3.2.7. Genomik DNA'nın PCR yöntemiyle çoğaltılması

Elde edilen genomik DNA'dan DLD genindeki ilgili bölge, Rd-MM-F ve Rd-MM-R CAPS primer çifti (Chen vd., 2015) ve PCR (Polymerase Chain Reaction) yöntemiyle Thermal Cycler cihazında (Eppendorf Gradient Master) çoğaltılmıştır. PCR'da Takara Bio firmasına ait Terra™ PCR Direct Polymerase Mix kullanılmıştır. Bir örnek için hazırlanmış PCR karışımı; 12,5 µL PCR direct buffer (Mg + dNTP), 0.5 µL Taq DNA polimeraz, 0.75 µL ileri (forward) primer, 0.75 µL geri (reverse) primer, 6.5 µL distile su (moleküler biyolojik saflıkta) ve 4 µL kalıp DNA dan oluşan 25 µL'lik toplam hacimde hazırlanmıştır. Reaksiyonda Chen vd. (2015) tarafından geliştirilen DLD genine spesifik CAPS primerleri Çizelge 3.3' de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Reaksiyonda kullanılan DLD genine ait spesifik CAPS primerleri (Chen vd., 2015)

Rd-MM-F ileri(forward): 5'-AGGTCCAAGCGTAGGGTTT-3'
Rd-MM-R geri(reverse): 5'- AACTGGGAGAATTTCGGCTTT -3'

PCR reaksiyonu 95 °C'de 3 dakika başlangıç denatürasyonu, 95 °C de 20 saniye denatürasyon, 55 °C de 20 saniye annealing (yapışma), 68 °C' de 30 saniye uzama safhalarını içeren çoğalma (27 döngü) ve son olarak 68 °C' de 7 dk. son uzama olarak gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %1.5 lik agaroz jelde UV transilluminatör yardımıyla görsel olarak incelenip, bilgisayarda kayıt edilmiştir (Schlipalius vd., 2012).

3.2.8. PCR ürünlerinin (amplikonların) MboI kesim enzimi ile kesimi ve değerlendirilmesi

Bir önceki safhada çoğaltılan ve mutasyonu neticesinde *R. dominica*'da direnç gelişimine neden olan DLD geninin 375 bp'lik bölgesini içeren PCR ürününden 10 µL, 0.2 µL MboI (New England Biolabs, MA USA) kesim enzimi ve 2 µL reaksiyon tamponu (buffer) ve 7.8 µL distile su (moleküler biyolojik saflıkta) ile toplam hacmi 20 µl olan karışım hazırlanarak 37 °C de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen kesim ürünü elektroforezde 60 dakika 100 voltta koşturma işleminden sonra, UV transilluminatör yardımıyla jelin görüntüsü

alınmıştır. Genlerin varlığı toksikolojik analizlerle ve elde edilmesi durumunda pozitif kontrollerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Schlipalius vd., 2012).

3.2.9. Direnç gen frekanslarının hesaplanması

Gözlemlenen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesiyle uyumlu olup olmadığını belirlemek için Ki-kare testi kullanılmıştır. Hesaplamada Hardy-Weinberg Eşitliğinden (HWE) yararlanılmıştır (Kaur vd., 2013).

A alel frekansı : p a alel frekansı:q p=A, q=a p+q=1 p = [(AA x 2) + Aa] / (Toplam alel sayısı x 2) q=1-p	AA frekansı =p ² = AA genine sahip birey sayısı / Toplam birey sayısı Aa frekansı = 2pq = Aa genine sahip birey sayısı / Toplam birey sayısı aa frekansı = q ² = aa genine sahip birey sayısı / Toplam birey sayısı p ² = AA 2pq = Aa q ² = aa p ² + 2pq + q ² = 1 p ² = (A alelinin frekansı) ² 2pq = 2 x (A alelinin frekansı) x (a alelinin frekansı) q ² = (a alelinin frekansı) ²
--	---

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Çalışmalar 2013-2017 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü; Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü; Ecosciences Precinct ve Queensland Üniversitesi Biyoloji Bölümü/Avustralya yürütülmüştür. Bu araştırmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanan *R. dominica* popülasyonlarının fosfine karşı direnç durumları araştırılmıştır. Denemeler, etkinlik testleri ve moleküler yöntemler kullanılarak yürütülmüştür. Biyoassaylarla popülasyonlara uygulanan fosfinin LC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Moleküler çalışmalarda ise *R. dominica* 'nın fosfine direnci ile ilişkili olan DLD geni incelenmiştir.

4.1. Çalışma alanlarından elde edilen *Rhyzopertha dominica* (F.) popülasyonları

Hububat depolarının bulunduğu. Ankara, Konya, Şanlıurfa, İzmir, Tekirdağ, Kütahya, Samsun, Mersin, Hatay, Karaman, Diyarbakır, Batman illerindeki iki ayrı depodan, hububat depolama sırasında Toprak Mahsulleri Ofisi veya özel hububat depolarından 2013, 2014, 2015 yıllarında örnekler toplanmıştır. Populasyonların toplama çalışmalarında daha fazla il ve depodan örnek alınmasına rağmen her lokaliteden *R.dominica* bireyleri elde edilememiştir (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. *Rhyzopertha dominica*(F.) popülasyonlarının toplandığı iller

4.2. Biyoassay Sonuçları

Diyarbakır (RD55), Batman (RD56) ve Karaman (RD19) illerinden alınan *R. dominica* popülasyonlarına 20 ppm/20 saat fosfin uygulaması sonucu canlı birey görülmemiştir (Anonymous, 2013). Bu ayırıcı doz uygulamasına göre bu üç popülasyon hassas kabul edilerek LC₅₀ değerleri belirlenmemiştir (Anonymous, 2013). Diğer popülasyonlarda ise canlı bireyler görüldüğünden dolayı değişik dozlarda fosfin uygulanmış, probit analizleri yapılarak LC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Buna göre Çizelge 4.1’de Ankara, Konya, Şanlıurfa, İzmir, Tekirdağ, Kütahya, Samsun, Mersin ve Hatay illerindeki popülasyonlarda LC₅₀ değerleri, güven aralıkları, regresyon katsayıları ve direnç oranları verilmiştir (Çizelge 4. 1). Çizelge incelendiğinde Ankara elde edilen iki farklı RD46 ve RD47 popülasyonlarının LC₅₀ değerleri sırasıyla 305.179 ppm ve 446.165 ppm olarak hesaplanmıştır. Çalışmaların bir kısmı Avustralya da yürütüldüğünden dolayı direnç oranı karşılaştırmasında Avustralya hassas *R. dominica* popülasyonu (QRD14) kullanılmıştır.

Elde edilen değerler hassas popülasyon (QRD14) ile kıyaslandığında RD46’ nın 244 kat, RD47 nin ise 357 kat daha dirençli olduğunu göstermektedir. Bu durumda her iki popülasyonunda yüksek dirençli olduğu kabul edilir. Heterojenlik değerlerine bakıldığında ise RD46 (2.91) ve RD47 (2.97) popülasyonlarının diğer popülasyonlardan çok farklı olmadığı görülmektedir. Popülasyonlarda homojenliğin olması, uygulanan toksik maddeye karşı popülasyondaki bireylerin birbirine yakın tepki vermesinin sonucu oluşmaktadır. Elde edilen verilere göre popülasyonların homojen olmadığı, uygulanan fosfine karşı popülasyondaki bireylerin farklı tepki verebileceğini göstermektedir. Logaritmik doz-probit doğrusunun eğimi fosfine karşı böceklerde meydana gelen tepkiyi göstermektedir. Doğru eğiminin dik olması dozun değişmesi ile birlikte böceklerdeki ölüm oranının değişebileceğini göstermektedir. Ancak doğrunun yatık olması durumunda ise böceklerin fosfin miktarının artması ve azalması durumunda tepkinin ani değişikliklere yol açmadığı bilgisini vermektedir (Hoskins, 1960).

Çizelge 4.1. *Rhyzopertha dominica* (F.) popülasyonlarının fosfine karşı gösterdikleri probit ölüm verileri ve direnç oranları

Populasyon		n	h	Eğim±SE	LC ₅₀ ppm (0.95 güven aralığı Min ve Max Limitler)	Direnç oranı (DO)
İL	Örnek No					
Hassas*	QRD14				1.25	
Ankara	RD46	600	2.91	3.07±0.25	305.179 (240.88- 361.66)	244
	RD47	600	2.37	5.14±0.55	446.164 (361.98 -508.96)	357
İzmir	RD37	600	2.43	4.38±0.30	357.213 (314.47- 399.59)	286
	RD36	600	2.09	5.19 ±0.44	395.683 (341.85-442.39)	316
Konya	RD6	600	3.58	3.85±0.36	418.513 (316.05- 501.77)	335
	RD17	600	5.86	2.40±0.25	321.731 (176.02 - 435.98)	257
Şanlıurfa	RD32	600	2.91	13.33±1.80	670.833 (617.69-721.00)	537
	RD33	600	5.16	3.21±0.27	394.438 (289.09 -490.53)	315
	RD38	600	3.85	6.00±0.52	480.390 (410.36 -540.50)	384
Hatay	RD13	600	3.29	9.60±1.62	470.890 (291.01-540.88)	377
Tekirdağ	RD21	600	4.16	6.54±0.73	602.162 (490.40 -680.82)	482
	RD44	600	7.36	2.12±0.22	323.769 (152.33 -455.10)	259
Kütahya	RD45	600	3.71	1.83±0.29	123.588 (105.18- 143.18)	99
Samsun	RD54	600	4.48	5.08±0.33	120.156 (120.15- 213.30)	96
Mersin	RD7	600	2.06	8.42±0.58	666.26 (628.80-704.09)	533

n= Kullanılan birey sayısı

h= Heterojenlik değeri

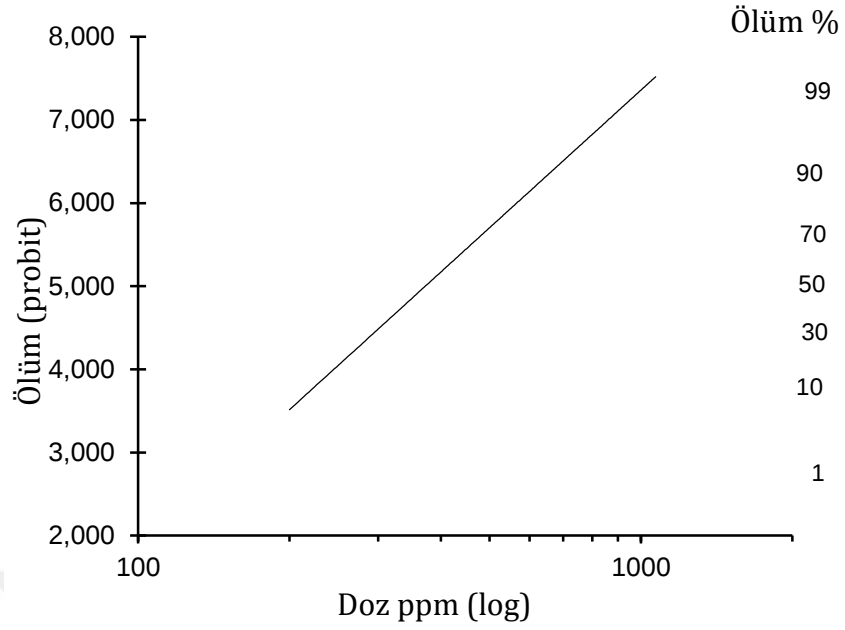
DO= Direnç oranı (Dirençli popülasyonun LC₅₀ değeri/ Hassas popülasyonun LC₅₀ değeri)

* = QRD14 referans hassas popülasyon (Kaur, 2012)

Hassas böcekler veya belirli bir dozda bireylerin etkilendiği popülasyonlarda insektisitlere karşı dik bir logaritmik doz-probit doğrusu görülür, insektisitlerin belirli bir süre kullanıldıktan sonra toksisitenin azalması, bu doğrunun eğiminin de azaldığını belirtilmektedir (Hoskins ve Gordon, 1956). Eğimde meydana gelen bu azalma direnç oluşumunu göstermektedir. Seleksiyon baskısı altında ilk önce eğim azalmakta ve daha sonra popülasyonda dirençli bireyler baskın hale geldiğinde eğim tekrar artmaktadır. Popülasyondaki bireylerin duyarlılık yönünden homojen olması durumunda,

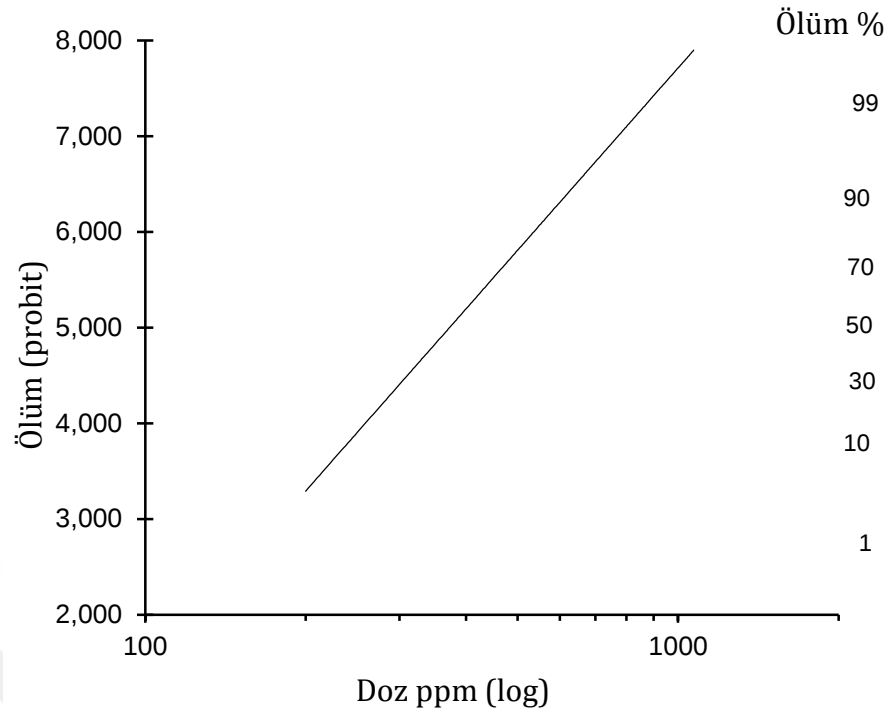
logaritmik doz-probit doğrusu dik olmakta ancak popülasyonda heterojenlik arttıkça eğim düşmekte ve grafiğin sağına doğru kaymaktadır. RD46 ve RD47'nin heterojenlik değerinin birbirine yakın ve logaritmik doz probit doğrusunun yatık olması popülasyonlardaki heterojenitenin yakın olduğunu (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3), Uygulanacak fosfinden popülasyon bireylerinin eşit şekilde etkilenmeyeceğini göstermektedir. Bu durum bu popülasyonlarda bireylerin duyarlılık yönünden heterojen ve dirençli olduklarını göstermektedir.

Şekil 4.2. Ankara RD46 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu

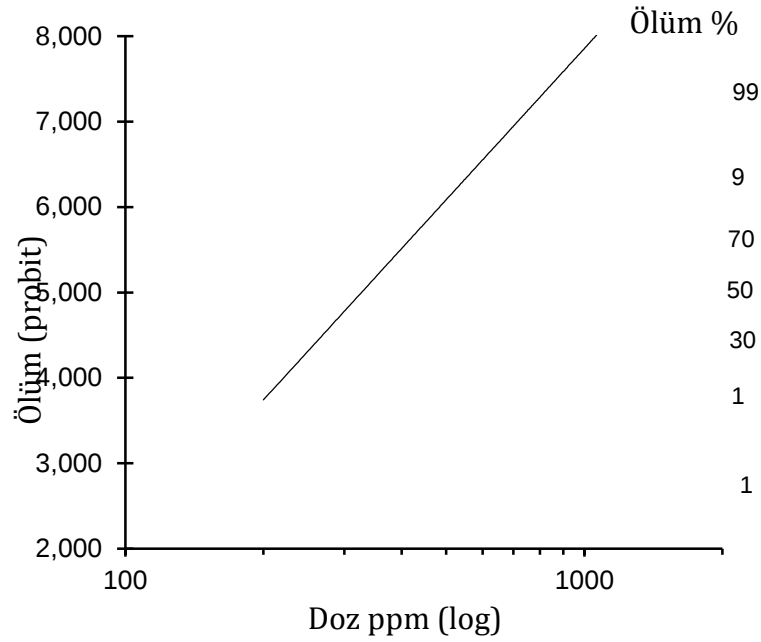


Şekil 4.3. Ankara RD47 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu

İzmir Tire TMO (RD36) ve merkez TMO (RD37) dan alınan popülasyonların LC_{50} değerleri sırasıyla 357.213 ppm ve 395.683 ppm olarak hesaplanmıştır. Bu değerlere göre RD36 hassas popülasyona göre 286 kat, RD37 popülasyonu ise 316 kat dirençli bulunmuştur. Heterojenlik değerlerine bakıldığında ise RD37 (2.43) ve RD36 (2.09) olarak hesaplanmıştır. Yani, popülasyondaki bireyler arasında homojenliğin olmadığı, fosfin uygulamasına karşı verilecek tepkinin de farklı olacağı kanaati oluşmaktadır. Her iki popülasyonun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğruları incelendiğinde de popülasyondaki bireylerin duyarlılık yönünden homojen olmadığından, logaritmik doz-probit doğrusunun sağa yatay olduğu görülmektedir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).

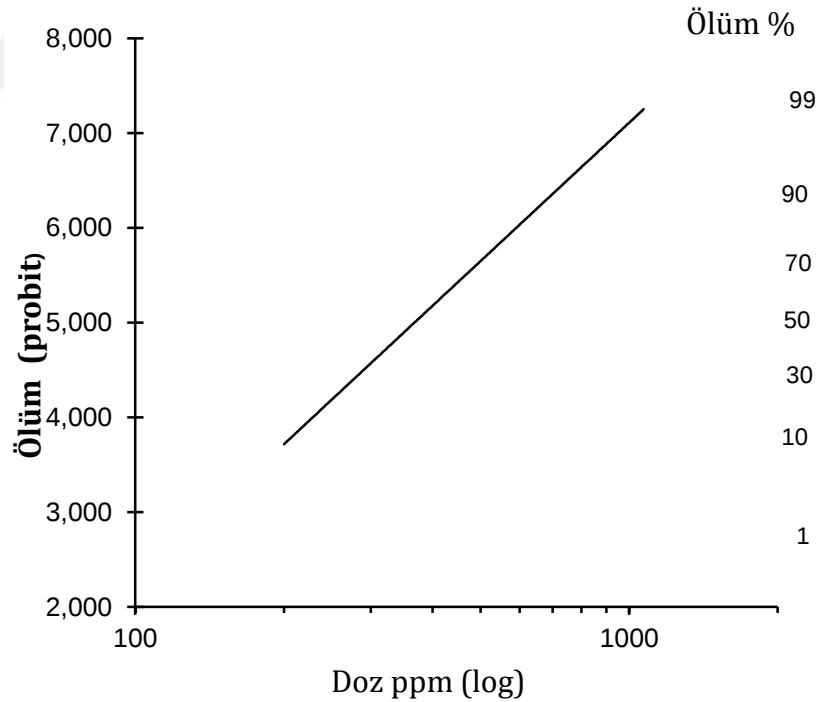


Şekil 4.4. İzmir RD36 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu

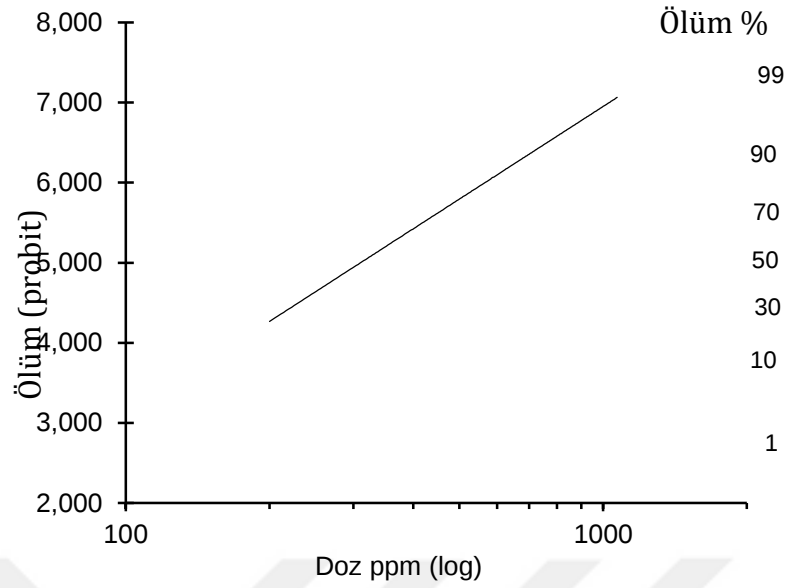


Şekil 4.5. İzmir RD37 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu

Konya Karatay (RD6) ve Cihanbeyli TMO (RD17) popülasyonların LC₅₀ değerleri sırasıyla 418.513 ppm ve 321.731 ppm olarak hesaplanmıştır. Bu değerlere göre RD6 hassas popülasyona göre 335 kat ve RD17 popülasyonu ise 257 kat dirençli bulunmuştur. Heterojenlik değerleri ise RD6 için 3.58 ve RD17 için ise 5.86 olarak hesaplanmıştır. Değerlere göre popülasyondaki bireyler arasında homojenlik olmadığından fosfin uygulamasına karşı verilecek tepki de farklı olmaktadır. Her iki popülasyonun fosfine karşı gösterdikleri logaritmik doz probit ölüm doğruları incelendiğinde ise; popülasyondaki bireylerin duyarlılık yönünden homojen olmadığından, logaritmik doz-probit doğrusunun sağa yatay olduğu görülmektedir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). RD17'nin RD6 ya göre heterojenliğinin yüksek olması ve logaritmik doz probit ölüm doğrusunun daha dik olması RD6'nın logaritmik dozlara karşı verilen ölüm tepkilerinin daha geniş bir spektruma yayıldığı göstermektedir. RD17'nin ise daha homojen ve dirençli olması direnç yönetim stratejisi açısından istenmeyen bir durumdur.

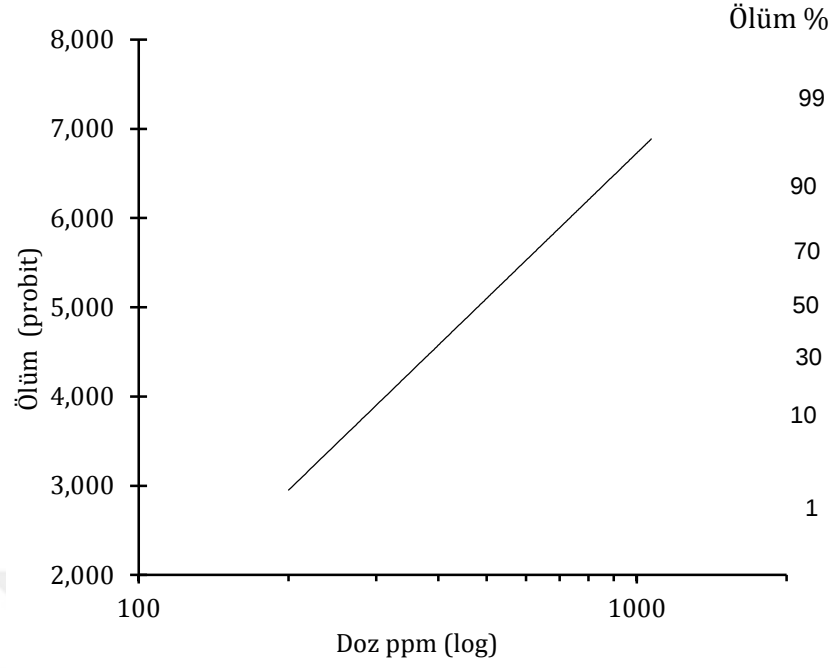


Şekil 4.6. Konya RD6 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu

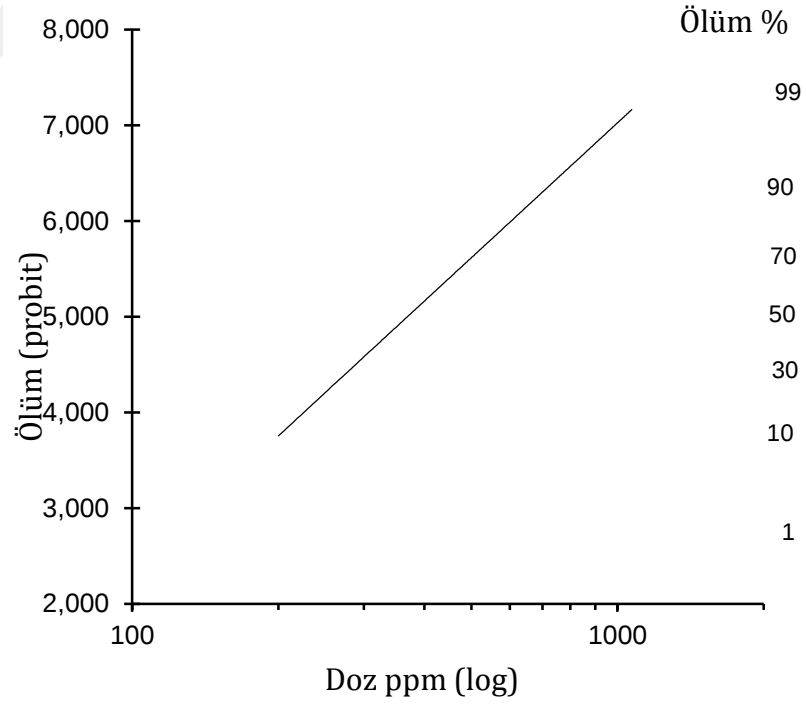


Şekil 4.7. Konya RD17 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu

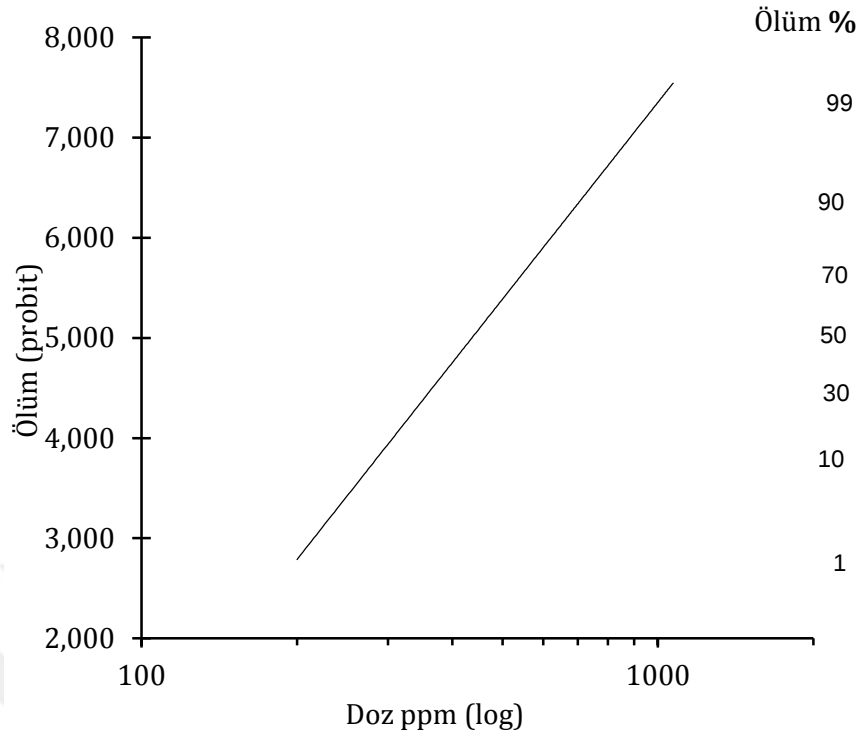
Şanlıurfa’da TMO deposu (RD32), Tigem deposu (RD33) ve Buğday borsasından (RD38) elde edilen popülasyonların LC_{50} değerleri sırasıyla 670.833 ppm, 394.438 ve 480.390 ppm olarak hesaplanmıştır. Bu değerlere göre RD32, hassas popülasyona göre 537 kat, RD33 315 kat ve RD38 ise 384 kat dirençli bulunmuştur. Heterojenlik değerleri ise bu üç popülasyon için sırasıyla 2.91 5.16 ve 3.85 olarak hesaplanmıştır. Bu değerlere göre popülasyondaki bireylerin fosfin uygulamasına karşı vereceği tepki de farklı olmaktadır. Her üç popülasyonun fosfine karşı gösterdikleri logaritmik doz probit ölüm doğruları incelendiğinde popülasyondaki bireylerin duyarlılık yönünden homojen olmadığından, logaritmik doz-probit doğrusunun sağa yatay olduğu ve popülasyonların homojenitesinin birbirine yakın olduğu görülmektedir (Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).



Şekil 4.8. Şanlıurfa RD32 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu

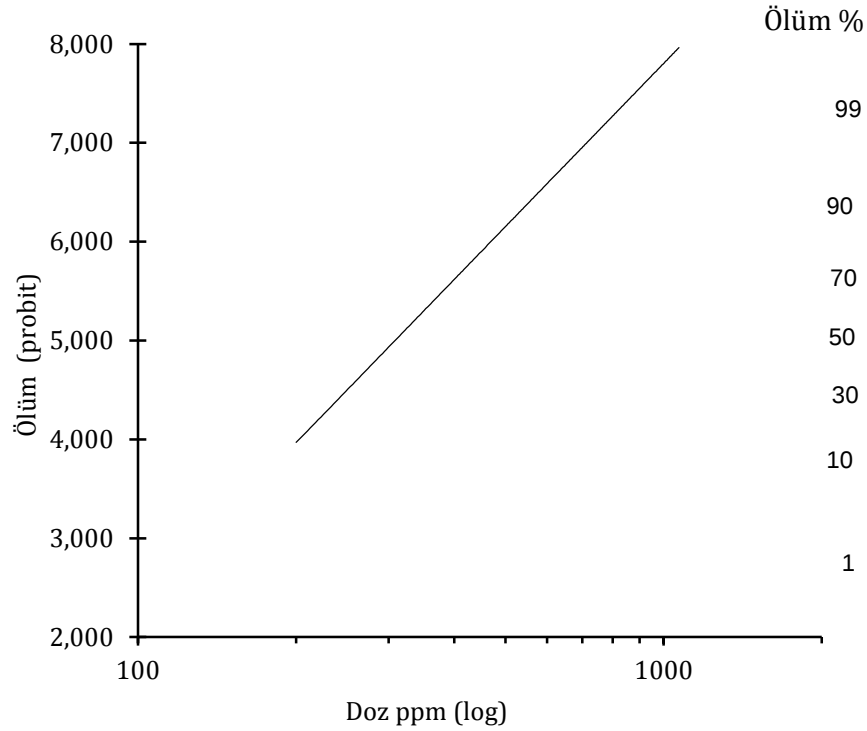


Şekil 4.9. Şanlıurfa RD33 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu



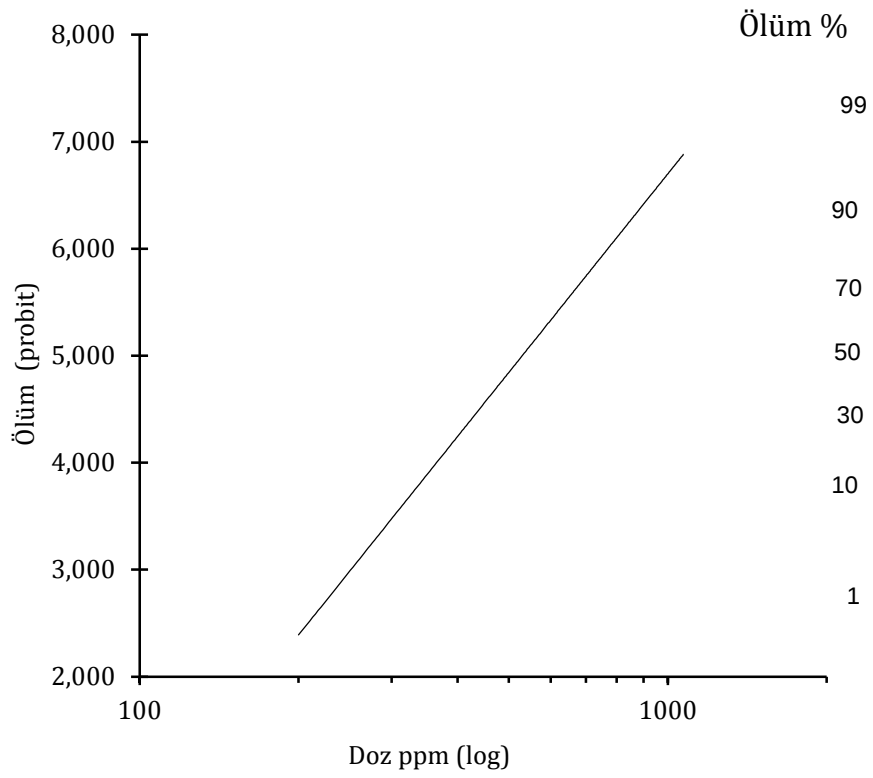
Şekil 4.10. Şanlıurfa RD38 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu

Hatay dan yapılan örnekleme çalışmalarında İskenderun TMO deposundan (RD13), *R.dominica* popülasyonları elde edilmiştir. RD13 nolu popülasyonun LC50 değeri 470.890 ppm, olarak hesaplanmıştır. Bu değere göre RD13 'ün hassas popülasyona göre 377 kat dirençli bulunmuştur. Heterojenlik değeri ise RD13'ün (3.29) olarak hesaplanmıştır. Bu değerlere göre popülasyondaki bireylerin fosfin uygulamasına karşı vereceği tepkide farklı olmaktadır. Popülasyonun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu incelendiğinde ise; popülasyondaki bireylerin duyarlılık yönünden homojen olmadığından, logaritmik doz-probit doğrusu sağa yatık ve popülasyonun homojenitesinin farklı olduğu görülmektedir (Şekil 4.11).

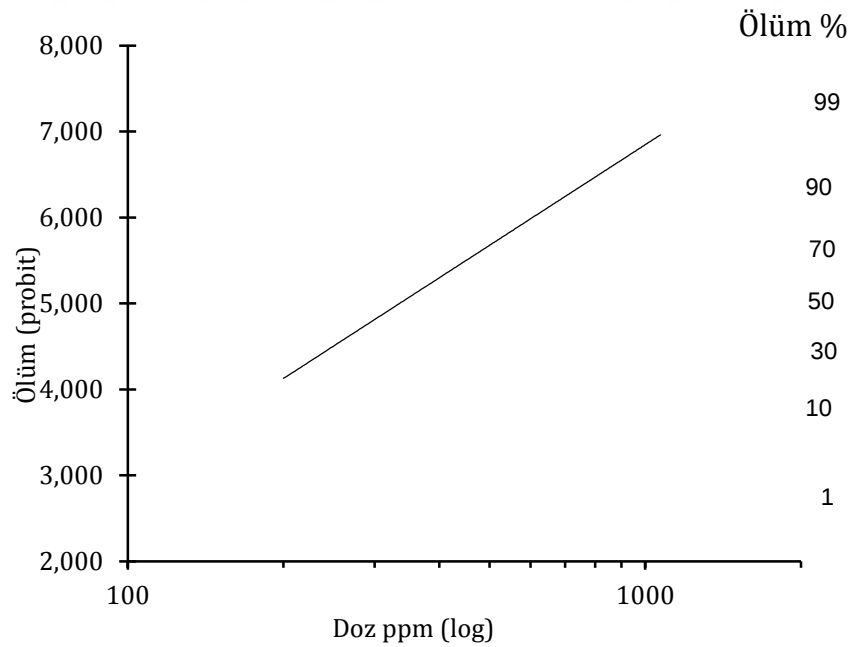


Şekil 4.11. Hatay RD13 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu

Tekirdağ merkez TMO (RD21) ve Hayrabolu TMO (RD44) popülasyonların LC_{50} değerleri sırasıyla 602.162 ve 323.769 ppm olarak hesaplanmıştır. Bu değerlere göre RD21 482 kat ve RD44 popülasyonu ise 259 kat dirençli bulunmuştur. Heterojenlik değerleri ise bu iki popülasyon için sırasıyla 4.16 ve 7.36 olarak hesaplanmıştır. Popülasyondaki bireyler arasında homojenlik olmadığından fosfin uygulamasına karşı verilecek tepki de farklı olmaktadır. Her iki popülasyonun fosfine karşı gösterdikleri logaritmik doz probit ölüm doğruları incelendiğinde ise; popülasyondaki bireylerin duyarlılık yönünden homojen olmadığından, logaritmik doz-probit doğrusunun sağa yatay olduğu görülmektedir (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). RD21' in RD44'e göre heterojenliğinin yüksek olması ve logaritmik doz probit ölüm doğrusunun daha dik olması RD21'in logaritmik dozlara karşı verilen ölüm tepkilerinin daha geniş bir spektruma yayıldığı görülmektedir. RD44'ün ise daha homojen ve dirençli olması direnç yönetim stratejisi açısından istenmeyen bir durumdur.

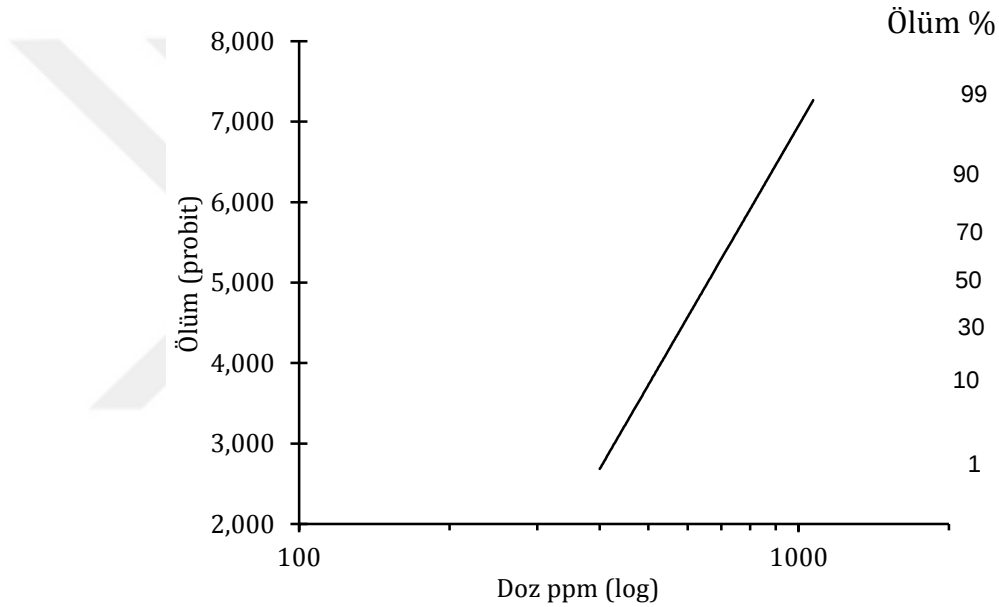


Şekil 4.12. Tekirdağ RD21 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu



Şekil 4.13. Tekirdağ RD44 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu

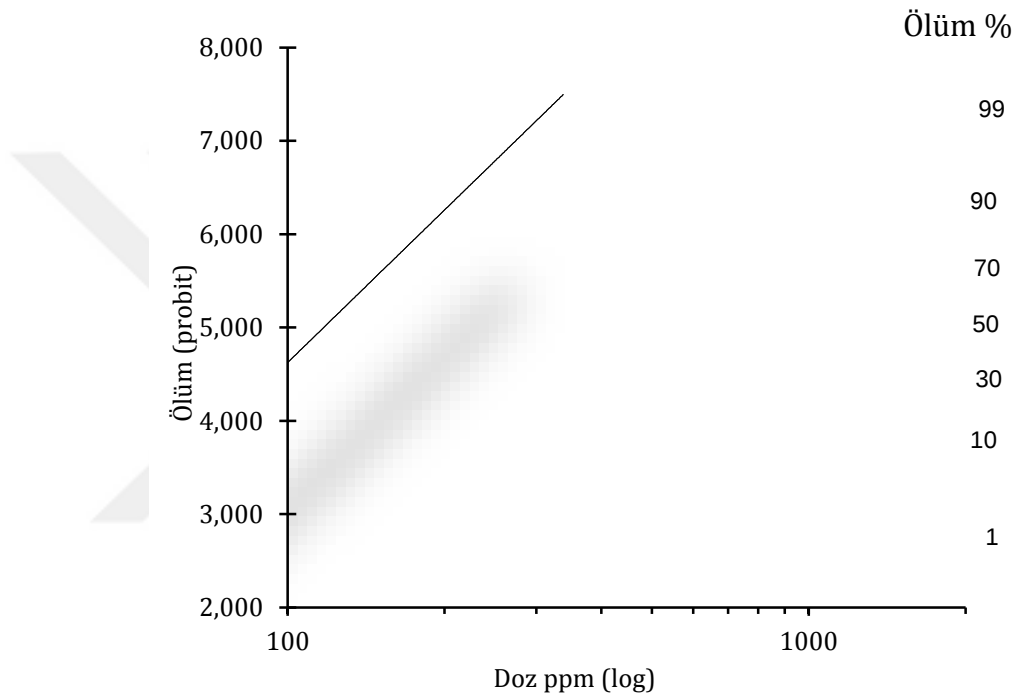
Mersin’de farklı firmaların ürün depoladığı ticari depodan RD7 popülasyonu elde edilmiştir. Bu popülasyonun LC₅₀ değeri 666.26 ppm olarak hesaplanmış ve 533 kat dirençli bulunmuştur. Heterojenlik değeri ise 2.06 olarak hesaplanmıştır. Bu değere göre popülasyondaki bireylerin fosfin uygulamasına karşı vereceği tepki de farklı olmaktadır. Popülasyonun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu incelendiğinde ise; popülasyondaki bireylerin duyarlılık yönünden farklılıklar görülmektedir. Logaritmik doz-probit doğrusu sağa yatay olsa da, RD7 popülasyonunun diğer illerden toplanan popülasyonlara göre daha homojen olduğu görülmektedir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Mersin RD7 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu

Kütahya merkez TMO (RD45) ve Samsun TMO’dan (RD54) alınan popülasyonların LC₅₀ değerleri sırasıyla 123.588 ve 120.156 ppm olarak hesaplanmıştır. RD45’in 99 kat ve RD54 popülasyonu ise 96 kat dirençli bulunmuştur. Heterojenlik değerleri ise sırasıyla 3.71 ve 4.48 olarak hesaplanmıştır. Değerlere göre popülasyondaki bireyler arasında homojenliğin olmadığı dolayısıyla fosfin uygulamasına karşı verilecek tepkinin de farklı olacağı beklenir. Her iki popülasyonun fosfine karşı gösterdikleri logaritmik doz probit ölüm eğrileri incelendiğinde ise; popülasyondaki bireylerin duyarlılık

yönünden homojen olmadığından, logaritmik doz-probit doğrusunun sağa yatay olduğu görülmektedir. RD45 ve RD54'ün logaritmik dozlara karşı verilen ölüm tepkilerinde RD54'ün logaritmik doz-probit doğrusunun daha dik olması popülasyonun daha homojen yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Her iki popülasyon da diğer popülasyonlara göre daha az dirençli bulunmuştur (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

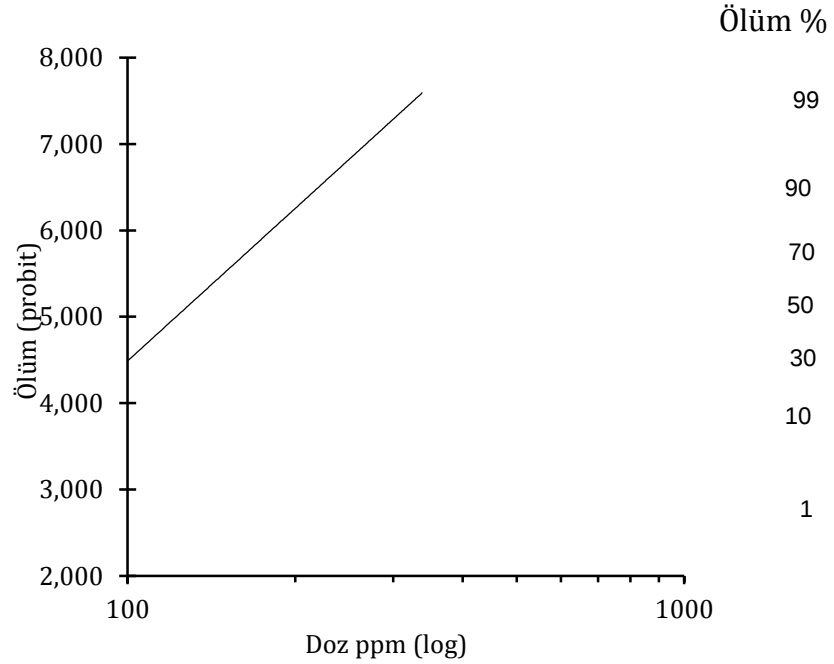


Şekil 4.15. Kütahya RD45 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu

Karaman çiftçi deposundan elde edilen RD19, Diyarbakır Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü deposundan elde edilen RD55 ve Batman buğday pazarından alınan RD56 popülasyonlarına ise *R. dominica* için ayırıcı doz uygulaması sonucu canlı birey görülmediğinden bu popülasyonlar hassas kabul edilmiş ve LC₅₀ çalışmalarına geçilmemiştir.

Elde edilen sonuçlara göre dünyada önemli bir hububat üreticisi konumunda olan Türkiye’de, insan beslenmesi içi gerekli olan buğdayın önemli bir zararlısı *R.dominica*’nın mücadelesinde fosfin kullanımı kaçınılmazdır. Uzun yıllardır

kullanımda olan fosfine karşı *R. dominica* popülasyonlarının yüksek direnç geliştirdiği görülmektedir.



Şekil 4.16. Samsun RD54 popülasyonunun fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğrusu

Örnekleme yapılan illerden elde edilen 18 popülasyonun 15'i yüksek seviyede dirençli bulunmuştur. Diğer üç popülasyonda yüksek seviyede olmasa da direnç gelişimin başladığı görülmüştür. Türkiye *R. dominica* popülasyonlarının %83'ünün fosfine yüksek düzeyde dirençli olduğu görülmüştür. Örnekleme yapılan alanların genellikle ticari depolar olduğu değerlendirildiğinde, *R. dominica* ile mücadelede fosfin kullanılan depolarda direnç gelişmeyen bölgenin olmadığı görülmektedir. Örnekleme yapılan ve direnç görülmeyen Diyarbakır (RD55), Karaman (RD19) ve Batman (RD56) örneklerinin uzun süredir fosfine maruz kalmadığı, depo sahipleri ile yapılan görüşmelerde ifade edilmiştir. Yüksek direnç görülmeyen Samsun(RD56) ve Kütahya (RD45) popülasyonlarında RD56'nın LD₅₀ 123.588 ppm hesap edilmiş ve popülasyonun TMO'dan elde edilmesine rağmen direnç seviyesi diğer TMO'lardan alınan popülasyonlara göre düşük çıkmıştır. Bu durum TMO depolarına çiftçilerden depolanmış buğday alımı yapılmasından dolayı, bu alımlar sırasında dışarıdan sürekli fosfine maruz kalmayan popülasyonun depoya gelmiş olabileceği

ihtimalinin olduğunu göstermektedir. Yine diğer popülasyonlara göre daha düşük seviyede direnç görülen RD45 popülasyonun rutin fosfin uygulaması yapılmayan ancak zaman zaman fosfine maruz kaldığı bilinen çiftçi depolarından alınmış olması direnç oranının diğer popülasyonlara göre düşük olmasının nedeni olarak açıklanabilir. Örnek temin edilen diğer 13 popülasyon ise rutin olarak fosfin uygulamasına maruz kalmasının yanı sıra, bu depolarda sürekli sirkülasyon olduğu, gelen hububatın bazı durumlarda kısa sürede depodan çıkarılarak yeni ürünlerin depolandığı, ithal edilen hububatın bulunabilirliğinin olduğu bilgisi alınmıştır. Bu durum ise fosfine karşı direncin yüksek olmasını açıklamaktadır. Ankara'dan TMO ve özel depolarda 10'dan fazla örnekleme yapılmış olup sadece 2 depodan popülasyon elde edilebilmiştir. Bazı örneklemelerden *R. dominica* bireyleri elde edilmesine rağmen, deneme için yeterli sayıya ulaşılamamıştır. Üretilen TMO popülasyonu 244 kat, Özel sektöre ait un fabrikasından elde edilen popülasyon ise 357 kat dirençli bulunmuştur. Her iki depoda da zararlı görüldüğü sürelerde fosfin uygulaması yapıldığı bilgisi edinilmiştir. Konya'dan elde edilen iki popülasyonun 335 ve 257 kat dirençli olmasının ardından yapılan incelemelerde fosfin uygulama hatalarının ve uzun süreli uygulamanın bu depolarda da yapıldığı görülmüştür. Şanlıurfa, İzmir, Tekirdağ, Samsun, Hatay ve Mersin illerinin en az 3-4 farklı bölgesinden örnekleme yapılmasına rağmen sınırlı sayıda popülasyon elde edilmiştir. Diğer illerde görülen depo koşulları ve fosfin uygulamalarının benzerleri bu illerde de görülmüştür. Mersin ilinden popülasyonunun alındığı deponun ise sürekli olarak transit ürünlerin muhafaza edildiği bir depo olması, ithalat ve ihracat amacıyla gelen ürünlerin bulaşık olması, özellikle Dahilde İşleme Rejimi (DİR) uygulaması ile yurt dışından gelen hububat ürünleri Türkiye' de depolanarak belirli süre sonra hububat ürünlerine dönüştürülerek ihraç edilmektedir. Bu amaçla gelen ürünlerin bulaşık olması, ürünlerin transit geçişi, ithalat ve ihracatın fosfin direnci sorununun uluslararası boyutlarda olduğuna işaret etmektedir. Bu çalışmada, Türkiye popülasyonlarında farklı seviyelerde direnç bulunmuştur. Collins vd. (2002), *R. dominica*'da farklı seviyelerde direnç görüldüğünü moleküler yöntemlerle göstermişlerdir. Afful vd. (2017) ABD'de yaptıkları çalışmada LC₅₀ değerlerinden hesaplanan direnç

oranlarının 5.2, 9.5, 100.2 ve 595.9 kat olduğunu bildirmişlerdir. Opit vd. (2012), Oklahoma'da ticari hububat depolarından toplanan böceklerle yaptıkları çalışmada üç popülasyonun 254, 910 ve 1.519 kat dirençli olduklarını bulmuşlardır.

FAO tarafından 1972-1973 yıllarında yapılan küresel bir araştırmada, fosfine dirençli böceklerin, dünya genelinde örneklenen böceklerin yaklaşık % 10'unu oluşturduğu ortaya çıkmıştır. Fosfine karşı direnç oranı özellikle, *R. dominica*, *T. castaneum* ve *T.confusum*da yüksektir (Champ ve Dyte, 1976; Collins vd., 2002). 45 Ülkeden depolanmış ürün zararlısı böceklerinin en az 11 türünde fosfin direncinin bulunduğu bilinmektedir (Chaudhry, 2000). *R. dominica* ve *Tribolium* türlerinde yüksek düzeyde direnç, Bangladeş (100 kat) (Tyler vd., 1983), Hindistan (380 kat) (Rajendran, 1992; Rajendran ve Narasimhan, 1994), Çin (606 kat) (Ren vd., 1994), Avustralya (Collins, 1998), Filipinler (Acda vd., 2000) ve Brezilya (Ansell ve ark., 1990; Lorini vd., 2007)'dan bildirilmiştir. Brezilya'da depolarda 1991 ve 2003 yılları arasında mücadelede başarısızlık sonucu, alınan *R. dominica* popülasyonlarında 3 farklı yöntem kullanılarak fosfin direnci belirlenmiştir. Ayırt edici doz kullanılarak yapılan denemelerde, 19 numunenin beşinde "zayıf" direnç, 14'ünde "kuvvetli" direnç tespit edilmiştir. Hem LC₅₀ hem LC_{99.9} değerleri belirlenerek hassas popülasyonla yapılan karşılaştırmalarda popülasyonların çoğunun >200 kat dirençli olduğu görülmüştür (Lorini ve Collins, 2006). Pimentel vd. (2008) , Brezilya'nın yedi bölgesi ve 36 yerden fosfin direncinin durumunu değerlendirmek amacıyla *T. castaneum*, *R. dominica*, *S. zeamais* ve *O. surinamensis* popülasyonları toplamışlardır. Her bir popülasyon FAO yöntemine göre test edilmiştir. 2004 ile 2007 yılları arasında toplanan 40 numunedan % 45'inin fosfine dirençli olduğu ve % 35'inin ayırt edici dozda % 90'dan fazlasının ölmediğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar, dört türde fosfin direncinin yaygınlaştığını, Mato Grosso ve Minas Gerais eyaletlerinde bulunan depolanmış ürün zararlılarında fosfin direncinin ilk kez tespit edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca fosfin direncini yönetmek için Brezilya'da fosfin uygulamalarının değiştirilmesi, yeni stratejiler belirlenmesi ve alternatif fümigantların geliştirilmesi gerekliliğini vurgulayarak, test edilen

böcek popülasyonlarının çoğunda fosfine dirençli bireylerin yüksek frekansta olduğunu bildirmektedirler. Ahmad vd. (2013), Pakistan'ın değişik bölgelerinden fosfin direncini belirlemek için topladıkları *R. dominica*, popülasyonlarında yaptıkları denemelerde, *R. dominica* 10- 86 kat dirençli bulunmuştur. Benhalima vd. (2004), Fas'ta depolanmış buğdayın zararlıları *S. oryzae*, *R. dominica*, and *T. castaneum* popülasyonlarındaki fosfin direncini belirlemek üzere FAO yöntemi kullanılarak yaptıkları çalışma sonucunda *S. oryzae* nın bir popülasyonu dışında diğer popülasyonların değişik oranlarda fosfine dirençli bireyler içerdiğini, dirençli olmayan popülasyonların ekonomik nedenlerden dolayı fosfin uygulamasının yapılamadığı depolardan elde ettiklerini söyleyerek, Fas'ta dirençli böceklerin yaygınlığını, fumigasyon uygulamalarının yetersizliğine bağlamış, fumigasyon yöntemlerinin iyileştirilmesinden ve depolama uygulamalarının incelenerek yeniden yapılandırmaya gidilmesini önermiştir. Muralitharan vd. (2016) Hindistan hububat depolarından toplanan 23 *R. dominica* popülasyonuna iki ayırıcı doz kullanarak (0.03 mg/l/20 saat zayıf direnç ve 0.25 mg/l/48 saat kuvvetli direnç) direnç taraması yapmışlardır. Toplanan tüm popülasyonların fosfine karşı yüksek direnç gösterdiği, zayıf dirençli popülasyonun olmadığı görülmüştür. Fosfin direncinin frekansı sırasıyla düşük ve yüksek konsantrasyonlarda yüzde 45.03 ila 95.91 ve yüzde 9.18 ila 89.14 arasında değişmiştir. Gautam vd. (2016), California badem depolama ve işleme tesislerinde *T. castaneum* ve *P. interpunctella* popülasyonlarında PH3 direncinin mevcut olduğunu doğrulayarak, ergin *T. castaneumun* direnç fenotip frekanslarının % 42-100, yumurtada ise % 44-100 arasında, *P. interpunctella* yumurtalarının fenotip direnç frekanslarının % 4 ile % 20 aralığında değişmekle birlikte, larvalarda saptanabilir direnç bulunmadığına dikkat çekmişlerdir. LC₉₉ karşılaştırmalarına dayanarak *T. castaneumun* erginleri için, popülasyonlardaki direnç seviyeleri sırasıyla 6.8, 7.4, 40.1 ve 48.5 kat olduğunu, yumurta için, hassas popülasyonlara karşı direnç seviyelerinin sırasıyla 4.3, 5.5, 11.8 ve 12.7 kat olduğunu belirterek direnç durumunun sürekli takip edilmesinin gerekliliğine vurgu yapmışlardır. Collins vd. (2016), 20 yılı aşkın süredir fosfin direncinin görülmesine ilişkin veriler, bunların toplandığı yerin özellikleri gibi

dirence etkisi olduğu düşünölen istatistikler, doğrusal eğilim analizi ve Bayesian engelli modelleme kullanılarak istatistiki olarak değerdendirilmişlerdir. Sonuçta, çiftliklere kıyasla merkezi depolarda, özellikle ticari depolardaki zararlılarda, güçlü direncin daha fazla olduğunu, *R. dominica* örnekleri buğday, arpa ve sorgum, yulaf ve bezelye bulunan depolardan alınmıştır. Ancak güçlü direnç buğday, arpa ve sorgum ürünlerinden alınan popölasyonlarla ilişkisini bularak, bu ürünlerin dirence pozitif etkisi olduğunu hesaplamışlardır. Çalışmada Doğu Avustralya'daki güçlü direnç gelişimi analizinde, 1997'deki ilk tespitten sonra 2014 yılında dirençli böcekleri içeren örneklerin yaklaşık % 8'ine kadar düzenli bir şekilde arttığı görölmüştür. Zayıf direnç 1990'lı yılların başında doğu Avustralya'daki örneklerin yaklaşık% 10'unda tespit edilmiştir, ancak bu, fosfinin endüstride daha fazla kullanılması ve aynı zamanda 1995'te yaklaşık % 80'e yükselmesi ile birlikte 1990'da hızla% 40.50'ye yükselmiştir. Bayesian engelli modeli ticari depolar, silolar ve mühürlenmemiş depoların güçlü direnç gelişimi ile bağlantılı olduğu ve bu model aynı zamanda 2011'den günümüze kadar güçlü direnç direnci frekansında hızlanan bir artış olduğunu göstermiştir (Collins vd.,2016).

Geçmiş yıllar boyunca Türkiye'de fosfin direnci hakkında bir çalışma yapılmamış olsa bile, uzun yıllar fosfin uygulaması yapılmayan depolardan alınan örneklerde fosfin direncinin düşük çıkmış olması, depo sahibi kurumlardan ve çiftçilerden fosfinin etkisinde düşüklük olduğu yönündeki şikayetlerin artması, depolanmış ürün zararlılarında fosfine karşı direncin son yıllarda arttığı kanısını güçlendirmektedir. Koçak vd. (2017) Türkiye genelinde 14 ilden 28 adet *S. oryzae*, 26 adet *S. granarius* ve 16 adet *O. surinamensis* popölasyonu ile yaptıkları çalışmada *S. oryzae*' de 11 popölasyonda (% 30.8), direncin 3.11 - 200.54 kat arasında olduğu, *S. granarius*'un beş popölasyonunda (% 19.0) 3.48 - 5.26 kat, *O. surinamensis*'in üç popölasyonunda (% 18.6) ise 388.98 - 459.57 kat olduğunu tespit ederek, depolanmış hububatlarda *S. granarius* dışındaki coleopterlerde fosfin direncinin yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Işıkber vd. (2017), Türkiye'de

S. oryzae popülasyonlarının çoğunlukla fosfine karşı yüksek dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

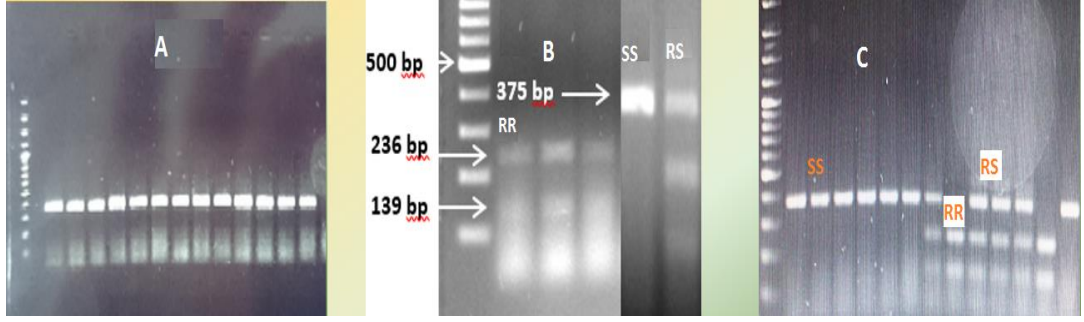
Dünya’da olduğu gibi Türkiye’de fosfin kullanımının artması, tam izolasyon yapılmamış depolarda yapılan fumigasyon, doz ayarlamalarının tahmini olarak fosfin uygulamasıdır (bunun göstergesi uygulanan fosfin miktarının ölçümünde kullanılan fosfin ölçer cihazlarına örnekleme yaptığımız depoların hiç birinde rastlanılmamasıdır). Etkisizlik gözlemlendiği zaman sık ve artan oranda fosfin uygulamaları zaman ilerledikçe dirençli böcek popülasyonlarının artacağı kanaatine varılmıştır.

4.3. Moleküler çalışmalara ait sonuçlar

İnsektisit direncinin moleküler genetiği konusundaki moleküler analiz, hedef alan direncinde genlerin önemini göstermiştir.

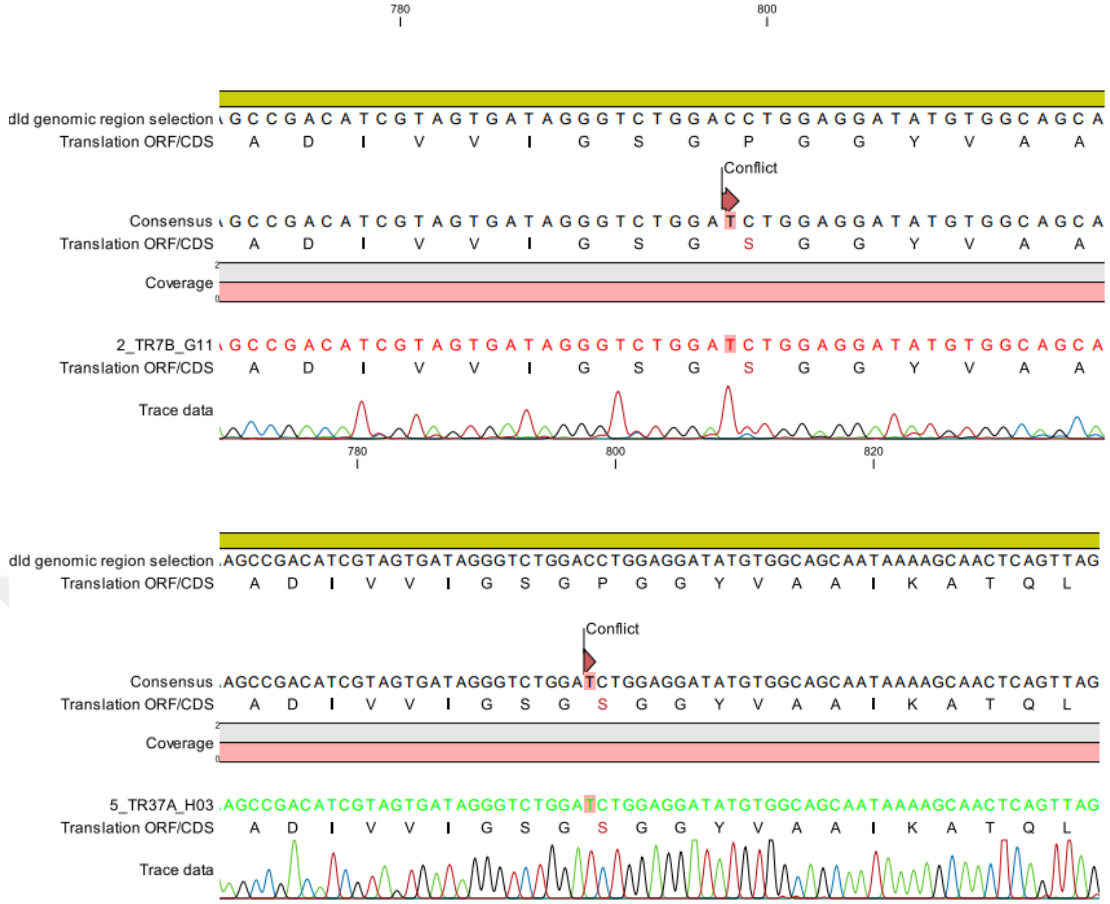
Çalışmanın bu bölümünde Türkiye’deki *R. dominica* popülasyonlarında olası mutasyon varlığını tespit etmek amacıyla toplanan bireylerden genetik analizleri yapılmış ve karşılaştırılmıştır. Fosfin direnci ile ilişkili DLD geninin işlevini değiştiren rph2 lokusundaki genetik varyasyonların tespiti, fosfin direncinin hızlı tespiti için DNA’ya dayalı markerlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Literatürde *R. dominica* DLD geninde meydana gelen mutasyonlara ait çalışmalar bulunmasına rağmen Türkiye popülasyonlarına ait çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışma ile Türkiye’deki *R. dominica* popülasyonlarına ait dirençten sorumlu gen ve bunlar üzerindeki mutasyonlar belirlenerek, fosfin direncinin izlenmesi ve yönetimi için DNA markerlerinin kullanılabilirliği araştırılmıştır. Kullanılan markerlerle bireylerde direnç gen yapısı (homozigot, heterozigot gibi) belirlenmiştir (Şekil 4.17).

Fosfinin böceklerde etki mekanizması, asetilkolinesteraz enziminin sinir sistemindeki etkisini azaltmak, mitokondrideki dehidrojenleri gliserofosfat enzimini bloke etmek ve "Kompleks IV" ü devre dışı bırakmaktadır.



Şekil 4.17. (A) DLD genini kodlayan genomik DNA'dan amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin jel görüntüsü (B) DLD genini kodlayan genomik DNA'dan amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü. (C) Her jelin üzerindeki homozigot hassas (SS), homozigot dirençli (RR) ve heterozigot (RS) kesilmiş ürünler.

Ayrıca, reaktif disülfiddeki fosfin ve sistein arasında, glutatyon redüktaz enzimini bloke ederek sisteinlerin sülfid redoks bağlarının parçalanmasıyla doğrudan bir redoks ilişkisi vardır (Nath vd., 2011). Hassas ve dirençli bireyler arasında değişen bir nükleotid (Sistein'den Threonine'e kadar), prolinin serine dönüştürülmesine neden olmuştur. Bu mutasyon nedeniyle, fosfin direnci oluşmuştur. *R. dominica*'daki kuvvetli dirençten sorumlu olan DLD enzimindeki tek P → S aminoasit mutasyonunun, *R. dominica*'nın kodlama dizisindeki C145T'nin tek bir nükleotid değişikliğinden kaynaklandığını ortaya çıkarmıştır. Yapılan çalışmada dirençli *R. dominica* popülasyonlarında P49S varyantı tespit edildiğinden dolayı yüksek dirençli Rd7 ve Rd37 nolu popülasyonlarından bireyler seçilerek aynı bölgede mutasyon olup olmadığı teyit edilmiştir. Türkiye popülasyonlarında fosfine direnç mutasyonları da aynı bölgede tespit edilmiştir (Şekil 4.18).

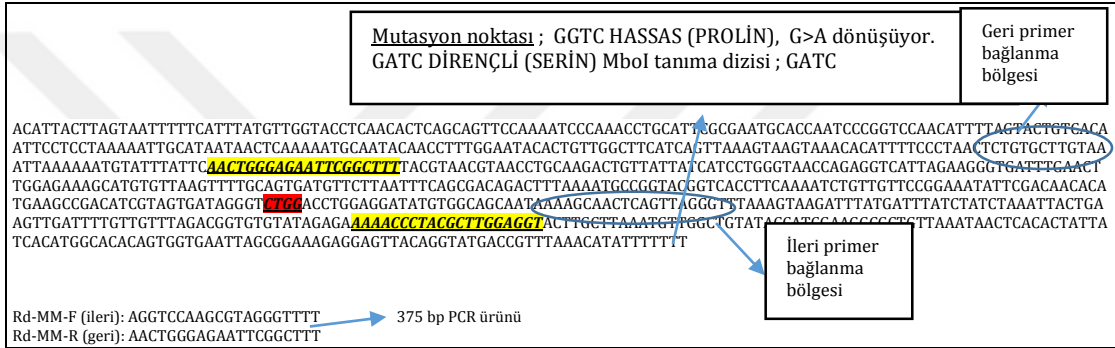


Şekil 4.18. TRD7 ve TRD37 nolu populasyonların popülasyonlarından DLD genlerini izole edilip, sekansı yapılarak, karşılık gelen amino asit dizileri

Chen vd. (2015), hassas ve dirençli popülasyonlardan DLD genlerini izole edip, sekansını yapılarak, karşılık gelen aminoasit dizilerini çıkarmışlardır. ABD, Kuzey Oklahoma 'den toplanan dirençli *R. dominica* popülasyonlarında DLD'de tek bir amino asit mutasyonu olarak P49S tanımlanmıştır. Bu mutasyonu içeren PCR ürünleri, MboI enzimi ile kesilerek dirençli alelin varlığı veya yokluğu tanımlanmıştır (Şekil 4.19). DLD genindeki primer bağlanma bölgeleri ve mutasyon noktasının şematik gösterimi Şekil 20'de verilmiştir.

AusRdRQQRD1722	MQCNLWNTLLASSVKRQTLKCRYGHLQNLFRKYSTTHEADIVVIGSGGGYVAAIKATQ
AusRdRQNRD345	MQCNLWNTLLASSVKRQTLKCRYGHLQNLFRKYSTTHEADIVVIGSGGGYVAAIKATQ
RdLab-S	MQCNLWNTLLASSVKRQTLKCRYGHLQNLFRKYSTTHEADIVVIGSGGGYVAAIKATQ
AusRdRNSRD2864	MQCNLWNTLLASSVKRQTLKCRYGHLQNLFRKYSTTHEADIVVIGSGGGYVAAIKATQ
AusRdSQRd14	MQYNLWNTLLASSVKRQTLKCRYGHLQNLFRKYSTTHEADIVVIGSGGGYVAAIKATQ
AusRdRNSRD3075	MQYNLWNTLLASSVKRQTLKCRYGHLQNLFRKYSTTHEADIVVIGSGGGYVAAIKATQ
RdOK-G	MQYNLWNTLLASSVKRQTLKCRYGHLQNLFRKYSTTHEADIVVIGSGGGYVAAIKATQ
AusRdRQNRD378	MQYNLWNTLLASSVKRQTLKCRYGHLQNLFRKYSTTHEADIVVIGSGGGYVAAIKATQ
AusRdRQQRD569	MQYNLWNTLLASSVKRQTLKCRYGHLQNLFRKYSTTHEADIVVIGSGGGYVAAIKATQ

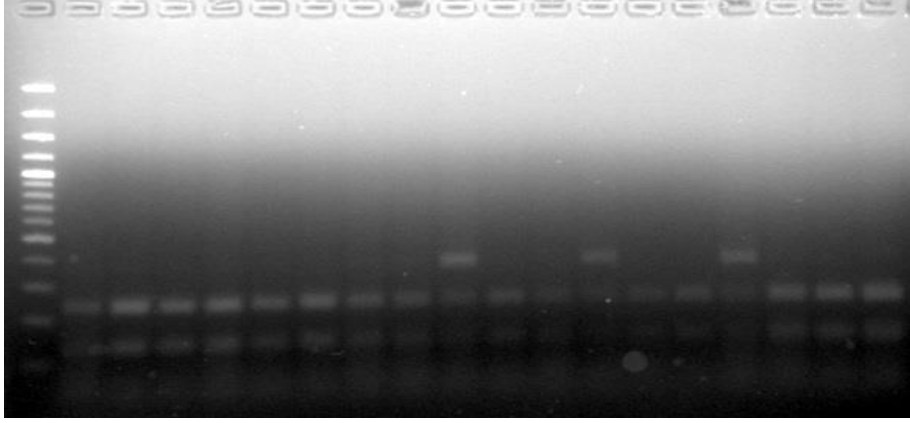
Şekil 4.19. *Rhyzopertha dominica* (F.) popülasyonlarından DLD genlerini izole edilip, sekansı yapılarak, karşılık gelen amino asit dizileri, DLD'nin ClustalW2 tarafından indirgenmiş amino asit dizileri, mutasyona uğramış amino asit sekanslarının kısmı, ABD ve Avustralya *R. dominica*'nın duyarlı ve dirençli bireylerden gelen dizilerin hizalanmasında P49S fosfin dirençli mutasyonları göstermektedir (Chen vd., 2015).



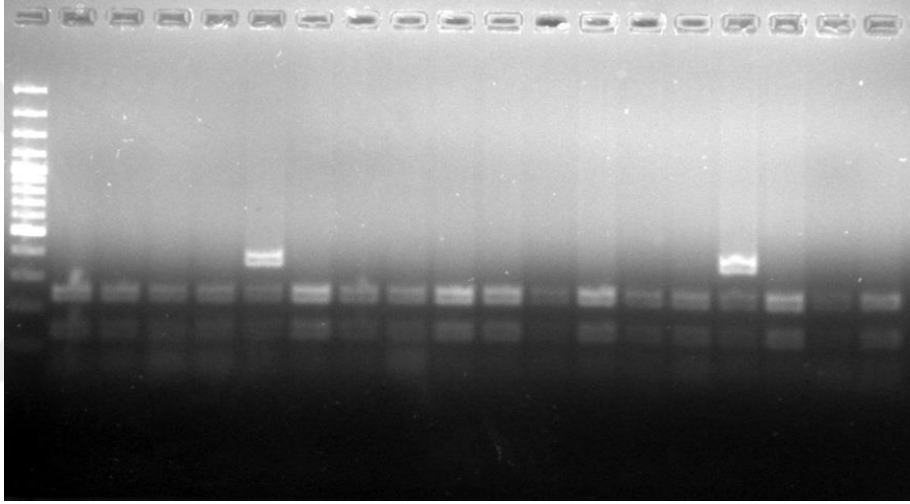
Şekil 4.20. DLD genindeki primer bağlanma bölgeleri ve mutasyon noktasının şematik gösterimi

Fosfin direnci için CAPS markerleri, dirençli böcekleri tespit etmeye ve belirli bir zararlı popülasyonunda direnç yönetimi uygulamalarına yardımcı olduğu bilinmektedir. Yukarıdaki moleküler markerler kullanılarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

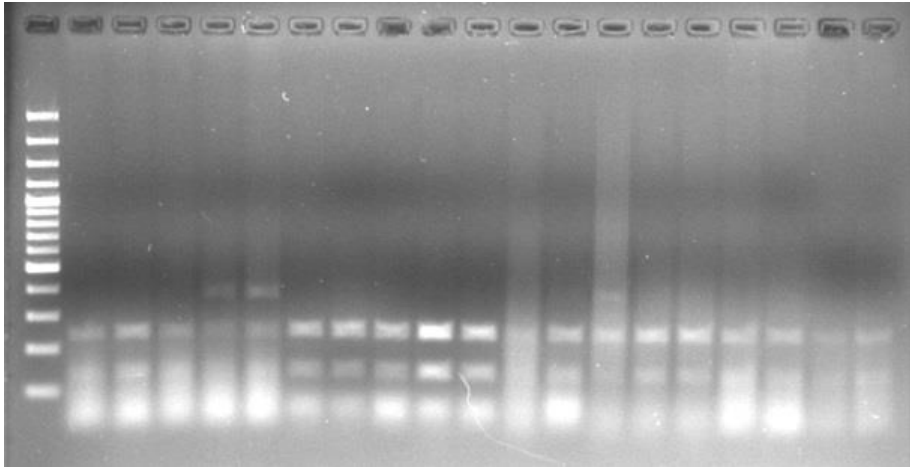
Ankara ili Polatlı ve Sincan ilçeleri buğday depolarından alınan *R. dominica* popülasyonlarının yapılan DLD'nin genomik DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen PCR ürünleri P49S nükleotid dizilerini tanıyan restriksiyon (kesme) MbOI enzimi ile kesimlenmiş jel görüntüleri Şekil 4.21 ve 4.22'de, Konya ili Şekil 4.23 ve 4.24'de, Şanlıurfa ili Şekil 4.25, 4.26 ve 4.27'de, İzmir ili Şekil 4.28 ve 4.29'da, Tekirdağ ili Şekil 4.30 ve 4.31'de, Kütahya ili Şekil 4.32'de, Mersin, Hatay ve Samsun illeri ise sırasıyla Şekil 4.33, 4.34 ve 4.35'de görülmektedir.



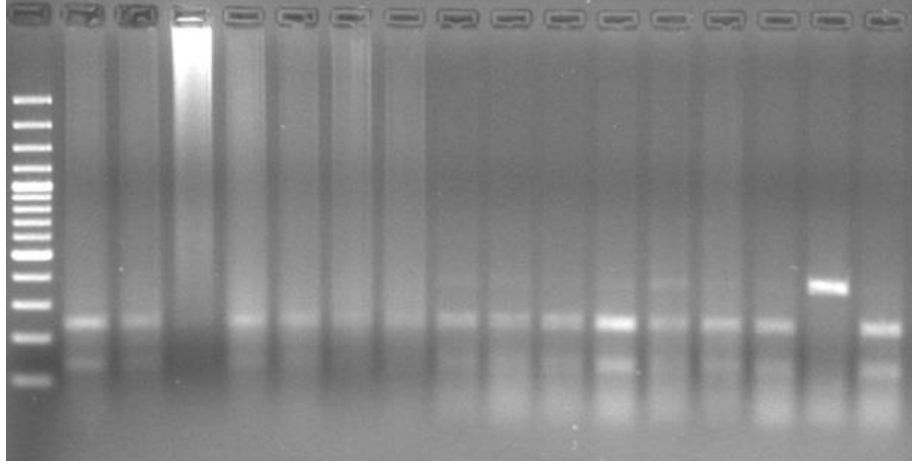
Şekil 4.21. Ankara RD46 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



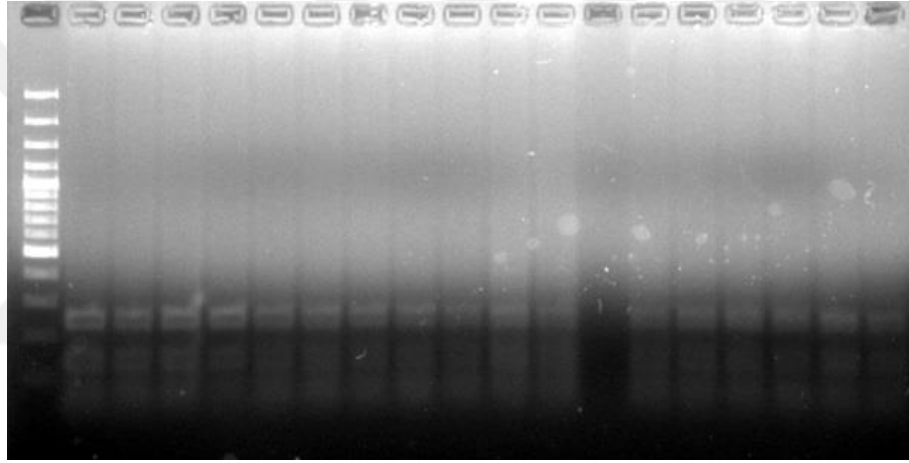
Şekil 4.22. Ankara RD47 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



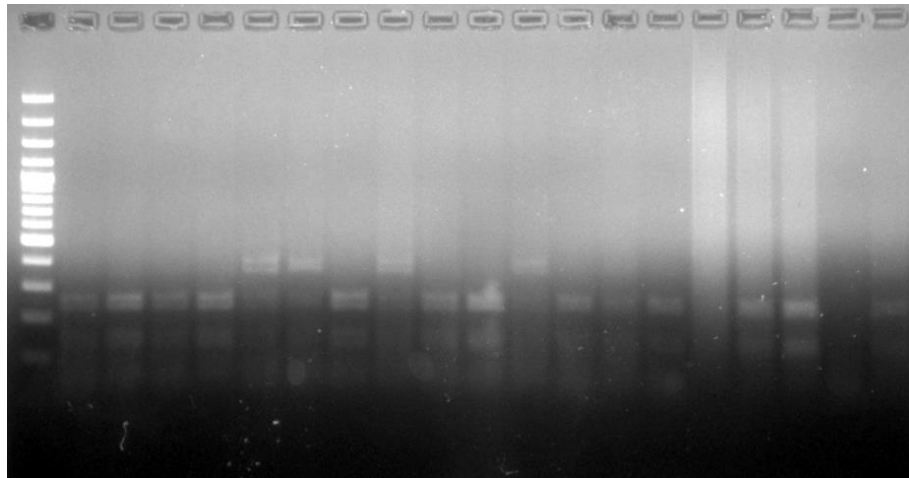
Şekil 4.23. Konya RD6 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



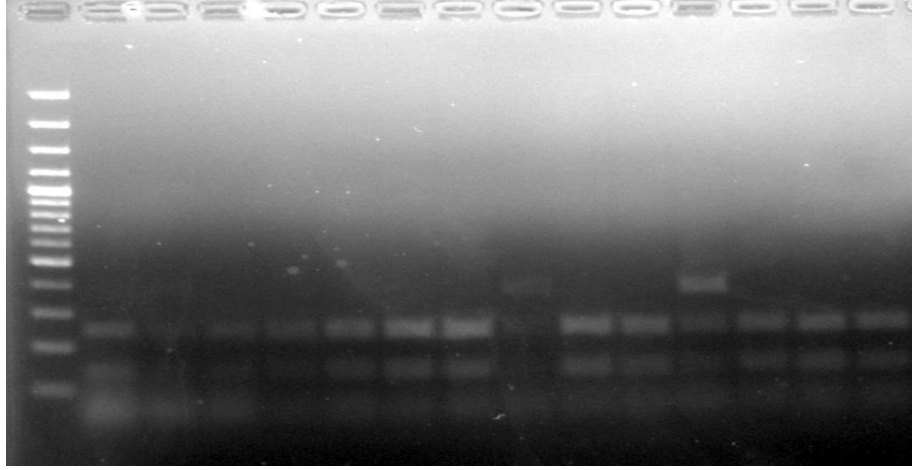
Şekil 4.24. Konya RD17 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



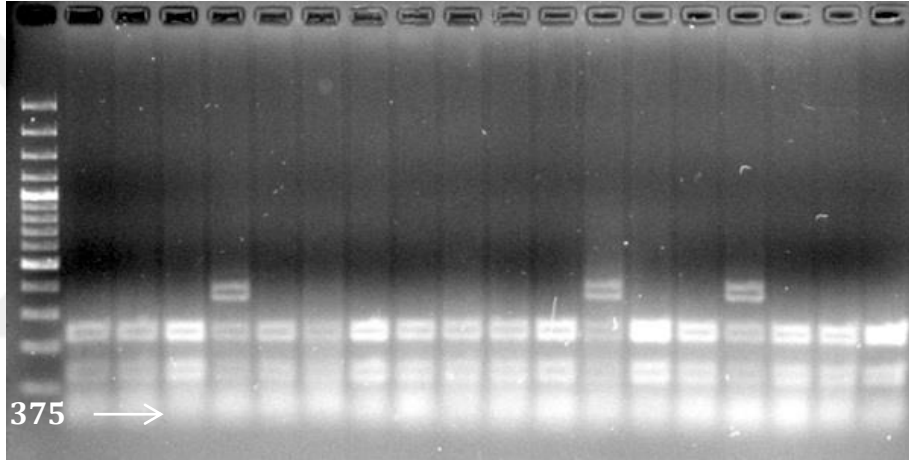
Şekil 4.25 Şanlıurfa RD32 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



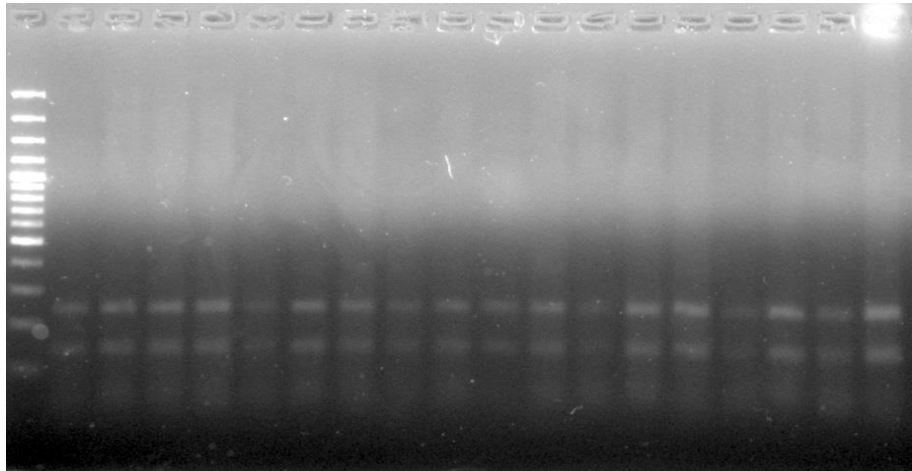
Şekil 4.26. Şanlıurfa RD33 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



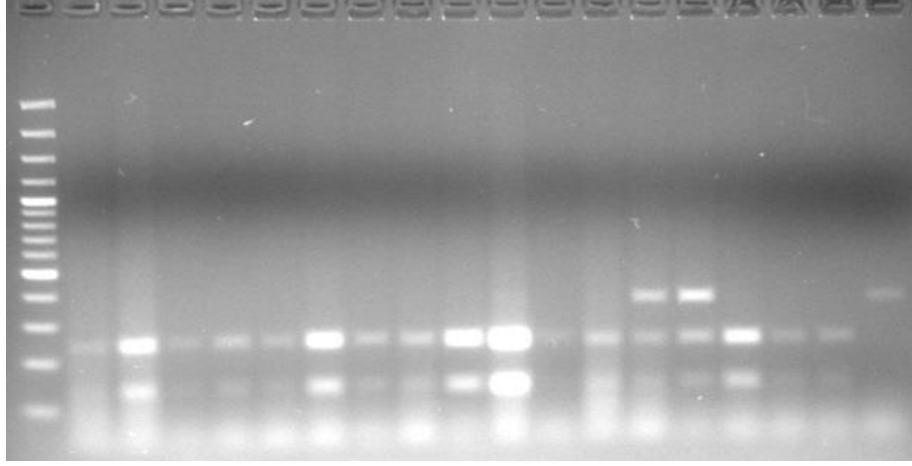
Şekil 4.27. Şanlıurfa RD38 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



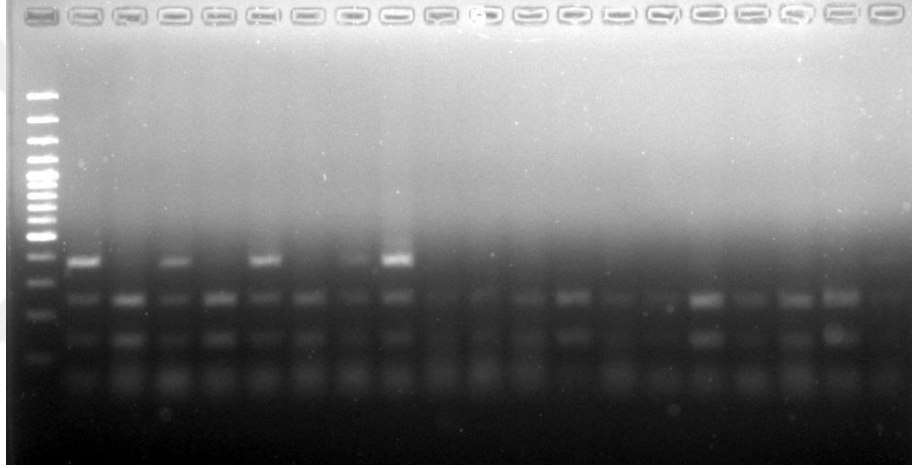
Şekil 4.28. İzmir RD36 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



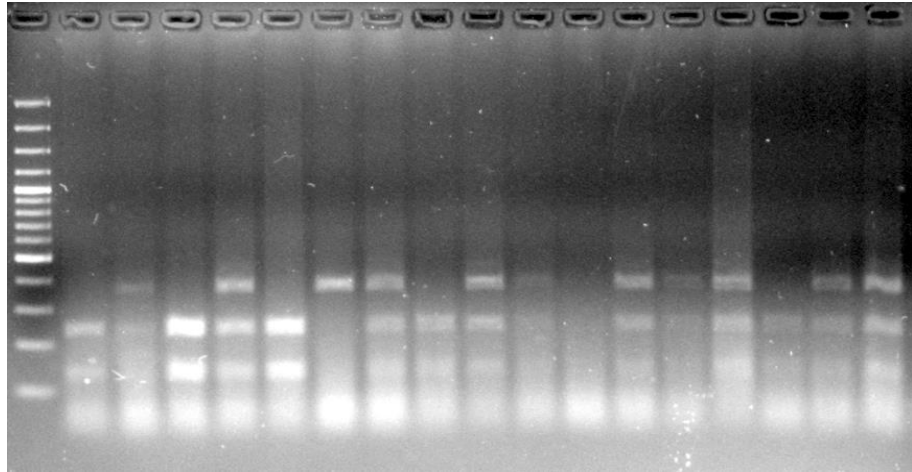
Şekil 4.29. İzmir RD37 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



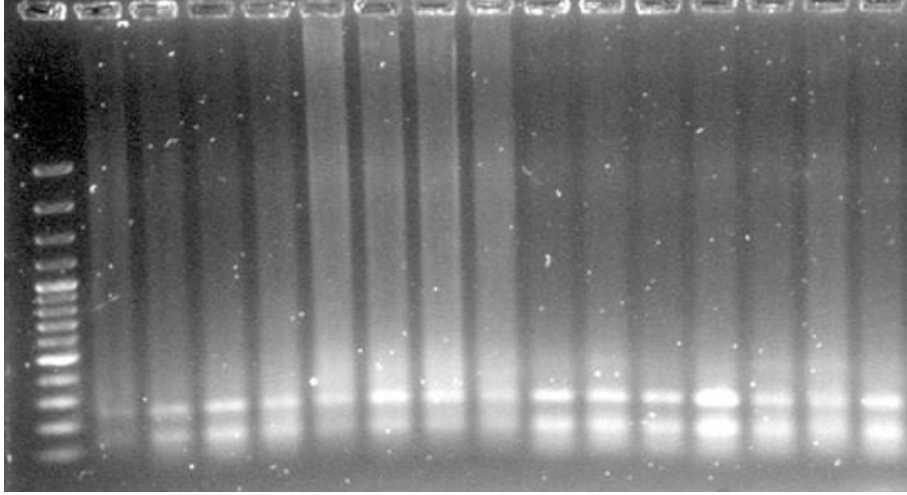
Şekil 4.30. Tekirdağ RD21 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



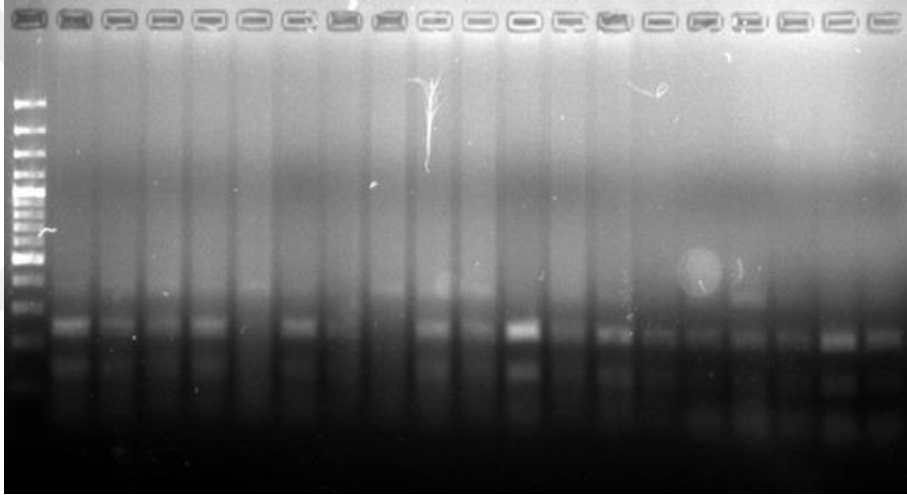
Şekil 4.31. Tekirdağ RD44 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



Şekil 4.32. Kütahya RD45 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü

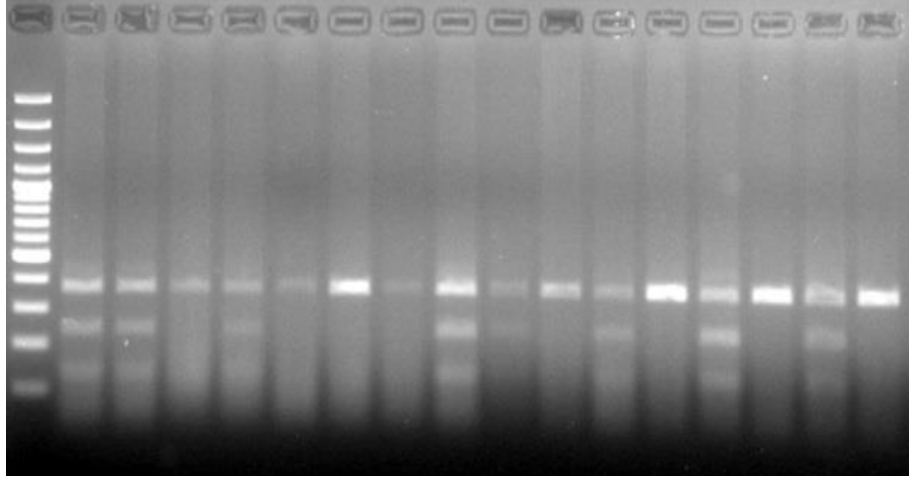


Şekil 4.33. Mersin RD7 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



Şekil 4.34. Hatay RD13 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü

R. dominica popülasyonlarına ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüleri değerlendirilerek elde edilen hassas ve direnç frekanslı MboI-CAPS markerlerinden elde edilen bireysel genotipler ve popülasyon aleli frekansları Çizelge 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.35. Samsun RD54 popülasyonuna ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü

RD46 ve RD47 (Ankara), RD6 ve RD17 (Konya), RD32, RD33 ve RD38 (Şanlıurfa), RD36 ve RD37 (İzmir), RD21 ve RD44 (Tekirdağ), RD45 (Kütahya), RD7 (Mersin), RD13 (Hatay), RD54 (Samsun) illerinden alınan popülasyon örnekleri 20 ppm FAO ayırıcı doz uygulamasında canlı bireyler görüldüğünden dolayı LC_{50} değerleri hesaplanmıştır. RD19 (Karaman), RD55 (Diyarbakır), RD56 (Batman) 20 ppm FAO ayırıcı doz uygulamasında canlı bireyler görülmediğinden dolayı LC_{50} değerleri hesaplanmamıştır. Canlı birey görülen popülasyonların tümünde direnç aleli bulunduğu tespit edilmiştir. CAPS uygulanan RD46 ve RD47 (Ankara) popülasyonlarından RD46' nın 19 bireyden 16'sının (%84,21 RR) homozigot dirençli, 3 (%15,79 RS) adedinin heterozigot dirençli olduğu görülürken, hassas bireye rastlanılmamıştır. RD47' de 18 bireyden 16'sı (%89,99) homozigot dirençli, 2'si (%11,11) heterozigot olarak tespit edilirken homozigot hassas bireye rastlanılmamıştır. RD6 ve RD17 (Konya) popülasyonlarından RD6'nın 19 bireyinden 15'inin (%78,94) homozigot dirençli, 4'ünün (%21,05) heterozigot olduğu görülürken, hassas bireye rastlanılmamıştır. RD17'nin 15 bireyinde 7 (%46,66) homozigot dirençli, 7 (%46,66) heterozigot ve 1 (%6,66) hassas bireye rastlanılmıştır. RD32, RD33 ve RD38 (Şanlıurfa) popülasyonlarından RD32'nin

Çizelge 4.2. *Rhyzopertha dominica* (F.)'popülasyonlarının Rph2 için CAPS markerleri kullanılarak tespit edilen genotipler ve alellerin frekansı

Popülasyon		Popülasyonların alellerine göre direnç durumu				Alellerin frekansı	
Alındığı İl	Örnek Kodu	Birey sayısı	RR (%)	RS (%)	SS (%)	R aleli %	S aleli %
Ankara	RD46	19	16 (84,21)	3 (15,79)	0	92,1	7,89
	RD47	18	16 (89,99)	2 (11,11)	0	94,44	5,55
Konya	RD6	19	15 (78,94)	4 (21,05)	0	89,47	10,52
	RD17	15	7 (46,66)	7 (46,66)	1 (6,66)	70	30
Şanlıurfa	RD32	18	18 (100)	0	0	100	0
	RD33	17	13 (76,47)	4 (23,53)	0	88,23	11,76
	RD38	14	12 (85,71)	2 (14,29)	0	92,85	7,14
İzmir	RD36	18	15 (83,33)	3 (16,67)	0	91,66	8,33
	RD37	18	18 (100)	0	0	100	0
Tekirdağ	RD21	18	15 (83,33)	3 (16,67)	0	91,66	8,33
	RD44	19	13 (68,42)	6 (31,58)	0	84,21	15,78
Kütahya	RD45	16	5 (31,25)	10 (62,5)	1 (6,25)	62,55	37,5
Mersin	RD7	18	18 (100)	0	0	100	0
Hatay	RD13	19	10 (52,63)	8 (42,1)	1 (5,26)	73,68	23,68
Samsun	RD54	16	0	8 (50)	8 (50)	25	75
Karaman	RD19	18	0	0	18 (100)	0	100
Diyarbakır	RD55	18	0	0	18 (100)	0	100
Batman	RD56	18	0	0	18 (100)	0	100

RR:Homozigot dirençli, RS:Heterezigot dirençli, SS:Homozigot hassas

18 (%100) bireyi de homozigot dirençli bulunurken RD33'ün 17 bireyinin 13'ünün (%76,47) homozigot dirençli ve 4'ünün (%23,53) heterozigot, RD38'in ise 14 bireyinin 12'sinin (%85,71) homozigot dirençli, ikisinin (%14,29) ise heterozigot olduğu görülmüştür. RD36 ve RD37 (İzmir) popülasyonlarından

RD36'nın 18 bireyinin 15'i (%83,33) homozigot dirençli, 3' ünün (%16,67) ise heterozigot olduğu, RD37 'nin ise 18 (%100) bireyinin tamamının homozigot dirençli olduğu tespit edilmiştir. RD21 ve RD44 (Tekirdağ) popülasyonlarından RD21'in 18 bireyinden 15'i (%83,33) homozigot dirençli bulunurken, 3'ü (%16,67) heterozigot, RD44'ün 19 bireyinin 13'ünün (%68,42) homozigot dirençli ve 6'sının (%31,58) ise heterozigot olduğu bulunmuştur. RD45 (Kütahya), RD7 (Mersin), RD13 (Hatay) ve RD54 (Samsun) popülasyonlarında RD45'in 16 bireyinin 5'i (%31,25) homozigot dirençli, 10'u (%62,5) heterozigot ve biri (%6,25) hassas olarak tespit edilmiştir. RD7 popülasyonunun ise 18 bireyinin tamamı (%100) homozigot dirençli bulunmuş olup LC₅₀ değeri de bu durumu teyit etmektedir. RD13 popülasyonunun 19 bireyinin 10'u (%52,63) homozigot dirençli bulunurken, 8 heterozigot (%42,1) ve bir adette (%5,26) hassas birey görülmüştür. RD54 popülasyonunun 16 bireyinde 8 (%50) heterizot ve 8 (%50) homozigot hassas birey tespit edilirken, homozigot dirençli birey görülmemiştir. RD19 (Karaman), RD55 (Diyarbakır), RD56 (Batman) popülasyonlarının tamamının (%100) ise homozigot hassas olduğu tespit edilmiştir. *R. dominica*'nın P49S polimorfizminin Ankara RD46 populasyonunda R aleli frekansı %92,1 (35 alel), S aleli frekansı %7,89 (3 alel), R47 popülasyonunda R aleli frekansı %94,44 (34 alel), S aleli frekansı %5,55 (2 alel) olarak belirlenmiştir. P49S polimorfizminin Konya RD6 populasyonunda R aleli frekansı %89,47(34 alel), S aleli frekansı %10,52 (4 alel), R17 popülasyonunda R aleli frekansı %70 (21 alel), S aleli frekansı %30 (9 alel), Şanlıurfa popülasyonları frekansları RD32, R %100 (36 R aleli), RD33' de %88,23 R (30 R aleli), %11,76 S (4 S aleli), RD38' de %92,85 R (26 R aleli), %7,14 S (2 S aleli) olarak hesaplanmıştır. İzmir RD36 populasyonunda R aleli frekansı %91,66 (33 alel), S aleli frekansı %8,33 (3 alel), R37 popülasyonunda R aleli frekansı %100 (36 alel) olarak belirlenmiştir. Tekirdağ RD21 populasyonunda R aleli frekansı %92,66 (33 alel), S aleli frekansı %8,33 (3 alel), R44 popülasyonunda R aleli frekansı %84,21 (32 alel), S aleli frekansı %15,78 (6 alel) olarak belirlenmiştir. Kütahya RD45 populasyonunda R aleli frekansı %62,55 (15 alel), S aleli frekansı %37,5 (7 alel), Mersin RD7 popülasyonunda R aleli frekansı %100 (36 alel), Hatay R13 popülasyonunda R

aleli frekansı %73,68 (28 alel), S aleli frekansı %23,68 (10 alel) olarak, Samsun RD54 popülasyonunda R aleli frekansı %25 (8alel), S aleli frekansı %75 (24 alel) olarak belirlenmiştir. Karaman, Diyarbakır ve Batman illerinden toplanan *R. dominica* popülasyonlarında ise S aleli frekansı %100 (36 alel) bulunarak gözlemlenen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesiyle uyumlu olup olmadığını belirlemek için ki-kare testi kullanılmıştır. Popülasyonların genotip frekansları Hardy-Weinberg dengesinde olduğu anlaşılmaktadır (Çizelge 4.3). Sonuçların toksikolojik çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.3. *Rhyzopertha dominica* (F.)' popülasyonları genotiplerine uygulanan Hardy -Weinberge testi

Popülasyon		Popülasyonlarda gözlenen ve beklenen genotipler			χ^2 (5,99)	İstatistiki önem kontrolü P<0,05
Alındığı İl	Örnek Kodu	RR	RS	SS		
Ankara	RD46	16	3	0	0,14	Uygun
	Beklenen	16,12	2,76	0,12		
	RD47	16	2	0		Uygun
	Beklenen	16,06	1,89	0,06	0,06	
Konya	RD6	15	4	0		Uygun
	Beklenen	15,21	3,58	0,21	0,26	
	RD17	7	7	1		Uygun
	Beklenen	7,35	6,13	1,35	0,19	
Şanlıurfa	RD32	18	0	0		Uygun
	Beklenen		BELİRSİZ			
	RD33	13	4	0		Uygun
	Beklenen	13,24	3,53	0,24	0,3	
	RD38	12	2	0		Uygun
	Beklenen	12,07	1,86	0,07	0,08	
İzmir	RD36	15	3	0		Uygun
	Beklenen	15,12	2,75	0,13	0,15	
	RD37	18	0	0		Uygun
	Beklenen		BELİRSİZ			
Tekirdağ	RD21	15	3	0		Uygun
	Beklenen	15,12	2,75	0,13	0,15	
	RD44	13	6	0		Uygun
	Beklenen	13,47	5,05	0,47	0,67	
Kütahya	RD45	5	10	1		Uygun
	Beklenen	6,25	7,50	2,25	1,78	
Mersin	RD7	18	0	0		Uygun
	Beklenen		BELİRSİZ			
Hatay	RD13	10	8	1		Uygun
	Beklenen	10,32	7,37	1,32	0,14	
Samsun	RD54	0	8	8		Uygun
	Beklenen	1	6	9	1,78	
Karaman	RD19	0	0	18		Uygun
	Beklenen		BELİRSİZ			
Diyarbakır	RD55	0	0	18		Uygun
	Beklenen		BELİRSİZ			
Batman	RD56	0	0	18		Uygun
	Beklenen		BELİRSİZ			

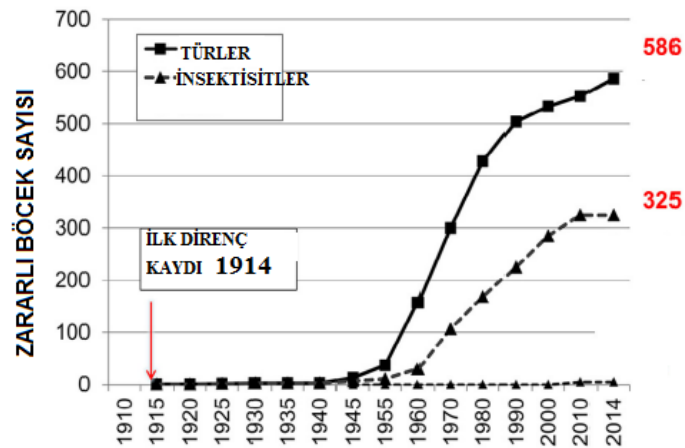
Sonuçlar, DLD genindeki nokta mutasyonun, *R. dominica* türlerinde fosfine karşı direnç ile ilişkili olduğunu, bu direnç geninin Türkiye *R. dominica* popülasyonlarında da oluştuğunu göstermiştir. *R. dominica* ve *T. castaneum* fosfin direncine neden olan iki gen lokusunun (rph1 ve rph2) varlığı ortaya konmuştur (Schlipalius vd., 2008; Shi vd., 2012; Mau vd., 2012a, 2012b; Jagadeesan vd., 2012). Tek Nükleotid Polimorfizm (SNP) çalışmaları, *R. dominica* ve *T. castaneum*'da direnç ile ilişkili iki lokus, yani rph1 (tc_rph1) ve rph2 (tc_rph2) bulunduğunu göstermiştir (Schlipalius vd., 2002; Jagadeesan vd., 2012). Schlipalius vd., (2012) rph2'yi, DLD olarak tanımlamış, DLD ise elektron transferinde doğrudan rol oynayan reaktif disülfür ve FAD kofaktörü içeren, enerji metabolizması için gerekli olan flav bağımlı bir oksidoredüktaz dihidrolipoamid dehidrogenaz olarak tanımlamıştır (Patel ve Roche, 1990) (Williams, 1992). DLD enzimi, işlevsel olarak dört farklı alana sahiptir: FAD kofaktörü için bir bağlanma yeri, NAD + substratı için bir bağlanma yeri, disülfidi oluşturan yer ve Homodimer oluşumu için gereken bir bölge. iki monomer, dimerize olduğunda, protein yüzeyinden aktif bölgeye disülfid oluşturulan bir gözenek oluştururlar (Brautigam vd., 2005). *R. dominica*, *T. castaneum* ve nematod *Caenorhabditis elegans*'da (Maupas) direnç gösteren varyantların da bu yerlerde oluştuğunu göstermiştir. *R. dominica*, *T. castaneum* ve *S. oryzae*'deki fosfin direnci ile ilgili genetik çalışmalar, DLD enzimini kodlayan genden direnç oluşturan varyasyonlar göstermiştir (Schlipalius vd., 2012, Nguyen vd., 2016). DLD'deki mutasyonlar, *R. dominica*'da (Avustralya, Hindistan, ABD, Vietnam) P49S, *T. castaneum*'da (Hindistan, ABD, Türkiye, Vietnam) P45S ve *S. oryzae*'de N505T (Avustralya, Vietnam, Çin) (Schlipalius vd., 2012; Kaur vd., 2015; Koçak vd. 2015; Chen vd., 2015; Nguyen vd., 2016). Hindistan, Türkiye, ABD ve Avustralya'dan toplanan *R. dominica* popülasyonlarında P49S varyantı ve *T. castaneumun* karşılık gelen (P45S) varyantının yaygın olduğu bilinmektedir (Schlipalius vd., 2012, Kaur vd., 2015, Koçak vd., 2015). Başlangıçta Avustralya *R. dominica*'da (Schlipalius et al., 2012) bulunan farklı bir direnç varyantı (P49S) hem *R. dominica* (P49S) hem de *T. castaneum*'da (P45S) Hindistan'da ve Türkiye'de çok miktarda bulunmuştur. Diğer ülkelerde yaygın olarak incelenmemesine rağmen, ABD, Türkiye, Vietnam

ve Brezilya'da tespit edilmiştir. Bu durumu Schlipalius vd., (2012) küresel olarak algılanan en yaygın alel olduğunu bildirerek, P45 / 49S varyantı, her bir bölgede bağımsız bir şekilde ortaya çıkmıştır ve rph2 geninin dizildiği yüzlerce ökaryotik organizmadan başka herhangi bir yerde bulunmamaktadır. Bu, özellikle fosfine maruz kalan canlıların hayatta kalma mekanizması anlamına geldiğini ifade etmişlerdir. Avustralya'dan toplanan dirençli *R. dominica* popülasyonlarında enerji metabolizması için gerekli DLD enzimini kodlayan gende beş aminoasitin (P49S, P85S, K142E, N506H) yer değiştirdiği tespit edilmiştir (Schlipalius vd., 2012). P49S varyantına dayanılarak yapılan bu çalışmada da P49S varyasyonunun yaygın olduğu görülmüştür. Chen vd. (2015), tarafından geliştirilen CAPS markerleri kullanılarak, *R. dominica* popülasyonlarında kuvvetli direnç gelişimi ve varlığı genotipik analizler yapılarak alel frekansları belirlenmiştir. Bazı alel frekansları ile fenotip sonuçlarında sapmalar görülebilmektedir. Hesaplanan alel frekansları her zaman Hardy Weinberg dengesinde olmayabilir, bu tür frekanslar, laboratuvar popülasyonlarında ortaya çıkabilen yakın akrabalık, sürüklenme ve seleksiyon gibi faktörlerden etkilenebileceği ancak yine de bir popülasyondaki kuvvetli dirençli bireylerin sıklığı, kuvvetli dirençli alelinin sıklığından tahmin edilebileceği bildirilmektedir (Chen vd., 2015). Metabolik dirence dahil olan sitokrom P450 gibi çok genli gruplar için bilgiler ortaya çıkması, dirençle ilgili mutasyonların tanımlanması, genom çapında ilişkilendirmesi direnç yönetimi açısından önemlidir. *R. dominica*'da direnç özelliklerinin temelini daha iyi anlamak için, direncin genetik analizleri yapılmıştır. Genetik çaprazlamalar ve fenotip analizi yoluyla, Collins vd. (2002), *R. dominica*'daki ZD'in çoğunlukla tek bir gen kaynaklı olduğuna karar verirken, KD iki veya daha fazla genden kaynaklandığını tespit etmiştir. *R. dominica*'daki genetik markerleri kullanarak yapılan bağlanma analizi, direncin kuvvetli direnç üretmek için sinerji oluşturan iki büyük lokus rph1 ve rph2'ye (yani, fosfin 1 ve 2 direncine) bağlı olduğunu doğrulanmıştır (Schlipalius vd., 2008; Schlipalius vd. , 2002). Schlipalius vd. (2012), rph2 genine bağlı direncin enzim dihidrolipoamid dehidrogenaz (DLD) kritik bölgelerindeki spesifik aminoasit varyantları tarafından verildiğini tespit etmiştir. Fosfin direncinin tanımlanmasına ilave olarak, rph2 olarak tanımlanan

dihidrolipoamid dehidrogenaz (DLD) geninde prolin'in serin'e dönüşmesiyle meydana gelen mutasyonun, fosfin direncinin nedeni olduğu, rph1 geniyle birlikte bulunması durumunda ise kuvvetli dirence neden olduğu tespit edilmiştir. İlaveten bu genlerin oldukça korunmuş bölgeler olduğu bilinmektedir (Schlipalius vd., 2012). Jagadeesan vd. (2012). DLD, çoğunlukla mitokondride enerji metabolizmasının pirüvat dehidrogenaz (PDH), a-ketoglukarat dehidrogenaz (KGDH), dallanmış zincirli amino asit dehidrojenaz (BCKDH) ve glisin bölünme sistemi (GCS) oluşan çoklu enzim komplekslerine katkıda bulunur. Bu durum, fosfine dirençli böcekleri kesin olarak tanımlamak için kullanılabilen moleküler markerlerin temelini oluşturmuştur (Kaur vd., 2013). Dirençten sorumlu genlerin keşfedilmesi, zararlı türlerde hızlı, yüksek verimlilikle izleme ve dirençli alellerin tespit edilmesini, fosfin toksisitesi ve direncinin mekanizmalarını anlaşılmasını sağlamıştır. Bu proje, direnç testleri için böcekleri laboratuarda çoğaltmadan ve araştırmacıların sürekli fosfine maruz kalmasını önleyerek direnç izlemesi için markerlerin kullanımını göstermiştir. Popülasyonun direnç durumu hızlı bir moleküler test ile tek bir böcek üzerinde (canlı veya ölü) bir gün içinde gerçekleştirilebilir ve böylece direnç izleme hızı ve verimliliği artmaktadır. Diğer testlerin aksine, DNA testi, direnç genini taşıyan hassas böceklerinde tanımlanmasını sağlayarak, direnç izleme hassasiyetini arttırmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Direnç için araştırmacılar ve kurumlar tarafından değişik tanımlar getirilmiştir. IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) tarafından böcek popülasyonlarında, pestisit kullanımı, bazen de yanlış kullanım sonucu ortaya çıkan, zararlı popülasyonuna etiket önerisinde uygulanan insektisit beklenen etkiyi göstermemesi ve bu durumun kalıtsal olması olarak tanımlanmaktadır (Anonim 2016). Dünya Sağlık Örgütü (WHO,1958)'ne göre direnç “ normal bir popülasyondaki bireylerin çoğunu öldürdüğü tespit edilen zehirli bir maddenin, belirli bir dozuna karşı, aynı türden diğer bir popülasyondaki bireylerin hoşgörü (tolerans) kazanma yeteneğinin gelişmesi” olarak ifade edilmektedir. Direnç, gelişme süreleri kısa ve çok sayıda nesil veren zararlılarda kısa zamanda ortaya çıkar. Pestisit direnci ile ilgili ilk kayıt 1914 yılında ABD’de *Quadrastpidiotus pernicious*’ta lime-sülfüre karşı görülen direnç için bildirilmiştir (Melander, 1914). Bu tarihten sonra 1946 yılına kadar, toplam 11 böcek türünde insektisitlere karşı direnç belirlenmiştir. Zararlı tür ve bileşiklerin sayısı sürekli olarak artmasına rağmen, olağan bir şekilde, insektisitlerin yoğun, tekrar tekrar kullanılması nedeniyle direnç vakalarının sayısının hızlı bir şekilde arttığı da görülmektedir. Dirence ait ilk bildirimden 2015 yılı sonuna kadar 597 türün 338 bileşiğe toplam 14644 direnç durumu bildirilmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. İnsektisit aktif madde miktarı ve dirençli böcek türü sayısındaki artış (Sparks, T.C. ve Nauen, R., 2015)

Dünyada ve ülkemizde depolanmış ürün zararlıları ile mücadelede yaygın olarak metil bromit ve fosfin gazı kullanılmıştır. Almanya'da 1930'lu yıllarda kullanımına başlanan ve ülkemizde de 70 yıldır yoğun olarak kullanılmakta olan fosfinin düşük maliyetli olması, kolay uygulanabilmesi ve kalıntı sorunu yaşanmaması gibi nedenlerden dolayı kullanımı artmaktadır. Türkiye'de 2011 yılında 157 ton Alüminyum fosfit ve 12 ton Magnezyum fosfit ithalatı gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2012). Metil bromidin karantina uygulamaları dışında kullanımdan kaldırılmasıyla fumigant olarak sadece fosfin kullanılmaktadır. Yapılan uluslararası bir çalışmada fosfin ve metil bromüre karşı 82 ülkeden 849 böcek popülasyonunda böceklerin %20'sinin fosfine ve %5'inin de metil bromid'e karşı dirençli olduğu, en yüksek direnç seviyesinin de (normalin 10-12 katı) *R. dominica*'da bulunduğu bildirilmiştir (www.fao.org). Fosfine direnç durumları göz önüne alındığında özellikle *R. dominica*, *Tribolium* spp. ve *Sitophilus* spp.'de fosfin direnci en yüksek düzeyde bulunmuştur (Champ ve Dyte 1976; Taylor, 1989). Avustralya'da yapılan çalışmada fosfin direncinin görülme sıklığı sırasıyla *T. castaneum*, *S. oryzae*, *R. dominica*, *O. surinamensis* ve *C. ferrugineus* olarak belirtilmiştir (Taylor ve Halliday, 1986). Avustralya'da, 1970'lerin ortalarında *R. dominica*'da ilk kez 20-25 kat direnç tespit edilmiş (Champ ve Dyte, 1976), ancak *R. dominica*'daki kuvvetli direnç ilk kez 1997'de tespit edilmiştir (Collins, 1998). Böceklerde fosfin direncini izlemeye hız kazandıracak olan moleküler markerlerin belirlenmesi önemlidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *R. dominica* ve *T. castaneum*'un DLD geninde prolin'in serin'e dönüşmesiyle meydana gelen mutasyonun, fosfin direncinin nedeni olduğu, rph1 geniyle birlikte bulunması durumunda ise kuvvetli dirence neden olduğu tespit edilmiştir.

Fosfin direnci, uluslararası alanda son yıllarda önemli derecede artmaktadır ve fosfin kullanımı için bir tehdit olduğu görülmektedir. Dirençten sorumlu genlerin keşfedilmesi ve kullanımı birçok zararlı türünde hızlı, güvenilir izleme sağlamıştır. Bu markerler ile direncin nasıl ortaya çıktığı ve mekanizmasının anlaşılması etkili, sürdürülebilir direnç yönetimi için önemli olduğu görülmüştür. Fümigantlara karşı direnç, kullanılan fumigantların sınırlı sayıda

olmasından dolayı mücadelede önemli bir problem kaynağıdır. Kozmopolit olan ve dünyanın diğer bölgelerine kolaylıkla taşınan böcek türlerinde düşük direnç seviyeleri bile ciddi sonuçlara yol açabilir. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de depolanmış ürün zararlılarıyla mücadelede en çok kullanılan fumigant fosfindir. Fosfin kullanımının uzun yıllardır devam etmesine rağmen uygulandığı bazı zararlılarda direnç durumu hakkında birkaç çalışma olmasına rağmen, *R. dominica* popülasyonları ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Ülkemizde fosfinin depo zararlılarında oluşturduğu direnç hakkında ilk çalışma, unbiti (*T. castaneum*)'ndeki fosfin direncini ortaya koymak üzere Koçak vd. (2015) tarafından yapılmıştır.

Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsüne özellikle ambarlarda fosfinle yapılan fumigasyon uygulamalarından istenilen sonucun alınmadığına dair şikâyetler gelmesi, bölgesel veya lokal düzeylerde direnç taraması yapılarak zararlıların direnç durumunun ortaya çıkarılması, etkili bir direnç yönetim programı için popülasyonların direnç geliştirme potansiyeli ve direnç mekanizmalarına ilişkin ayrıntılı bilgilere ihtiyaç duyulması sonucu bu çalışma alınarak tamamlanmıştır. Çalışma sonucunda, Hububat depolarının bulunduğu. Ankara, Konya, Şanlıurfa, İzmir, Tekirdağ, Kütahya, Samsun, Mersin, Hatay, Karaman, Diyarbakır, Batman illerindeki iki ayrı depodan, hububat depolama sırasında Toprak Mahsulleri Ofisi veya özel hububat depolarından *R. dominica* popülasyonlarına ait bireyler toplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *R. dominica* Türkiye hububat depolarında yaygın olarak bulunmakta ve önemli zararlılardan olduğu görülmüştür. Dünya'da önemli bir hububat üreticisi konumunda olan Türkiye'de, insan beslenmesi için gerekli olan buğdayın önemli bir zararlısı *R. dominica*'nın mücadelesinde fosfin yaygın olarak kullanılmaktadır. Uzun yıllardır kullanımda olan fosfine karşı *R. dominica* popülasyonlarının yüksek direnç geliştirdiği görülmektedir. Örnekleme yapılan illerden elde edilen 18 popülasyonun 15'i yüksek seviyede dirençli bulunması, Türkiye *R. dominica* popülasyonlarının %83'ünün fosfine yüksek düzeyde dirençli olduğu göstermektedir. Örnekleme yapılan alanların genellikle ticari depolar olduğu değerlendirildiğinde, *R. dominica* mücadelede fosfin kullanılan

depolar da direnç gelişmeyen bölgenin olmadığı görölmektedir. Diğer üç popölasyonda yüksek seviyede olmasa da direnç gelişiminin başladığı görölmüşür. Bu durumda örnekleme yapılan ve direnç görölmeyen Diyarbakır (RD55), Karaman (RD19) ve Batman (RD56) örneklerinin uzun süredir fosfine maruz kalmadığı depo sahipleri ile yapılan görüşmelerde ifade edilmiştir. Yüksek direnç görölmeyen Samsun(RD56) ve Kütahya (RD45) popölasyonlarında RD56 nın LD₅₀ 123.588 ppm hesap edilmiş ve popölasyonun TMO'dan alınmasına rağmen direnç seviyesi diğer TMO'dan alınan popölasyonlara göre düşük çıkmıştır. Heterojenlik değerlerine bakıldığında ise popölasyondaki bireyler arasında homojenliğin olmadığı, fosfin uygulamasına karşı verilecek tepkininde farklı olacağı kanaati oluşmaktadır. Genelde popölasyonların fosfine karşı gösterdiği logaritmik doz probit ölüm doğruları incelendiğinde ise; popölasyondaki bireylerin duyarlılık yönünden homojen olmadığından, logaritmik doz-probit doğrusu sağa yatay oluşmuştur. Türkiye'deki *R. dominica* popölasyonlarında olası mutasyon varlığını tespit etmek amacıyla toplanan bireylerden genetik analizleri yapılmış ve karşılaştırılmıştır. Fosfin direnci ile ilişkili dld geninin işlevini değıştiren rph2 lokusundaki genetik varyasyonların tespiti, fosfin direncinin hızlı tespiti için DNA'ya dayalı markerlerin geliştirilmesini sağlamıştır. *R. dominica* popölasyonlarına ait bireylerin MboI enzimi ile kesiminin jel görüntüleri değerlendirilerek elde edilen hassas ve direnç frekanslı MboI-CAPS markerlerinden elde edilen bireysel genotipler ve popölasyon aleli frekansları belirlenmiştir. Sonuçlar, DLD genindeki nokta mutasyonun, *R. dominica* türlerinde fosfine karşı direnç ile ilişkili olduğunu, bu direnç geninin Türkiye *R. dominica* popölasyonlarının 15'inde yaygın, 3'ünde ise direnç alelerinin yaygınlaşmaya başladığını göstermiştir. CAPS markerlerinin yüksek fosfin direnci için, dirençli böcekleri tespit etmeye ve doğrulamaya yardımcı olacak ve direnç yönetimi uygulamalarında yararlanılacaktır. Bu çalışma ile Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsünde depo zararlısı böceklerin fosfine karşı direnç çalışmalarında yüksek düzeyde tehlike ve riskler oluşturan fosfin ve moleküler olarak direnç çalışmalarının yapılabileceği laboratuvar oluşturulmuştur.

Moleküler teknikler, böceklerde farklı reseptör alanlarını tespit etmek ve moleküllerin reseptör spesifikliğı ve etki şekli için taranması için kullanılabilir. Fonksiyonel genomik, böcek zararlılarının genetik yapısı ve gen fonksiyonu hakkında bilgi edinilmesini sağlar ve yeni proseslerin keşfedilmesine yol açabilir. Zararlı mücadelesindeki gelişmelere, kimya, genomik, proteomik ve moleküler modelleme kullanarak yeni bileşiklerin sentezine yol açabilir. Moleküler teknikler, gen amplifikasyonu, değiştirilmiş gen transkripsiyonu ve amino asitlerin yer değiştirmesi gibi mutasyonların ve genetik süreçlerin doğasını anlamada yararlanılmaktadır. Bu, hem dirençli aleller için, hem homozigot hem de heterozigot formlarda, özellikle çoklu direnç mekanizmalarına sahip böcek zararlıları için veya biyokimyasal nedenlere bağlı olmayan direnç mekanizmalarının anlaşılmasını sağlamaktadır. İnsektisit dirençli böceklerin gelişimi, yeni adaptasyonların nasıl kazanıldığını incelemede avantajlar sağlamaktadır (Sharma C. H., 2008).

Fosfin direnci için moleküler markerler endüstriyel izleme, ekolojik araştırma ve direnç yönetimi uygulamalarının değerlendirilmesi, aynı genlerin küresel olarak fosfin direncinden sorumlu olduğunun bilinmesi, yerel testler yapmaya veya böceklerin canlı kültürlerini devam ettirmeden uluslararası olarak karşılaştırılabilir çalışmalar yapılmasını sağlamaktadır. Bu bilgilere dayanılarak zararlı mücadelesi planları ve stratejisini belirlemede, fosfinin rutin kullanımını uzatacağı beklenmektedir (Schlipalius vd., 2014).

Türkiye *R. dominica* popülasyonlarında hem etkinlik testi hem de moleküler olarak yapılan direnç belirleme çalışmalarında popülasyonların yüksek düzeyde dirençli olduğu görülmüştür. Tespit edilen direnç seviyeleri özellikle hububat depolarında fosfin uygulayıcılarının zorluklarla karşılaştığını ve bunu aşmak için kendi yöntemlerine başvurabileceklerini göstermektedir. Bitkileri ve bitkisel ürünleri zararlılardan korumak için pestisit kullanımı arttıkça, pestisitlere dirençli zararlı sayısı da artmaktadır. Uygulanan pestisitlerin etkisizliğini gidermek için yetiştiriciler ya dozu ya da uygulama sayısını arttırmaktadır. Bunun sonucu olarak çevre daha çok kirlenmekte, hedef dışı organizmalara olumsuz etkiler artmakta, direnç kazanan zararlıların doğal

düşmanları pestisitlerden daha fazla etkilenmekte ve doğal denge de tamamen zararlılar lehine bozulmaktadır. Pimentel (2005), direncin ortaya çıkmasının ekonomik ve çevresel maliyetlerinin olduğunu, zararlıların direnci, yeterli mücadeleyi sağlamak için daha yüksek dozlarda ve daha sık pestisit uygulamalarına neden olacağını, verimdeki zararın, pestisit miktarının artırılmasına rağmen bile görülebileceğini, ABD’de pestisit direncinin yıllık maliyetinin yaklaşık 1,5 milyar dolar olduğunu bildirmektedir.

Fosfinin sürdürülebilir kullanımı sağlamak için, fosfin direnci ile ilgili sonuçlar araştırmacıların, fosfin ticareti yapanların, uygulayıcıların ve yöneticilerin bir araya gelerek bir an önce Türkiye’de fosfin kullanım yönetimine geçilmesi, ulusal fosfin direnç yönetim stratejisinin belirlenmesi ve uygulanması gerekliliğini göstermiştir. Bu strateji; direnç gelişim faktörlerinin belirlenmesi, direnç izleme sisteminin oluşturulması, alternatif mücadele yöntemlerinin kullanımının sağlanması, alternatif fumigantların kullanımının değerlendirilmesi, fosfin kullanımının bölgelere göre sınırlandırılması, fosfinin kullanım talimatının yeniden hazırlanması, uygulama sayısının düzenlenmesi, fosfin uygulama dozlarının depolara göre düzenlenmesi, hububatta fosfin kullanımını en aza indirmek için hijyen, soğutma, kontrollü atmosfer uygulamaları ve diatom toprakları olmak üzere kimyasal olmayan kontrol yöntemlerinin kullanımı üzerinde durulması gibi başlıklarda çalışmalara başlanarak, Türkiye’nin yerli ve yabancı hububat pazarını korumak için fosfin direncini yönetim stratejisi ortaya koyulmalıdır.

KAYNAKLAR

- Acda, M. A., 2000. Phosphine resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) from the Philippines. MSc. Thesis. St. Lucia, Australia: The University of Queensland. 79 p.
- Acda, M.A. Bengston, M., Daglish, G.J., 2000. Response to phosphine of susceptible and resistant strains of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) from the Philippines. Asia Life Science, 9(2) p. 103-113.
- Afful, E. Elliot, B., Nayak, M.N., Phillips, T. W., 2017. Phosphine Resistance in the Lesser Grain Borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). Journal of Economic Entomology, XX(X), 1-7.
- Ahmad A., Ahmed, M., Noorullah, Q., Ali, M., Abbas, M. and Arif, S., 2013. Monitoring of Resistance Against Phosphine in Stored Grain Insect Pests in Sindh. Middle-East Journal of Scientific Research, 16 (11), 1501-1507.
- Al-Hakkak, Z.S., Al-Azzawi, M.J., Al-Adhamy, B.W., Khalil, S.A., 1989. Inhibitory action of phosphine on acetylcholinesterase of *Ephesia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Stored Products Research 25(3), 171-174.
- Anonim, 1995. Zirai Mücadele Teknik Talimatları Cilt- 2, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, 291s.
- Anonim, 2012. GTHB veriler. Erişim Tarihi: 10.07.2013. www.gkgm.gov.tr.
- Anonim, 2016. TMO hububat Raporu. Erişim Tarihi: 01.01.2018. www.tmo.gov.tr.
- Anonymous, 2013. Methods Handbook Contributing Institutions Updated 18.03.2013 Version 1.5 AISRF Grand Challenge Ensuring, Food Security, 56 s.
- Anonymous, 2016. Resistance Definition. Erişim Tarihi: 10.07.2016. <http://www.irc-online.org/about/resistance/>
- Ansell, M. R., Dyte, C. E. and Smith, R. H., 1990. The Inheritance of Phosphine Resistance in *Rhyzopertha dominica* and *Tribolium castaneum*. In: Fleurat-Lessard, F. and Ducom P., ed. 5th Working Conference of Stored Product Protection, Bordeaux, France. Institut National dela Recherche Agronomique. p. 961-969.
- Banks, H.J., Annis, P.C., 1990. Comparative advantages of high CO₂ and low O₂ types of controlled atmospheres for grain storage. In: Calderon M and

- Barkai-Golan R (eds). Food Preservation by modified atmospheres. CRC Press: Boca Raton, Florida, pp 93-122.
- Bell, C. H., 2000. "Fumigation in the 21st century Crop Protection". Crop Protection, 19, 563-569.
- Benhalima, H., Chaudhry, M.Q., Mills, K.A. and Price, N.R., 2004. Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. Journal of Stored Products Research, 40; 241-249.
- Bond, E. J., 1963. The Action Of Fumigants on Insects: IV. The Effects of Oxygen on The Toxicity of Fumigants To Insects. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 41(4): 993-1004.
- Bond, E.J., 1984. Manual of fumigation for insect control. FAO Plant Production and Protection Paper 54.
- Boxall, R.A., 2001. Post-harvest losses to insect: a world overview. International Biodeterioration&Biodegradation, 48; 137-152.
- Brautigam, C. A., Chuang, J. L., Tomchick, D. R., Machius, M. and Chuang D. T., 2005. Crystal structure of human dihydrolipoamide dehydrogenase: NAD⁺/NADH binding and the structural basis of disease-causing mutations. Journal of Molecular Biology, 350:543-552.
- Brown, A. W. A. 1958. Insecticide resistance in arthropods. WHO Monograph Series, No: 38, 240 p., Switzerland.
- Busvine, J. R., 1971. "A Critical Review of the Techniques for Testing Insecticides". Commonwealth Institute of Entomology, London.
- Cao, Y., Daglish, G. J. and Liu, X., 2004. Characterisation of response to phosphine in adults of representative strains of *Sitophilus zeamais* (MOTSCH.), *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F.) from China. Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products, Gold-Coast Australia, 8-13th August 2004. FTIC Ltd. Publishing, Israel . pp. 301-310.
- Carothers, D.J, Pons, G., Patel, M.S., 1989. Dihydrolipoamide dehydrogenase functional similarities and divergent evolution of the pyridine nucleotide disulfide oxidoreductases. Archives of Biochemistry and Biophysics 268(2), 409-425.
- Champ, B. R. and Dyte, C. E., 1976. Report on FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests. Rome, FAO Plant Production and Protection.
- Chaudhry, M. Q., 1997. Review A Review of the Mechanisms Involved in the Action of Phosphine as an Insecticide and Phosphine Resistance in Stored-Product Insects. Pesticide Science, 49, 3, 213-228.

- Chaudhry, M.Q., Bell, H.A., Savvidou, N., Macnicoll, A.D., 2004. Effect of low temperatures on the rate of respiration and uptake of phosphine in different life stages of the cigarette beetle *Lasioderma serricorne* (F.). *Journal of Stored Products Research*, 40,125-134.
- Chaudhry, M.Q., Price, N.R., 1989. Biochemistry of phosphine uptake in susceptible and resistant strains of two species of stored product beetles. *Comparative Biochemistry and Physiology C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 94(2): 425-430.
- Chefurka, W., Kashi, K.P., Bond, E.J., 1976. The effect of phosphine on electron transport in mitochondria. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 6(1): 65-84.
- Chen, Z., Schlipalius, D., Opit, G., Subramanyam, B., Phillips, T.W., 2015. Diagnostic Molecular Markers for Phosphine Resistance in U.S. Populations of *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica*. *PLoS One* 10(3): e0121343.
- Cheng, Q., Valmas, N., Reilly, P.E.B., Collins, P.J., Kopittke, R., Ebert, P.R., 2003. *Caenorhabditis elegans* mutants resistant to phosphine toxicity show increased longevity and cross-resistance to the synergistic action of oxygen. *Toxicological Sciences*, 73(1): 60-65.
- Cheng, Q., 2008. Studies on phosphine toxicity and resistance mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. Ph.D Thesis. The University of Queensland: Brisbane, Australia, 151 p.
- Collins, P. J., 1998. Resistance to grain protectants and fumigants in insect pests of stored products in Australia. In: Banks, H. J., Wright E. J. and Damcevski K. A., ed. *Stored grain in Australia: Proceedings of the Australian Post-harvest Technical Conference*, Canberra, Australia. CSIRO. p. 55-57.
- Collins PJ, Daglish, G.J., Bengston, M., Lambkin, T.M., Pavic, H., 2002. Genetics of resistance to phosphine in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Economic Entomology*, 95(4), 862-869.
- Collins, P.J. Daglish G. J., Pavic, R. H., Kopittke, A., 2005. Response of mixed-age cultures of phosphine-resistant and susceptible strains of lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, to phosphine at a range of concentrations and exposure periods. 41, 4, 373–385.
- Collins P. J., Falk, M. G. Nayak, M.K. Emery, R.N. Holloway, J.C., 2016. Monitoring resistance to phosphine in the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, in Australia: A national analysis of trends, storage types and geography in relation to resistance detections. *Journal of Stored Products Research*, 70 (2017) 25-36.

- Croft, A.B., 1990. Developing a Philosophy and program of pesticide resistance management. In: Roush RT, Tabashnik BE (Ed), Pesticide Resistance in Arthropods. Chapman and Hall, Newyork, pp. 277-296.
- Daglish Gj, Bengston, M., Lambkin, T.M., Pavic, H., 2002. Genetics of Resistance to Phosphine in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). Journal of Economic Entomology, August, 95(4), 862-9.
- Ebert, P. R., Reilly, P.E.B., Mau, Y., Schlipalius, D., Collins, P.J., 2003. The molecular genetics of phosphine resistance in the lesser grain borer and implications for management. Proceedings of the Australian Postharvest Technical Conference, Canberra, 25–27 June 2003.
- Emekçi, M. and Ferizli, A. G., 2000. Current status of stored products protection in Turkey. Integrated Protection of Stored Products, IOBC Bulletin, 23 (10), 39–46.
- Erakay, S., 1974. Ege Bölgesi'nde Un ve Undan Mamul Maddelerde Bulunan Zararlı Böcekler Üzerinde Araştırmalar. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü, İstiklal Matbaası, İzmir, 60s.
- Esin, T., 1971. Hububat ve Bakliyat Ambar Zararlıları Mücadele Talimatı. Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Mesleki Kitaplar Serisi, Ankara.
- Evans, D.E., 1987. Stored products In Integrated Pest Management: Burn, A.J., Coaker, T.H., Jepson, P.C. (Editors), The Michigan University, Academic press, s. 421-426.
- FAO, 1975. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative method for adults of some major pest species of stored cereals, with methyl bromide and phosphine-FAO Method No. 16. FAO Plant Protection Bulletin, No. 23, 12-25.
- FAO, 2012. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides, Guidelines on Prevention and Management of Pesticide Resistance. Erişim Tarihi: 20.09.2017. www.fao.org/fileadmin.
- FAO, 2013. Phosphine. Erişim Tarihi: 10.10.2017 www.fao.org/docrep/x5042e/x5042e0am
- FAO, 2017a. Global Information and Early Warning System. Erişim Tarihi: 10.10.2017. <http://www.fao.org/gIEWS>
- FAO, 2017b. Toxicity of fumigants to insects. Erişim Tarihi: 18.12.2017. <http://www.fao.org/docrep/x5042e/x5042E04.htm#>

- Flinn, P., Phillips, T., Hagstrum, D., Arthur, F. and Throne, J., 2000. Modeling the effects of insect stage and grain temperature on phosphine induced mortality for *Rhizoperta dominica*. In Donahage, E.J., Navarro, S. and Leesch, J. (eds) 68 Proc.Int.Conf. on Controlled Atmospheres and Fumigation in Stored Products, Fresno, CA. 29 Oct-3 Nov, 531-539.
- Gautam, S. G., Opit, G. P. and Hosoda, E., 2016. Phosphine Resistance in Adult and Immature Life Stages of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) Populations in California. Journal of Economic Entomology, 109, 6, 1 December 2016, Pages 2525–2533.
- Guo, J., Wang, Z. and Francis, F., 2017. Use of molecular markers for entomological diversity assessment and their application in population study of aphids, Faunistic Entomology, 70, 49-62.
- Hetz, S.K. and Bradley, T.J., 2005. Insects breathe discontinuously to avoid oxygen toxicity. Nature, **433**(7025): 516-519.
- Hoskins, W. M. and Gordon, H. T., 1956. Arthropod resistance to chemicals. Annual Review Entomology, 1, 89-122.
- Hoskins, W. M., 1960. Use of the dosage-mortality curve in quantitative estimation of insecticide resistance. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America, 2 (1), 85-91.
- Işıkber, A.A., Özdamar, H.Ü., Karcı, A., 2005. Kahramanmaraş ve Adıyaman İllerinde Depolanmış Buğdaylar Üzerinde Rastlanan Böcek Türleri ve Bulaşma Oranları. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Dergisi, 8(1): 107-113.
- Işıkber, A. A., Sağlam, Ö., Bozkurt, H., Doğanay, İ. Ş., 2017. Determining Phosphine Resistance in *Sitophilus oryzae* (L.) (Rice Weevil) Populations From Different Geographical Regions of Turkey. p. 60. Conference of the IOBC-wprs (OILB-srop) Working Group on “Integrated Protection of Stored Products” Ljubljana, Slovenia, 3-5 July 2017.
- Jagadeesan, R., 2010. Molecular characterization of phosphine (fumigant) resistance in grain insect pests using the rust red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) as a model organism. Ph.D Thesis, The University of Queensland, Brisbane, Australia.
- Jagadeesan, R., Collins P.J., Daglish G.J., Ebert P.R., Schlipalius D.I. 2012. “Phosphine resistance in the rust red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae): inheritance, gene interactions and fitness costs”, PLoS ONE 7(2), e31582.

- Kahraman, E., 2009. Kuru meyve güvesi, *Plodia interpunctella* (H.) (Lepidoptera: Pyralidae)' ya fosfinin bazı etkileri üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 46 s, Ankara.
- Kashi, K.P., Bond, E.J., 1975. The toxic action of phosphine: Role of carbon dioxide on the toxicity of phosphine to *Sitophilus granarius* (L.) and *Tribolium confusum*. DuVal. Journal of Stored Products Research, 11(1): 9-15.
- Kaur, R., 2012. Molecular genetics and ecology of phosphine resistance in Lesser Grain Borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy at School of Biological Sciences, The University of Queensland, Australia.
- Kaur, R.P., Ebert, P. R., Walter, G. H., Swain, A. J. and Schlipalius, D. I., 2013. Do Phosphine Resistance Genes Influence Movement and Dispersal Under Starvation? Journal of Economic Entomology, 106(5), 2259-2266.
- Kaur, R., Mohankumar, S., Jagadeesan, R., Daglish, G. J., Nayak, M. K., Naik, H. R., Ramasamy, S., Subramanian, C., Ebert P. R., Schlipalius, D. I., 2015. Phosphine resistance in India is characterised by a dihydrolipoamide dehydrogenase variant that is otherwise unobserved in eukaryotes. Heredity, 115(3):188-94.
- Koçak, E., Schlipalius, D., Kaur, R., Tuck, A., Ebert, P., Collins, P., Yılmaz A., 2015. Determining phosphine resistance in rust red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Coleoptera: Tenebrionidae) populations from Turkey. Turkish Journal of Entomology, 39 (2):129-136.
- Koçak, E., Yılmaz, A., Alpkent, Y. N., Ertürk, S., 2017. Phosphine resistance to some coleopteran pests in stored grains across Turkey. p. 61. Conference of the IOBC-wprs (OILB-srop) Working Group on "Integrated Protection of Stored Products" Ljubljana, Slovenia, 3-5 July 2017.
- Kuang, J., Zuryn, S., Valmas, N., Cha'on, U, Cui, Y.W., Cheng, Q., Tuck, A., Collins, P.J. and Ebert, P.R., 2008. Biochemical mechanisms of phosphine action and resistance. Proceedings of the 8th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products. 8th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products, Chengdu, China, 55-60, 21-26 September.
- Lorini, I., and Collins, P.J. 2006. Resistance to phosphine in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) collected from wheat storages in Brazil. 9th International Working Conference on Stored Product Protection, Brazil, pp: 319-323.
- Lorini, I., Collins, P.J, Daglish, G. J, Nayak, M. K. and Pavic, H., 2007. Detection and characterisation of strong resistance to phosphine in Brazilian

Rhyzopertha dominica (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). Pest Management Science, 63:358–364.

- Malagon, M.E., Trochez, P.A., 1985. Evaluation of weight losses in stored wheat caused by the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* Fabricus (Coleoptera: Bostrychidae) and observations on its life cycle under laboratory conditions. Acta Agronomica, 35: 78-90.
- Malekpour, R., Rafter, M. A., · Daglish, G. J. · Walter, G. H., 2017. The movement abilities and resource location behaviour of *Tribolium castaneum*: phosphine resistance and its genetic influences. Journal of Pest Science, Erişim tarihi: 25.12.2017. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0935-z>.
- Mau, Y.S., Collins P.J., Daglish G.J., Nayak M.K., Pavic, H., 2012a. The rph1 gene is a common contributor to the evolution of phosphine resistance in independent field isolates of *Rhyzopertha dominica*. PLoS ONE 7(2), e31541, 1-13.
- Mau, Y.S., Collins, P.J., Daglish, G.J., Nayak, M.K., Ebert, P.R., 2012. The rph2 Gene Is Responsible for High Level Resistance to Phosphine in Independent Field Strains of *Rhyzopertha dominica*. PLoS ONE 7(3): e34027. doi:10.1371/journal.pone.0034027.
- Melander, A. L., 1914. Can insects become resistant to sprays? Journal of Economic Entomology, 7, 167-173.
- Mitcham, E., Martin, T., Zhou, S., 2006. The mode of action of insecticidal controlled atmospheres. Bulletin of Entomological Research 96: 213-222.
- Muralitharan, V., Rajan, T. S., Chandrasekaran, S., Mohankumar, S., 2016. Investigation on resistance to phosphine in lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrychidae) collected from Tamil Nadu, India. Current Biotica, 10, 1 pp.5-12.
- Nakakita, H., 1987. The mode of action of phosphine. Journal of Applied Entomology and Zoology 12: 299-309.
- Nath, S.N., Bhattacharya, I., Tuck, G.A., Schlipalius, I. D., Ebert, P.R., 2011. Mechanisms of Phosphine Toxicity. Journal of Toxicology, 49:4168.
- Nguyen, T. T., Collins, P. J., Duong, T. M., Schlipalius, D. I. & Ebert, P. R. 2016. Genetic Conservation of Phosphine Resistance in the Rice Weevil *Sitophilus oryzae* (L.). Journal of Heredity, 107, 228-237.
- Opit, G. P., Phillips, T. W., Aikins, M. J. and Hasan, M. M., 2012. Phosphine Resistance in *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* From Stored Wheat in Oklahoma. Journal of Economic Entomology, 105(4): 1107-1114.

- Özer, M., Toros, S., Çobanoğlu, S., Çınarlı, S., Ekmekçi, M., 1989. İzmir İli ve çevresinde depolanmış hububat, un ve mamulleri ile kuru meyvelerde zarar yapan acarına takımına bağlı türlerin tanımı, yayılışı ve konukçuları. Doğa, Türk, Tarım ve Ormancılık Dergisi, 13: 1154-1189.
- Patel, M.S., Roche, T.E., 1990. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. FASEB Journal 4(14), 3224-3233.
- Phillips, T. W., Bonjour, E. L., Payne, K., Noyes, R. T., Cuperus, G. W., Schmidt, C. and Mueller, D. K., 1998. Effects of Exposure Time, Temperature and Life Stage on Mortality of Stored Grain Insects Treated with Cylinderized Phosphine. Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-product Protection, Canberra, Australia, 1, 320-325.
- Pimentel, D., 2005. Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States. Environment Development Sustainable, 7, 229-252.
- Pimentel, M. A. G., Faroni, L.R.D., Batista, M. D. and Da Silva, F. H., 2008. Resistance of stored-product insects to phosphine. Pesquisa Agropecuária Gaúcha, Brasília, 43, 12, p.1671-1676.
- Pimentel, M.A.G, Faroni L.R.D.'A, Silva, F.H.D., Batista, M.D., Guedes R.N.C., 2010. Spread of Phosphine Resistance among Brazilian Populations of Three Species of Stored Product Insects. Neotropical Entomology 39(1):101-107.
- Potter, W.T., Garry, V.F., Kelly, J.T., Tarone, R., Griffith, J., Nelson, R.L., 1993. Radiometric assay of red-cell and plasma cholinesterase in pesticide applicators from Minnesota. Toxicology and Applied Pharmacology, 119(1): 150-155.
- Price, N.R., 1984. Active exclusion of phosphine as a mechanism of resistance in *Rhyzopertha dominica* (F) (Coleoptera: Bostrychidae). Journal of Stored Products Research, 20(3): 163-168.
- Price, L.A., Mills, K.A., 1988. The toxicity of phosphine to the immature stages of resistant and susceptible strains of some common stored product beetles, and implications for their control. Journal of Stored Products Research 24, 51-59.
- Rajak, R.L., Hewlett, P.S., 1971. Effects of some synergists on the insecticidal potency of phosphine. Journal of Stored Products Research, 7(1),15-19.
- Rajendran, S., 1992. Selection for resistance to phosphine or methyl bromide in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Bulletin of Entomological Research, 82, 119-124.

- Rajendran, S., Nayak, K.R. and Anjum, S.S., 2001. The action of phosphine against the eggs of phosphine-resistant and susceptible strains of *Rhyzopertha dominica* F. Pest Management Science, 57, 422-426.
- Rasmussen, H. B., 2012. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting, Gel Electrophoresis - Principles and Basics, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/37724.
- Ren, Y. L., O'Brien I. G. and Whittle G. P., 1994. Studies on the effect of carbon dioxide in insect treatment with phosphine. In: Highley, E., Wright E. J., Banks H. J. and Champ B. R., ed. Stored Products Protection, Proceeding of the 6th International Conference on Stored Product Protection, Canberra, CAB, Wallingford, UK. p. 173-177.
- Schlupalius, D.I., Cheng, Q, Reilly, P.E, Collins, P.J, Ebert, P.R., 2002. Genetic linkage analysis of the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* identifies two loci that confer high-level resistance to the fumigant phosphine. Genetics, 161:773-782.
- Schlupalius, D. I., Collins, P. J., Mau, Y. S. and Ebert P. R., 2006. New tools for management of phosphine resistance. Outlooks on Pest Management 17(2), 52-56.
- Schlupalius, D.I., Chen, W., Collins, P.J., Nguyen, T., Reilly, P.E.B., Ebert, P.R., 2008. Gene interactions constrain the course of evolution of phosphine resistance in the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. Heredity, 100, 51, 506-516.
- Schlupalius, D. I., Valmas, N., Tuck, A. G., Jagadeesan, R., Ma, L., Kaur, R., Goldinger, A., Anderson, C., Kuang, J., Zuryn, S., Mau, Y. S., Cheng, Q., Collins, P. J., Nayak, M. K., Schirra, H. J., Hilliard, M. A., Ebert, P. R. 2012. A core metabolic enzyme mediates resistance to phosphine gas. Science, 338(6108),807-810.
- Schlupalius, D.I., Ebert, P.R. and Collins, P.J., 2014. An emerging international picture of phosphine resistance: opportunities for global cooperation. International Working Conference on Stored Product Protection (IWCSPP), Chiang Mai, Thailand. 24-28 November, 2014.
- Sharma, C. H., 2008. Molecular Techniques for Developing New Insecticide Molecules and Monitoring Insect Resistance to Insecticides. Biotechnological Approaches for Pest Management and Ecological Sustainability, CRC Press, 1420088483, 9781420088489, p., 546.
- Shi, M., Renton, M., Ridsdill-Smith, R., Collins, P. J., 2012. Constructing a new individual-based model of phosphine resistance in lesser grain

- borer (*Rhyzopertha dominica*): do we need to include two loci rather than one? *Journal of Pest Science*, 85 (4), 451-468.
- Soderlund, D.M., Bloomquist J.R., 1990. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Roush RT, Tabashnik BE, (Ed), *Pesticide Resistance in Arthropods*. Chapman and Hall, Newyork, 58-96.
- Solomon, M. D., 1951. Control of humidity with potassium hydroxide, sulphuric acid or other solutions. *Bulletine Entomology Research*, 42, 543-554.
- Song X.H., Wang, P. and Zhang H.Y., 2011. Phosphine resistance in *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) from different geographical populations in China. *African Journal of Biotechnology*, 10(72), 16367-16373.
- Sparks, T.C. and Nauen, R., 2015. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 122–128.
- Subramanian, S., Chandel, R., Dwivedi, V., Srivastava, C., 2016. DNA markers for phosphine resistance in populations of *Tribolium castaneum* from Punjab, India. *Proceedings of the 10th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation* in Pp. 414-417.
- Şayeste, N., 1971. *Rhyzopertha dominica* F.'nin Çeşitli Ökolojik Şartlarda Biyolojisi ile Bu Türe Değişik Sıcaklık ve Nemde Alüminyum Fosfit 'in Etkileri Üzerinde Araştırmalar. T.C. Tarım Bakanlığı Ziraî Mücadele ve Ziraî Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları, 75 s., Ankara.
- Taylor, R.W.D. & Halliday D., 1986. The geographical spread of resistance to phosphine by coleopterous pests of stored products. In: *Proceedings of the Crop Protection Conference, Pest and Diseases (17–20 November 1986)* Brighton, Metropole, England.
- Taylor, R. W. D., 1989. Phosphine a major grain fumigant at risk. *International Pest Control* 31(1),10-14.
- Taylor, R.W.D., 1994. Methyl bromide- Is there any future for this noteworthy fumigant? *Journal of Stored Products Research*, 30, 253–260.
- Tyler, P. S., Taylor R. W. and Rees D. P., 1983. Insect resistance to phosphine fumigation in food warehouses in Bangladesh. *International Pest Control*, 25(1),10-13, 21.
- UNEP, 1995. Montreal Protocol on substances that deplete the ozone layer. 1994 Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee. 1995 Assessment. UNEP, Nairobi, Kenya, 304pp. ISBN 92- 807 1448-1448-1.

- Williams, C.H.J., 1992. Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase-a family of flavoenzyme transhydrogenases. In: Muller F (ed). Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes. CRC Press: Boca Raton.
- Winks, R.G., Waterford, C.J., 1986. The relationship between concentration and time in the toxicity of phosphine to adults of a resistant strain of *Tribolium castaneum* (Herbst). Journal of Stored Products Research 22(2), 85-92.
- World Health Organization, 1988. Phosphine and selected metal phosphides, IPCS, Environmental Health Criteria 73, WHO, Geneva.
- Yorgancılar, M., Yakışır, E. M., Erkoyuncu, T., 2015. Moleküler Markerlerin Bitki Islahında Kullanımı, Journal of Bahri Dağdas Crop Research 4 (2), 1-12.
- Zettler, L.J. and Keever, D.W., 1994. Phosphine Resistance in Cigarette Beetle (Coleoptera: Anobiidae) Associated with Tobacco Storage in the Southeastern United States. Journal of Economic Entomology, 87 (3): 546-550.
- Zettler, J.L. and Arthur, F.H., 2000. Chemical control of stored product insects with fumigants and residual treatments. Crop Protection, 19, 577-582.
- Zuryn, S., Jujiao, K., Ebert P., 2008. Mitochondrial Modulation of Phosphine Toxicity and Resistance in *Caenorhabditis elegans*. Toxicological Sciences, 102(1), 179-186.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Abdullah YILMAZ
Doğum Yeri ve Yılı : Bozkır, 1968
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : yilmazabdullah@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Bozkır Lisesi, 1985
Lisans : Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü
Yüksek Lisans : Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Entomoloji

Mesleki Deneyim

Sağlık Bakanlığı 1988-1996
Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü-ANKARA 1997-.....(halen)

Yayınları

- Aksu, P., Yiğit, N., Yılmaz, A., 2015. Biyosidal Ürünler ve Kalıntı. Uluslararası Katılımlı 2. Ulusal Biyosidal Kongresi, Çeşme-İzmir.
- Alpkent, Y.N., Çağırğan, O., Yılmaz, A., 2015. Pestisitlerin Mikroorganizmalar Tarafından Parçalanarak Ayrışma Ürününe Dönüştürülmesi. Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi, 6(2): 7 – 14.
- Alpkent, Y.N., Çağırğan, O., Yılmaz, A., 2015. Pestisitlerin Mikroorganizmalar Tarafından Parçalanarak Ayrışma Ürününe Dönüştürülmesi. 12. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi. Bildiri Özeti Kitabı, 22.sf. 14 – 17 Eylül 2015, Muğla.
- Babaroğlu, N., Çilingir, İ., Gökdoğan, A., Özkan, M., Koçak, E., Aydar, A., Sabahoglu, Y., Dursun E., Yılmaz, A., Kan, M., Türkoğlu, M., Ergül, İ., 2013. Süne [*Eurygaster* spp. (Heteroptera: Scutelleridae)] Mücadelesinde Yardımcı Hava Akımlı Tarla Pülverizatörünün Etkinliğinin Araştırılması. 1. Bitki Koruma Ürünleri ve Makineleri Kongresi, Antalya.
- Bağcı, F., Yılmaz, A., Ertürk, S., 2014. Ankara İli Hububat Depolarında Bulunan Zararlı Böcek Türleri. Bitki Koruma Bülteni, 54(1), 69-78.

- Demiröz, D., Aksu, P., Yılmaz, A., 2016. Sebze Üretim Alanlarında Zarar Yapan Yaprak Biti Popülasyonlarının İnsektisit Karışımlarına Karşı Direnç Durumlarının Değerlendirilmesi. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi, 5-8 Eylül 2016, Konya.
- Demiröz, D., Yılmaz, A., Erdurmuş G., 2017. Şeftali Yaprakbiti *Myzus persicae* [(Sulzer) (Hemiptera: Aphididae)]'nin Neonikotinoidli ve Sentetik Piretroidli İnsektisitlere Direnç Durumlarının Belirlenmesi. İç Anadolu Bölgesi 3. Tarım ve Gıda Kongresi (26-28 Ekim 2017) Cumhuriyet Üniversitesi, SİVAS.
- Ertürk, S., Yılmaz, A., Fırat, T. A., Alkan, M., 2017. Trans-Anethole ve Karbondioksit karışımının *Rhyzopertha dominica* (Fab.), *Tribolium castaneum* (Herbst) ve *Sitophilus oryzae* (L.)'ye karşı fümigant etkisi. Bitki Koruma Bülteni, 57(3):391-400.
- Koçak, E. and Yılmaz, A., 2006. The insecticide applications against sunn pest in Turkey. Poster presentation. 6th International Congress of Turkish Society of Toxicology, November 2-5, 2006, Antalya, TURKEY.
- Koçak, E., Schlipalius, D., Kaur, R., Tuck, A., Ebert, P., Collins, P., Yılmaz, A., 2015. Determining phosphine resistance in rust red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Coleoptera: Tenebrionidae) populations from Turkey. Turkish Journal of Entomology, 39 (2),129-136.
- Koçak, E., Yaman, M., O., Yılmaz, A., AlpKent, Y. N., 2017. Pest Resistance to Phosphine in Stored Grains, p. 32, XXIV Konferencja Naukowej Infrastruktura I Srodowisko Dobczyce, 26-28 czerwca.
- Koçak, E., Yılmaz, A., AlpKent, Y. N., Ertürk, S., 2017. Türkiye'de Depolanmış Hububatta Bazı Coleoptera Takımına Bağlı Zararlıların Fosfin Direnci. Conference of the IOBC(OILB-srop) Working Group on "Integrated Protection of Stored Products" Ljubljana, Slovenia, 3-5 July
- Yılmaz ,A., Demircioğlu, A., Yeşilöz, H., 2010. Kapadokya bölgesinde *Simulium* spp (Diptera: Simuliidae) Mücadelesi Üzerinde Araştırmalar. Ekoloji, 19, 77, 107-112.
- Yılmaz A., 2017. Pesticide (Plant Protection Products) Registration in Turkey. 5th Annual Eastern Europe Regulatory Conference: Registration of Plant Protection Products, 11-12 April, Budapest, Hungary.
- Yılmaz A., Asaroğlu, M., Çetin, H., Koçak, O., Çakır, G., 2006. Biological activity of different rate of piperonil butoksit combination with permethrin or cypermethrin against *Musca domestica* (L.), (Diptera: Muscidae). 8th European Congress of Entomology, September 17-22, İzmir, Turkey.

- Yılmaz, A., 2005. Halk sağlığı açısından önem taşıyan diğer zararlılar ve mücadele yöntemleri. Halk Sağlığı Alanında Haşere Mücadelesinde Sorumlu Müdür Eğitimi Ders Notları, Sağlık Bakanlığı, Ankara, 54-60.
- Yılmaz, A., 2005. Halk sağlığı açısından önem taşıyan kemiriciler ve mücadele yöntemleri. Halk Sağlığı Alanında Haşere Mücadelesinde Sorumlu Müdür Eğitimi Ders Notları, Sağlık Bakanlığı, Ankara, 47-53.
- Yılmaz, A., 2006. The Damage and Management of Wild Boar (*Sus scrofa* L.) in Agricultural Areas of Turkey. 57 th annual meeting of the european association for animal production in Antalya, Turkey, on 17th - 20th September.
- Yılmaz, A., 2010. Tarla Fareleri (*Microtus* spp.) ve Mücadele Yöntemleri. Tarım Türk Dergisi, 21:90-93.
- Yılmaz, A., 2012. Depolarda Fare ve Sıçanlarla Mücadele Yöntemleri. TÜRKTOB, 2, S.48-49.
- Yılmaz, A., 2012. Tarla Fareleri (*Microtus* spp) ve Tarla Fareleriyle Mücadele Yöntemleri. TÜRKTOB, 2, S.50-51.
- Yılmaz, A., 2013. Kemirgenlerde Entegre Zararlı Yönetimi (IPM) ve Direnç. 1. Ulusal Vektör Mücadelesi Sempozyumu, 10.Mart, Antalya, Bildiri Kitapçığı, S.44-47.
- Yılmaz, A., 2014. Türkiye de *Simulium* Salgınları. 1. Ulusal Biyosidal Kongresi Antalya.
- Yılmaz, A., 2015. Biyosidal Ürünler ve Ara Ürünler. Uluslararası Katılımlı 2. Ulusal Biyosidal Kongresi Çeşme-İzmir.
- Yılmaz, A., 2015. Kemirici Mücadelesinde İzleme ve Rodentisit Etkinin Değerlendirilmesi. Parasitec, İstanbul Turkey.
- Yılmaz, A., 2016. Bitki Koruma Ürünlerinin Etkili Ve Güvenli Kullanımı. Çiftçi ve Köy Dünyası Dergisi, Şubat, 44-46.
- Yılmaz, A., 2016. İnsektisitlerde Direnç Gelişimi. 3.Uluslararası Biyosidal Kongresi 22-25 Kasım 2016/Antalya,
- Yılmaz, A., 2017. Kemiricilerle Mücadelede Antikoagulant Direnci. Parasitec, İstanbul Turkey.
- Yılmaz, A., Asaroğlu, M., Fassold, E., 2007. Bitki Koruma Ürünleri Ve Biyosidal Ürünleri. Tarım İlaçları Kongre Ve Sergisi, 25-26 Ekim, Ankara, Bildiriler, Sayfa 320-329.

- Yılmaz, A., Bağcı, F., 2011. Depolanmış Ürün Zararlıları ve Mücadele Yöntemleri. Tarım Türk Dergisi, 27:90-93.
- Yılmaz, A., Demircioğlu, A., Yeşilöz, H., 2010. Black Fly (Diptera:Simuliidae) Control with the Biological Larvacide *Bacillus thuringiensis* var. israelensis in the Middle Kızılırmak River of Cappadocia, Turkey . 4th International Simuliidae Symposium, October 12-15, in Antalya, Turkey.
- Yılmaz, A., Elmalı, M., 2002. Değişik fasulye çeşitlerinde fasulye tohum böceği [*Acanthoscelides obtectus* (Say) (Col.: Bruchidae)]' nin gelişme ve çoğalması. Bitki Koruma Bülteni, 42(1-4), 35-52.
- Yılmaz, A., İnci, A., Tunçbilek, A. Ş., Yeşilöz, H., Koçak, O., Şirin, Ü., İça, A., Yıldırım, A., Demircioğlu, A. Düzlü, Ö., 2007. Orta Kızılırmak Havzasında (*Simulium lineatum* (Diptera: Simuliidae) İstilas. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 4(2) 91-95.
- Yılmaz, A., İnci, A., Tunçbilek, A. Ş., Yeşilöz, H., Koçak, O., Şirin, Ü., İça, A., Yıldırım, A., Demircioğlu, A. Düzlü, Ö., 2010. An Outbreak of Black Fly (*Simulium lineatum* Diptera: Simuliidae) in Central Basin of Kızılırmak River. 4th International Simuliidae Symposium, October 12-15, in Antalya, Turkey.
- Yılmaz, A., İnci, A., Tunçbilek, A. Ş., Yeşilöz, H., Koçak, O., Şirin, Ü., İça, A., Yıldırım, A., Demircioğlu, A. Düzlü, Ö., 2007. Orta Kızılırmak Havzasında Karasinek (Diptera: Simuliidae) istilas. XV. ulusal parazitoloji Kongresi. 18-23 Kasım, Kayseri-Ürgüp, Bildiriler, Sayfa 155-156.
- Yılmaz, A., Koçak, E., 2016. Proteazların İnsektisit Olarak Kullanılması. III. Ulusal Vektör Mücadelesi Sempozyumu, 10-12 Kasım, ANTALYA.
- Yılmaz, A., Koçak, E., 2017. Phosphine resistance in the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) populations from Turkey. p.62, Conference of the IOBC-wprs (OILB-srop) Working Group on "Integrated Protection of Stored Products" Ljubljana, Slovenia, 3-5 July.
- Yılmaz, A., Uslu, M.S. ve Şirin, Ü. 2014. Konya-Beyşehir Bölgesinde *Simulium* spp. (Diptera: Simuliidae) Salgını ve Mücadelesi. II. Ulusal Vektör Mücadelesi Sempozyumu 06-09 Kasım, Antalya.
- Yılmaz, A., Uzunok, S., 2003. Fare ve sıçan kontrolünde kullanılan antikoagulant rodentisitler. Zararlı Kemirgenler (Mammalia: Rodentia), Mücadele Yöntemleri ve Ekosistem Yönetimi Çalıştay Bildirileri, S. 162-168. Ankara.
- Yılmaz, A., Uzunok, S., 2003. Fare ve sıçan kontrolünde kullanılan antikoagulant rodentisitler. Zararlı Kemirgenler (Mammalia: Rodentia), Mücadele Yöntemleri ve Ekosistem Yönetimi Çalıştay Bildirileri, S. 162-168, Ankara.

- Yılmaz, A., Uzunok, S., 2003. Ziraî mücadelede çinko fosfür kullanımı, araştırma ve uygulama çalışmaları. Zararlı Kemirgenler (Mammalia: Rodentia), Mücadele Yöntemleri ve Ekosistem Yönetimi Çalıştay Bildirileri, S.168-177, Ankara.
- Yılmaz, A., Yeşilöz, H., Demircioğlu, A., 2009. Kapadokya Bölgesinde *Simulium* spp. (Diptera: Simuliidae) Mücadelesi. IX. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi Özet Kitabı, 7-10 Ekim, Sayfa 127.
- Yılmaz, A., Yeşilöz, H., Demircioğlu, A., 2009. Kapadokya Bölgesinde *Simulium* spp (Diptera: Simuliidae) Salgınının Değerlendirilmesi. IX. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi Özet Kitabı, 7-10 Ekim, S.126.
- Yılmaz, A., Demircioğlu, A., Yeşilöz, H., 2010. Kapadokya Bölgesinde *Simulium* spp (Diptera: Simuliidae) Salgınının Bölge Turizmine Etkileri. I. Disiplinlerarası Turizm Araştırmaları Kongresi Bildiri Kitabı, 27-30 Mayıs, s.13-22, Nevşehir.
- Erdurmuş, G., Demiröz, D., Yılmaz, A., 2017. Ecotoxicological Criteria Used in the Regulation Of Pesticides. XIII. Congress of Ecology and Environment with International Participation. 12-15 September, Edirne/ Turkey.
- Kaymak, S., Özdem A., Karahan, A., Özercan, B., Aksu, P., Aydar, A., Kodan, M., Yılmaz, A., Başaran, M. S., Asav, Ü., Erdoğan, P., Güler, Y., 2015. Ülkemizde Ziraî Mücadele Girdilerinin Değerlendirilmesi. Kitap, ISBN Numarası: 978-605-9175-33-3, 83 S.
- Başaran, M. S., Özkan, M., Gözüaık, C., Duman, M., Mutlu, ., Ölmez F., Aksoy, E., Kepenekçi, İ., Akbaş, B., Babaroğlu, E. N., Velioğlu, S., Yıldırım, A F., Kodan, M., Güllü, M., Kaya, E., Karaca, V., Yılmaz, E., Akın, K., Arslan, Z.F., Tülek, A., Yılmaz, A., Aydar, A., Erdoğan, C., 2011. Buğday Entegre Mücadele Teknik Talimatı. Teknik talimat, TAGEM yayını 142 sayfa.
- Yılmaz, A., 2017. Diğerk halk sağığı zararlıları. Belediyeler İçin Biyosidal Ürün Uygulamaları Rehberi, Sağıık Bakanlığı Yayın No: 1060, ISBN: 978-975-590-632-4, 1.Baskı S.41.
- Yılmaz, A., 2017. Kemirgenler ve mücadele teknikleri. Belediyeler İçin Biyosidal Ürün Uygulamaları Rehberi, Sağıık Bakanlığı Yayın No: 1060, ISBN: 978-975-590-632-4, 1.Baskı S.41.