

T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

FOSFİNE DİRENÇLİ VE HASSAS *Sitophilus granarius*
POPÜLASYONLARINDA ENDOSİMBİYONT BAKTERİLERİN
DURUMU

Berna AKTAŞ

Danışman
Prof. Dr. Erhan KOÇAK

ISPARTA - 2022



© 2022 [Berna AKTAŞ]

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Materyal	16
3.2. İzolasyona Hazırlık ve DNA İzolasyon Aşaması.....	16
3.3. Kademeli Sıcaklık Düşürme PCR (Touchdown PCR Protokolü).....	18
3.4. Jel Elektroforezi Protokolü	20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	22
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	30
KAYNAKLAR	31
ÖZGEÇMİŞ	40

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FOSFİNE DİRENÇLİ VE HASSAS *Sitophilus granarius* POPÜLASYONLARINDA ENDOSİMBİYONT BAKTERİLERİN DURUMU

Berna AKTAŞ

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Erhan KOÇAK

Buğday dünyada yetiştiriciliği yapılan en önemli bitkilerden birisidir. Buğday’da hasat sonrası en büyük sorun ise depo zararlılarının varlığıdır. Bu zararlılara karşı fosfin gazı uygulanmaktadır. Ancak birçok pestisite olduğu gibi bu bileşiğe karşı da depolanmış ürün zararlıları direnç geliştirmektedir. Böceklerin pestisitlere karşı direnç geliştirmesinde endosimbiont bakterilerin rolü olduğuna yönelik çalışmalar vardır. Bu çalışmada Türkiye’nin dört farklı bölgesini temsilen beş ilden sekiz popülasyonda fosfine dirençli ve hassas buğday biti *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) bireylerinde endosimbiont bakterilerden *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* varlığı incelenmiştir. Bunun için bireylerin DNA izolasyonu, Touchdown PCR ve agaroz jel elektroforezi yapılarak bulaşıklık oranları belirlenmiştir. Fosfine dirençli ve hassas popülasyonlardaki bulaşıklık oranları *Wolbachia* için sırasıyla ortalama %49.75 ve %87.25, *Rickettsia* için sırasıyla ortalama %45.65 ve %37.50 ve *Spiroplasma* için sırasıyla ortalama %49.80 ve %28.50 olarak bulunmuştur. Popülasyonların üçünde ikişer endosimbiont diğer beşinde ise tüm endosimbiontlar belirlenmiştir. Ayrıca hassas popülasyonlarda çoklu enfeksiyon durumları W+R, W+S, W+R+S için %33, %25, %12 ve R+S için bulunamamıştır. Dirençli popülasyonlarda çoklu enfeksiyon W+S, W+R+S; %12, %4 olarak bulunmuş ve W+R, S+R çoklu enfeksiyonuna rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Sitophilus granarius*, *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*, Fosfin direnci

2022, 40 sayfa

ABSTRACT

Master's Thesis

ENDOSYMBIONT BACTERIA STATUS IN PHOSPHINE RESISTANT AND SUSCEPTIBLE POPULATIONS of *Sitophilus granarius*

Berna AKTAŞ

Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Erhan KOÇAK

Wheat is the one of the most important cultivated plants in the world. The biggest problem after harvest is the stored product pests. Against the pests, phosphine was applied. But, the pests can develop resistance against phosphine. There are some studies about the role of endosymbiont bacteria in developing resistance to pesticides. In this study, the presence of endosymbiont bacteria *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Spiroplasma* were investigated on phosphine-resistant and susceptible granary weevil *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) populations at eight populations from five provinces of four regions in Türkiye. For that, DNA isolation, Touchdown PCR, and agarose gel electrophoresis were carried out and, infection rates were determined. The infection rates in susceptible and resistant populations were determined respectively for *Wolbachia* 49.75% and 87.25%, *Rickettsia* 45.65% and 37.50% and, *Spiroplasma* 49.80% ve 28.50%. Two endosymbionts were determined in three of the populations and all endosymbionts were determined in the other five populations. In addition, multiple infections in susceptible populations were not found for 33%, 25%, 12% for W+R, W+S, W+R+S and R+S. Multiple infections in resistant populations W+S, W+R+S; It was found to be 12%, 4% and W+R, S+R multiple infections were not found.

Key Words: *Sitophilus granarius*, *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*, Phosphine resistance

2022, 40 pages

TEŞEKKÜR

Tezimin yürütülmesinde desteğini ve emeğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Erhan KOÇAK'a, desteklerinden dolayı sayın Öğr. Gör. Murat MUTLUCAN'a ve meslektaşım Taşkın Ahmet SÖNMEZ'e, laboratuvarında çalıştığım sürede yardımcı olan değerli yüksek lisans arkadaşlarım; Merve KAVAK'a, Nurperi YAMAKLAR'a ve Zülal TAT'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında varlıklarını hissettirip beni yalnız bırakmayan, beni cesaretlendiren başta annem olmak üzere AKTAŞ ailesine sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Berna AKTAŞ
ISPARTA, 2022



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. <i>Sitophilus granarius</i> 'un farklı dönemlerdeki görünümü pupa (a), larva (b), ergin (c).....	2
Şekil 1.2. <i>Sitophilus granarius</i> 'un buğdayda neden olduğu zarar	3
Şekil 3.1. Touchdown PCR ön hazırlık aşaması	19
Şekil 3.2. Elektroforez aşamaları (a) Kullanıma hazır elektroforez tankı (b).Elektroforezi jel hazırlama (c) Elektroforez sonucu bant görünümü...	21

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>Sitophilus granarius</i> popülasyonları	16
Çizelge 3.2. <i>Wolbachia</i> , <i>Rickettsia</i> ve <i>Spiroplasma</i> 'nın primer bilgileri.....	18
Çizelge 3.3. PCR öncesi örneklerin hazırlığı	19
Çizelge 3.4. Touchdown PCR analizi için cihaz programı	20
Çizelge 4.1. Buğday bitinin fosfine hassas ve dirençli popülasyonlarında endosimbiyontların bulunma durumları (%).....	22
Çizelge 4.2. Buğday bitinin fosfine hassas ve dirençli popülasyonlarında endosimbiyontların bulunduğu toplam birey sayısı ve çoklu enfeksiyon durumları	26



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Akb	Atomik kütle birimi
Atm	Atmosfer basıncı
Bp	Nükleik asit uzunluğu
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CI	Sitoplazmik Uyumsuzluk
CK	Sitokinin Seviyesi
CTAB	Cetyltrimethlyammonium Bromide
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
G	Gama
HGT	Gen Transferi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Saflık birimi, Kalite)
mA	Miliamper
MCL	Maksimum Bileşik Olabilirlik
MK	Erkek Öldürme
MLST	Çok Odaklı Dizi Tipleme
mM	Milimolar
MtDNA	Mitokondriyal Genom
ml	Mililitre
Ne	Popülasyon boyutu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDE	Filogenetik Mesafe Etkisi
pH	Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi
RNA	Ribo Nükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
Tm	Primer annealing sıcaklığı
UV	Ultraviyole
wsp	<i>Wolbachia</i> yüzey proteini
xg	Santrifüj cihazında hız birimi
ul	Mikrolitre
um	Mikromolar
%	Yüzde

1. GİRİŞ

Hızla artan dünya nüfusuna bağlı olarak besin ihtiyacı gün geçtikçe artış göstermektedir. Artan dünya nüfusunun yeterli ve dengeli beslenme ihtiyacı kuraklık, sel ve sıcak hava dalgaları gibi ekolojik sebeplerden dolayı zamanla karşılanamayacak duruma gelmiştir. Nüfus artışına rağmen ekilebilir arazi miktarı her geçen gün azalmaktadır. Artan besin ihtiyacının karşılanabilmesi için birim alandan alınan ürün miktarının en üst düzeye çıkarılması gerekmektedir.

Dünyadaki durum 2021/22 yıllık raporlarına göre toplam tahıl (buğday ve iri taneli tahıllar) üretiminin 2.290 milyon ton olarak verilmiştir (Anonim, 2022a). Toplam tahıl üretimi önceki yıla göre artış göstermiştir ve uzmanların 2023 yılı için artış göstereceği yönde tahminler mevcuttur. Türkiye’de ise toplam 37 milyon hektar tarım alanında tarla tarımına ayrılan alanın %57.37’sinde hububat üretimi yapılmakta ve bu alandaki üretim yaklaşık 33 milyon tona ulaşmaktadır. Üretimin yaklaşık %59.75’i buğday ve %17.03’ü mısırdan oluşmaktadır. Toplam 33 milyon tonluk hububat üretiminin %48.25’inin insan tüketiminde değerlendirildiği ve bu tüketimin yaklaşık %91.11’ini buğday ve %7.38’ini de mısır oluşturmaktadır (Anonim, 2018). Türkiye’de ekilen hububat alanı ve üretim miktarı birlikte değerlendirildiğinde, tarım sektörü içerisinde hububatın vazgeçilmez bir öneme sahip olduğu görülmektedir.

Buğdaygiller (Poaceae=Gramineae) familyasına ait sadece taneleri için yetiştirilen buğday, arpa, yulaf, çavdar, mısır, çeltik, kacadarı, kumdarı, cindarı ve kuşyemi cinslerini kapsayan bitki grubu “tahıl” olarak isimlendirilmektedir. Tahıllar tüm dünyada olduğu gibi yurdumuzda da kültür bitkileri arasında ekim, üretim ve kullanım çeşitliliği açısından en önemli bitki grubunu oluşturmaktadır. Özellikle insan ve hayvan beslenmesindeki önemleri ve endüstriye ham madde sağlama gibi özellikleri göz önüne alındığında tahıllar stratejik öneme sahip, olmazsa olmaz bir ürün grubudur. Ancak ülkemizde ve dünyada depolanan ürünlerde zarara ve büyük kayıplara yol açan birçok depo zararlısı böcek bulunmaktadır. Genellikle depolanmış ürünlerde hayvansal kökenli organizmalar önemli oranlarda ürün kayıpları meydana getirmektedir. Dünya üzerinde genel olarak depolanmış hububatlardaki böcek zararı, modern depolama tekniklerinin kullanılmadığı ülkelerde %10-40 civarında olmaktadır (Özer, 1957). Ülkemizde iklim özellikleri ve üretim çeşitliliği nedeniyle çok sayıda

depolanmış ürün zararlısının üreyip gelişebilmesine olanak sağlamaktadır. Zararlılar, depolanmış ürünlerde ağırlık kayıplarına, tohumluk özelliğinin düşmesine, delik ve unlaşma yaparak kalite ve besin değerlerinde olumsuz değişimlere yol açarak ticari değerinin düşmesine neden olmaktadır (Boxall, 2001). Bu zararlılar içerisinde *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) depo zararlıları olarak tüm dünyada önemli bir yere sahiptirler.

Buğday Biti [*Sitophilus granarius* (L.) 1758], dünyanın her yerinde bulunan depolanmış ürünler olan buğday başta olmak üzere çavdar, arpa ve mısırdaki da önemli bir zararlıdır. Erginleri baklagil tohumları, un, kepek gibi ürünlerde görülebilir ancak bunlarda çoğalamazlar. Erginler yaklaşık 3-5 mm boyunda, genç dönemde açık kahverengi, daha sonra koyu kahverengidir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *Sitophilus granarius* 'un farklı dönemlerdeki görünümü pupa (a), larva (b), ergin (c) (Anonim, 2022b)

Baş hortumunun ucunda ağız parçaları, hortum dibinde ise dirsekli antenleri bulunur. Erginlerin ikinci çift kanatları işlevini yitirmiştir bu nedenle uçamazlar ve sadece depolarda zararlı olabilirler. Larvalar beyaz renkte, açık kahverengi baş kapsüllerine sahiptirler. Bacaksız larva tipindedirler. Olgun larva boyu 3–3.5 mm'dir. Yumurtalar ise 0.7 mm uzunluğunda ve dane içerisinde. *S. granarius*' un erginleri dışındaki yumurta, larva ve pupa biyolojik dönemleri danenin içerisinde gerçekleşir (Rees, 2004). Ergin dişi tahıl danesi içerisine bir delik açar, bu deliğe yumurta bıraktıktan sonra özel bir salgı yardımıyla kapatır. Yumurtalar oda sıcaklığında yaklaşık bir haftada açılır ve larvalar dane içerisinde beslenmeye başlar. Larva dönemi depo koşullarına bağlı olarak 2-3 haftadır. Larva gibi pupada dane içerisinde. Pupaların açılmasıyla birlikte çıkan yeni nesil erginler daneler üzerinde beslenmelerine devam ederler. Erginler soğuğa karşı oldukça dayanıklıdır. 5°C altında hareketsiz kalırlar ve -15°C'e kadar soğuğa dayanabilirler. 5°C sıcaklıktan itibaren aktif olurlar ve 12°C den sonra üreyebilirler (Sinha ve Watters, 1985). Depolanmış tahıllar önemli kayıplara neden olan primer bir zararlıdır. Erginler danelerde beslenerek zararlı olurlar ancak asıl zarar dane içerisinde beslenen larvalar tarafından meydana getirilmektedir. Ürünlerin protein ve karbonhidrat değerlerini unlaşma yaparak düşürdükleri gibi danelerin çimlenme yeteneğine engel olurlar (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. *Sitophilus granarius*'un buğdayda neden olduğu zarar

Bunun yanında üretilen ürünün tüketilene kadar uygun şekilde korunup saklanabilmesi önemlidir. Ürünün hasat sonrası muhafazası, tarımsal üretimde en önemli ihtiyaçtır.

Ülkemizde 1950’li yıllardan bu yana yoğun olarak kullanılmakta olan fosfin gazının, alüminyum ve magnezyum fosfit içerikli metalik ve CO₂ ile karışım halinde bulunan formülasyonları ruhsatlı ve aktif kullanımdadır. Fosfin, düşük maliyetli olması, havada hızlı yayılması ve düşük kalıntı bırakması sebebiyle tercih edilmektedir (Champ ve Dyte, 1976).

Sitophilus türleriyle ilgili Bangladeş (Tyler vd., 1983), Hindistan (Rajendran, 1992), Pakistan (Ahmedani, 2009), Çin (Zeng, 1999; Nayak vd., 2003), Avustralya (Collins, 1998; Daglish vd., 2002), Filipinler (Acda, 2000), Brezilya (Ansell vd., 1990), Polonya (Ignatowicz, 1999) ve Fas (Benhalima vd., 2004) gibi ülkelerde de fosfine karşı yüksek düzeyde direnç geliştiği, gaz geçirgenliğinin az olduğu yerlerde tekrar eden fümigasyon uygulamaları da depolanmış ürün zararlısı böceklerde çok daha hızlı fosfin direncinin meydana geldiği tespit edilmiştir. Almanya’da yapılan bir çalışmada bir bölgede *S. granarius*’ta fosfin direncini belirleyerek donrasında fosfin dozunu artırarak popülasyonu kontrol altına almışlardır (Reichmuth vd., 2007). Direnç varlığına dayalı olarak iki direnç seviyesi olarak, dirençli (Collins, 1998) ve zayıf dirençler ise hassas olarak değerlendirilir. Zararlı böcekler, çeşitli mikroplarla simbiyotik ilişki geliştirmiştir ve bu onların fizyolojilerini ve ekolojilerini önemli ölçüde değiştirebilir (Douglas, 2015). İkincil endosimbiyontlar belirli bir yere lokalize değildir, aksine konakçı böcek boyunca bulunurlar. Bu endosimbiyontlar hayatta kalmak için gerekli olmasa da üreme, gelişme ve viral bulaşma gibi farklı metabolik süreçlerde önemli rol oynarlar. Ortak ve yaygın endosimbiyont *Wolbachia* grubu, birkaç eklembacaklının üreme dokularında gözlemlenmiştir.

Wolbachia, eklembacaklılarda üreme manipülasyonunda rol oynar (Werren, 1997), *Cardinium* ise sitoplazmik uyumsuzluk, partenogenez ve feminizasyonda rol alır (Zchori-Fein ve Perlman, 2004).

Rickettsia popülasyonu insektisitlere karşı duyarlılık ve konukçu için zararlı hale gelir (Kontsedalov vd., 2008). *Hamiltonella*, beslenme gereksinimlerini karşılamak için ev sahibine bağlı olan konukçuya bağımlı metabolik bir endosimbiyonttur. *Arsenophonus filumunun* γ - Proteobacteria grubuna aittir ve Proteobacteria'nın birçok eklembacıklıda virüsün bulaşmasında rol oynadığı bildirilmektedir. *Wolbachia* gibi, *Cardinium*'un da sitoplazmik uyumsuzluklara neden olduğu bildirilmiştir (Weeks vd., 2001). İnsektisit/fümigant direnci ile ilişkilendirilen endosimbiyontların daha iyi anlaşılması, sadece böcek mikrobiyal simbiyozunun evrimi ve işlevi hakkında bilgi sağlamanın yanı sıra dirence katkıda bulunan organizmaları hedefleyerek, etkili yönetim stratejisinin geliştirilmesine de yol açabilecektir. Bu nedenle, depolanmış tahıl böcek zararlılarının dirençli ve duyarlı popülasyonundaki endosimbiyontların tanımlanması, fosfin direnci için yönetim stratejileri geliştirilmesi için çok önemlidir. Bizimde bu çalışmayı yapmaktaki amacımız, önemli bir depo zararlısı olan *Sitophilus granarius* fosfin direncine hassas ve dirençli popülasyonlarında endosimbiyontların varlığını belirlemeye, endosimbiyontların bulunma durumlarına göre şehirler/bölgeler arası popülasyonları karşılaştırıp, ikili üçlü enfeksiyon durumları varsa gözlemlemeye ve endosimbiyontların fosfin direnci oluşturmadaki rolünü açıklamaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Simbiyozis ilk olarak 1877 yılında Albert Frank tarafından “iki farklı türden birinin diğesinde bulunması veya içinde yaşaması” olarak tanımlanmış, daha sonra 1879’da Anten de Bary simbiyozu “farklı iki organizmanın birlikte yaşaması” şeklinde tanımlayarak, literatüre girmesini sağlamıştır (Sapp, 1994). Simbiyotik yaşam çok hücreli birçok canlıda görülen ortak yaşam şeklidir. Böcek türlerinin yaklaşık %10-20’si canlılığını sürdürmek ve üreyebilmek için obligat bakterilere bağımlıdır. Böcek mikrobiyal florasının en önemli üyelerini bakteriler oluşturmakta ve bu mikroorganizmalar böcekler için uygun gıda oluşturmak, besin sindirimine yardımcı olmak, faydalı enzimler üretmek, vitaminler sentezlemek, azot bağlamak, feromonlar üretmek ve böcek patojenleri ile rekabet etmek suretiyle böceklerin yaşamına önemli katkılar sağlarlar. Ancak bütün bu yararlı etkilerine rağmen böcekleri öldüren, hastalandıran, pasif hale getiren ve kontrol eden bakteriler de bulunmaktadır (Stouthamer vd., 1999). Son yıllarda böcek vücudunun mikroflorası, özellikle de bağırsak mikroflorası üzerinde yapılan araştırmalar artmıştır. Bunun temelde iki sebebi olduğu görülmektedir. Bu mikrofloranın böcek patojeni olanları zararlı böceklerin biyolojik kontrolünde kullanılabilir (Dillon vd., 1997). Endosimbiyont başka bir canlının vücudunda veya hücrelerinde mutualistik bir ilişkiyle yaşayan canlılara verilen genel isimdir.

Simbiyotik bakteriler dikey (vertikal) transfer ile anneden yavrulara aktarılabildiği gibi, yatay (horizontal) transfer yoluyla da bireyler arasında veya farklı sınıflar arasında aktarılabilir (Matalon vd., 2007; Saridaki vd., 2010). Simbiyotik bakterilerin en önemli özellikleri, konakçı üreme sistemi ve davranışı üzerindeki manipülasyonlar ile konağın cinsiyet belirleme sürecine etki etmeleridir. Bu etki sonucunda popülasyon cinsiyet oranında değişikliğe, genetik popülasyon yapısına, üreme izolasyonuna, cinsel özelliklerin gelişimine ve hatta türleşmeye neden olmaktadır (Cordaux, 2011; Penz vd., 2012). Üreme sistemi ve davranışı üzerinde etkili olan simbiyotik bakteriler özellikle popülasyon cinsiyet oranındaki etkileri nedeni ile popülasyon kontrol altına alınabilmekte ve zararlılarla mücadele için kullanılabilmektedir. Söz konusu bakteriler konukçularının üreme davranışına temel olarak dört şekilde etki etmektedir.

Bunlar; sitoplazmik uyumsuzluk, feminizasyonu teşvik, partenogenezisi teşvik, erkek öldürücülüktür (O'Neill vd., 1992). Sitoplazmik uyumsuzluk temelde bakterilerin etkisi ile sperm ve yumurta arasındaki uyumsuzluk sonucu ortaya çıkan durum olarak tanımlanmaktadır. Bu etki bazı böcek türlerinde hücre içi simbiyont ya da parazit olarak bulunan bazı bakteriler nedeniyle gamet hücrelerindeki değişiklikten kaynaklanmaktadır. Sitoplazmik uyumsuzluk, bu etkiye sahip bakterilerce, enfekteli bir erkek ile enfektesiz bir dişinin çiftleşmesi durumunda ortaya çıkmaktadır. Ancak bunun tersi bir durumda, yani enfekteli erkek ile enfekteli bir dişinin çiftleşmesi durumunda sitoplazmik uyumsuzluk etkisi gerçekleşmemektedir. Aynı şekilde enfektesiz bir erkek ile enfekteli bir dişi çiftleştiğinde de bu etki görülmemektedir (Werren vd., 1998; Bourtzis vd., 2003; Markov vd., 2005).

Endosimbiyotik bakterilerin etkisiyle ortaya çıkan ve embriyonik dönemde cinsiyet belirlenme aşamasında genetik erkeklerin fonksiyonel fenotipik dişilere dönüşmesiyle sonuçlanan durum ise feminizasyonu teşvik olarak adlandırılır. Genelde anneden kalıtılan simbiyotik bakterilerin etkisi ile ortaya çıkan bu durum Isopod ve Lepidoptera'da tespit edilmiştir (Rousset vd., 1992; Kageyama vd., 1998; Kageyama vd., 2002). Temelinde ise sitoplazma yoluyla kalıtılan bu bakterilerin cinsiyet belirleme sürecine etki etmeleri ve/veya bunlar tarafından üretilen erkeklik hormonu üretimini engellemeleri bulunmaktadır (Kageyama vd., 2002). Artropodlarda genel olarak dişilerin çiftleşmeden yumurta vermesi ve bu yumurtalardan çıkan bireylerin dişi olması partenogenezis olarak adlandırılır. Partenogenezis doğal ya da maternal olarak kalıtılan bakteriyel bir enfeksiyon sonucu da ortaya çıkabilir. Burada döllenmemiş yumurtalardan ise haploid erkek bireyler gelişir. Benzer şekilde üreme paraziti olan bir bakteri de cinsiyet belirleme sürecine etki ederek döllenmemiş yumurtalardan dişilerin gelişimini sağlar. Söz konusu durum embriyonik süreçte mayozun tamamen baskılanması ile gerçekleşebildiği gibi mayoz sonrasındaki bir etki ile de gerçekleşebilir Sitoplazma yoluyla kalıtılan ve partenogenezisi teşvik eden bakteriler Thysanoptera ve Hymenoptera gibi böcek takımlarında ve akarlarda tespit edilmiştir (Zchori-Fein vd., 1995; Charlat vd., 2003; Markov vd., 2005; Ioannidis vd., 2007).

Primer simbiyontlar (P-simbiyont); bakteriom olarak tanımlanan bir yapı içerisinde bulunurlar (Buchner, 1965; Baumann, 2005).

Bakteriom ise bakteriosit adı verilen özelleşmiş hücrelerden oluşur. P-simbiyontlar obligat mutualist olup diğer bir ifadeyle konukçusunun gelişmesi için elzemdir. Yapılan filogenetik analizler P-simbiyontlar ile konukçusunun son derece uyumlu olduğunu göstermiştir (Moran vd., 1994). Uzun yıllar süren bu birliktelik P-simbiyontların genomlarında birtakım değişikliklere yol açmıştır. Primer simbiyotik ilişkide; böcekler simbiyontları elimine etmek yerine onlarla birlikte yaşamaya adapte olmuşlardır. Böceklerin morfoloji, davranış ve fizyolojilerini kapsayan adaptasyonları onların belirli konukçu bitkiye özelleşmelerini sağlamıştır. Böcek simbiyontlarından kaynaklanan konukçu özelleşmesi bitkilerin besin yelpazesinde farklılığa bağlı olabilir çünkü primer simbiyontların asıl rolü özellikle aminoasit ve vitaminler gibi temel besin maddelerini tedarik etmek ve sentezlemektir (Moran ve Baumann, 2000). Bu sayede böceğin besin olarak uygun olmayan bir konukçudan ziyade uygun bir bitki üzerinde gelişmesini ve üremesini mümkün kılar. Sekonder simbiyontlar (S-simbiyont); obligat simbiyontların aksine konukçusunun hayatını devam ettirmesi için gerekli değildir. Sekonder simbiyotik ilişki fakültatif bir ilişki olup konukçu açısından faydalı ya da zararlı olabilir (Buchner, 1965; Baumann, 2005; Harris vd., 2010).

Wolbachia gibi böcek simbiyontları günümüzde dört kategoriye ayrılmaktadırlar. Birinci grup simbiyontlar konukçusuna amino asit ve vitamin sağlamaktadırlar. İkinci grup konukçusunu sıcaklık stresi, parazitoit arı ve patojenlere karşı dayanıklı hale getirirler. Üçüncü grup üreme özellikleri üzerine etki ederek partenogenesis, dişileştirme, erkekleri öldürme ve sitoplazmik uyumsuzluk (bir çeşit erkek kısırlaştırma) yönünde etkilemektedirler. Dördüncü olarak ise pestisitler ve bitkileri koruyucu ksenobiyotikler detoksifiye ederler (Anonim, 2014). *Wolbachia*'nın böcekler ve diğer eklembacaklılar üzerine etkileri konusunda günümüz bilgilerine moleküler çalışmalar büyük katkı sağlamıştır.

S-simbiyontlar konukçu vücudunda dağınık olarak ya da spesifik dokulara özelleşmiş halde bulunabilirler (Brumin vd., 2012). Bu simbiyontlar deneysel olarak enfekte olmamış konukçulara aktarılarak bu konukçulara yerleşmeleri sağlanabilir. S-simbiyontlar genellikle maternaldir yani anneden yavruya aktarılırlar. Bu özellikleri simbiyotik bakterilerin böceklerle mücadelede kullanılmasını kolaylaştırır (Güz vd., 2015).

Çalışma kapsamında incelediğimiz bakteriler (*Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma*) sekonder simbiyont özelliği göstermektedirler (Fukatsu vd., 2001; Valero vd., 2004). Sekonder simbiyontlar ise salgıladıkları toksinle parazitoit larvasını öldürerek konukçusunun yaşamasına ve üremesine olanak verir (Gosalbes vd., 2010). Ayrıca sekonder endosimbiyont olan *Rickettsia*'nın konukçusunun sıcaklık toleransını arttırdığı belirlenmiştir (Brumin vd., 2011). Simbiyontların detoksifikasyon yetenekleri ve hızlı evrim süreçleri göz önüne alındığında konukçularında oluşan pestisit direncine katkı sağladıkları düşünülmektedir (Su vd., 2013). İnsektisitlere direnç geliştirme mekanizmaları arasında zararlı böceklerin genomlarındaki değişimler, ilacın hedef yeri değişikliği, ilacı parçalayan enzimlerin regülasyonunun artması sayılabilirken son yıllarda bunlara simbiyontlarda eklenmiştir. Endosimbiyontların konukçu fizyolojisindeki etkisi pek çok çalışmada vurgulanmıştır. Bu mikroorganizmaların önemi; konukçu beslenmesinden savunma reaksiyonlarına, direnç mekanizmasından üreme değişimlerine kadar geniş kapsamlıdır. Özellikle tarımsal ürünlerde zararlı olan böceklerin endosimbiyontlar ile kurdukları ilişkinin tam olarak aydınlatılması büyük önem arz etmektedir. Çünkü zararlılar ile mücadelede yeni, çevreye duyarlı ve daha etkili yöntemler gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda aynı tür böceğin farklı bölge ve/veya ülke popülasyonlarında, endosimbiyont kompozisyonu farklılaşmaktadır. Depolanmış ürün zararlısı türler ile yapılan, endosimbiyotik bakteri analizleri incelendiğinde ise yaygın olarak *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* tanısı yapılmıştır (Gündüz ve Douglas, 2009). Böceklerde oldukça yaygın olan simbiyotik bakteriler konukçularında çok değişik etkiler göstermektedir. Evrimsel sürece bağlı olarak konukçu simbiyont ilişkileri obligat ya da fakültatif olabilmektedir (Güz vd., 2015).

Son yıllarda simbiyotik ilişkiler genellikle insan ve hayvan patojenlerinin hastalık yapma yeteneği üzerine odaklanmışken, son yapılan çalışmalar böcek endosimbiyontlarını karakterize etme ve bu yakın ilişkiyi tanımlama üzerine odaklanmıştır (Dale ve Moran, 2006). Endosimbiyontların protein salgılama mekanizmaları da dahil olmak üzere böceklerdeki etkileri gelişen moleküler biyoloji ve fonksiyonel genomik çalışmaları ile daha iyi anlaşılacaktır.

Wolbachia; farklı mekanizmalarla eklembacaklılar arasında cinsiyet belirlenmesi ve evrimi etkili bir ajan türü olarak düşünülmektedir. Aynı zamanda araştırmacılar iki

alandaki *Wolbachia*'nın farklı ırklarının rolü konusunda ilgilenmeye başlamışlar. Bunlardan birincisi; genetik yapıyı değiştirici olarak veya parazitoitlerin verimliliğini artırıcı olarak biyolojik mücadelede kullanılmasıdır (Stouthamer, 1993; Sinikin vd., 1997). İkincisi; *Wolbachia* filarial hastalıklarının patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, filarial solucanlardaki *Wolbachia* yoğunluğunu azaltmaya yönelik uygulamalarda yararlı olabilir (Beard vd., 1993; Bandi vd., 2001).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada Ege, İç Anadolu, Karadeniz, Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz bölgelerinden toplam 12 lokasyondan *S. oryzae* örnekleri kullanılarak moleküler tekniklerle elde edilen jel görüntülerine göre, taranan örneklerde %98.33 *Wolbachia* tespit edilmiştir. Şanlıurfa ve Adana'da %90 oranında *Wolbachia* varlığı saptanmış, Manisa, İzmir, Ankara, Diyarbakır, Samsun, Konya ve Adana illerinden elde edilen diğer 10 popülasyonda ise *Wolbachia* varlığı %100 oranında tespit edilmiştir (Türkmen ve Koçak, 2019). Yine bir çalışmada, Adana, Diyarbakır, Konya, Manisa ve İzmir illerinden toplanan *S. oryzae* popülasyonlarında endosimbiont mikroorganizmalardan *Wolbachia*, altı popülasyonun dördünde saptanmış ve enfeksiyon oranının %22.2 olduğu belirlenmiştir (Koçak ve Yaman, 2019).

Başka bir çalışmada, Kırşehir ilindeki tahıl ambarlarından alınan *Sitophilus granarius*, *S. oryzae* ve *S. zeamais* için endosimbiontlardan *Arsenophous*, *Cardinium*, *Fritschea* ve *Hamiltonella*'nın varlığı tespit edilmiş ama çoklu enfeksiyona rastlanılmamıştır. Ancak *Spiroplasma* ve *Wolbachia* varlığının türe özgü olmadığı görülmüştür. Örneklenen tüm kınkanatlı bireylerin %20'sinin *Wolbachia* enfekteli olduğu görülmüştür (İpekdağ ve Kaya, 2020).

Rickettsia; daha çok sineklerin konukçusu olmakla birlikte birçok farklı konukçu değiştirme özelliğine sahiptir. Örneğin bir çalışmada enfekteli bir böceğin beslenmesi sırasında 22 *Rickettsia*'nin bitkiye transfer olduğu ve floem içinde hareket edip aynı bitkiden beslenen başka bir böceğe aktarıldığı gözlemlenmiştir (Flüger vd., 2012). Nitekim son yıllarda yapılan çalışmalar çok farklı böcek türlerine konukçu olduğunu doğrulamaktadır. *Cicadella viridis* ile yürütülen bir 16S rRNA çalışmasında *Rickettsia* enfeksiyonu böceğin tüm gelişim evrelerinde belirlenmiştir. Ayrıca böceklerin bakteriomları, yumurtalıkları, testisleri ve tükürük bezlerinde lokalize olduklarını belirlemişlerdir. Daha sonra enfeksiyonlu böcekleri iki gruba ayıp, gruplardan birine

antibiyotik uygulayarak yeniden analize tabii tutmuşlardır. Antibiyotik ile muamele edilen böceklerde *Rickettsia* enfeksiyonunun önemli düzeyde düştüğünü bildirmişlerdir (Lian vd., 2016). Domates sarı yaprak kıvrılma virüsü (TYLCV) *B. tabaci* vektör böceği ile taşınan önemli bir virüs hastalığıdır. Araştırmacılar *Rickettsia* ile enfekte olmuş *B. tabaci* örneklerini ve aynı genetik geçmişe sahip ve enfekte olmayan *B. tabaci* örnekleri ile karşılaştırdıklarında enfekteli böceklerin virüsü daha uzun süre barındırdığını ayrıca TYLCV iletiminin iki kat arttığını belirlemişlerdir (Kliot vd., 2014).

Ülkemizde yaygın olarak bulunan ikincil zararlılardan Küçük Kıрма Biti *Cryptolestes ferrugineus*'de endosimbiont varlığının araştırmak için Adana, Konya, İzmir, Samsun ve İstanbul illerindeki hububat depolarından 10 adet *C. ferrugineus* popülasyonu toplanmıştır. Türkiye genelinde 10 popülasyondan altısında *Rickettsia* bir endosimbiontla enfekteli olduğu görülmüştür. Bu çalışma *C. ferrugineus*'un *Rickettsia* ile enfekteli olduğunu gösteren dünyadaki ilk çalışma özelliğini taşımaktadır (Koçak ve Ünal, 2019).

Adana, Diyarbakır, Konya, Manisa ve İzmir illerinden *S. oryzae* popülasyonlarında endosimbiont mikroorganizmalardan *Rickettsia* varlıkları incelenmiştir. Altı popülasyonun beşinde enfeksiyon yüzdesinin %55.5 olduğu belirlenmiştir (Koçak ve Yaman, 2019).

Türkiye'nin Kırşehir ilindeki tahıl ambarlarında zararlı 10 coleopter türünden sadece *S. granarius* popülasyonlarında *Rickettsia* varlığı saptanmıştır (İpekdağ ve Kaya, 2020).

Spiroplasma; hücre duvarı bulunmayan gram pozitif ve spiral şeklinde bakterilerdir. Genel olarak bitkiler ve böceklerde hastalık etkeni olan *Spiroplasma*'nın farklı grupları bulunmaktadır. Konakçısının evrimsel sürecine etki etmesi, beslenmesine pozitif yönde katkı sağlaması ve aynı anabolik yolları kullanması *Spiroplasma*'nın bazı özelliklerindendir. *Spiroplasma*'nın diğer bir özelliği ise, eklembacaklılarda yumurta ile bir dölden diğerine geçerler ve erkek bireyleri öldürerek popülasyonu dişileştirmeleridir (Werren vd., 1998).

Adana, Diyarbakır, Konya, Manisa ve İzmir illerinden *S. oryzae* popülasyonlarında endosimbiont mikroorganizmalardan, *Spiroplasma* varlıkları incelenmiştir. *Spiroplasma* altı popülasyondan üçünde saptanmış ve enfeksiyon yüzdesi %8.3 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın önemi, *Spiroplasma*'nın ilk kez *S. oryzae*'da varlığının tespit edilmiş olmasıdır (Koçak ve Yaman, 2019).

Fumigasyon; gaz halindeki ilaçlara genel olarak “fümigant”, gaz ilaçlarla yapılan ilaçlama işlemine ise “Fumigasyon” denilmektedir. Fumigasyon, depolanmış haldeki tarım ürünlerinin zararlı mikroorganizmalardan ve ambar zararlılarından korunması için depolanmış ürün üzerine kimyasal yöntemlere başvurulmaktadır. Fumigasyonda kullanılan kimyasal madde fumigant olarak adlandırılır. Fumigantlar doğrudan gaz halinde olduğu gibi, üzerlerine uygulanan basınç azaldığında gaz haline geçebilen sıvı veya katı halde de bulunabilirler. Fümigant, gaz halinde depolanmış ürünün her tarafına difüzyon yoluyla girerek etki etmektedir. Fümigasyon, diğer fiziksel yöntemlerin aksine ürünün hareket ettirilmesine gerek kalmadan silo, ambar, gemi, vagon ve konteyner gibi kapalı alanlar içerisinde yığın halinde, çuvallanmış, sandıklanmış vb. haldeki ürünlere kolayca uygulanabilen bir yöntemdir.

Fümigasyonunun başarılı olabilmesi için ilaçlanan ortamın, ilacın özelliğine bağlı olarak belirli bir süre kapalı tutulması zorunludur. Bu nedenle fümigasyon işleminin kapalı bir hacimde veya örtü altında ve bazen vakum altında yapılması gerekmektedir. Uygulamada kullanılan üç fümigasyon yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemler; atmosferik basınçla boş hacim fümigasyonu, çadır altında fümigasyon, vakum fümigasyonudur. İdeal fumigant olarak istenilen özellikler arasında zararlıların tüm evrelerine etkili olması, ucuz, ulaşılabilir, hava ile yaklaşık aynı molekül ağırlığında olmalı, penetrasyon yeteneği iyi olmalı, kullanımı kolay olması gibi ölçüler bulunur. Ülkemizdeki zararlılarla farklı şekillerde mücadele edilmekle birlikte en yaygın ve sıklıkla kullanılan mücadele metodu kimyasal mücadeledir. Kimyasal mücadelede ise uygulama kolaylığı ve geniş etki spektrumuna sahip olması açısından fümigantlar ön plandadır. Metil bromid birçok alanda kullanılan başarılı bir fümigant olmasına rağmen 1992 yılında Montreal Protokolü ile ozon tabakasını tüketen maddeler sınıfına alınmış ve gelişmiş ülkelerde 2005 yılında kullanımı sonlandırılmıştır (Anonim, 1998). Ülkemizde ise metil bromid kullanımına 2007 yılında son verilmiş ve sadece taşıma öncesi ve karantina amaçlı uygulamalar dışında kullanımı yasaklanmıştır.

Ülkemizde depolanmış ürünlerde zararlı böceklerle yönelik olarak sadece fosfin ve sülfürlü florit (SF) aktif maddeli preparatlar kullanılmaktadır. Fosfinin kimyasal kapalı formülü PH_3 'tür. Fosfin bileşiği renksiz, yanıcı ve zehirli bir gazdır. 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 gazı ülkemizde farklı formülasyonlar halinde uzun süreden beri kullanılmakta olan ve ilk kez 1972 yılında tütün, mısır, kuru meyve, hububat ve baklagillerde zararlı organizmalar için ruhsatlandırılmış ve halen kullanılmakta olan bir fümiganttır.

Fosfin gazına göre oldukça yeni sayılan ve ülkemizde ilk defa 2009 yılında kuru meyvelerde zararlı böcekler için ve boş hacim uygulamalarında ruhsatlandırılan sülfürlü florit bir diğer fümiganttır (Anonim, 2019). Fosfin veya hidrojen fosfid (PH_3), düşük moleküler ağırlıklı (34.04 akb), yüksek buhar basıncına sahip ($20^{\circ}C$, 34.2 atm.), hızlı bir şekilde dağılabilen ve tahıl yığınları, paketlenmiş ürün ve materyallere iyi bir nüfuz kabiliyeti olan, düşük kaynama noktalı ($-87.4^{\circ}C$) bir bileşiktir (Bond, 1984). Bu gaz tüketiciye birçok farklı formülasyonda sunulmaktadır. Bu preparatlar doğrudan gaz formundaki formülasyonlar halinde kullanılabildiği gibi, fosfin gazı metal fosfitler şeklinde (alüminyum fosfit, magnezyum fosfit, çinko fosfür) bir tablet, pelet, granül ya da toz preparat haline getirilerek de tüketiciye sunulmaktadır. Alüminyum fosfit yaklaşık 3 gramlık peletler halinde ticari preparat olarak satılmakta ve atmosferik nem ya da mide de bulunan hidroklorik asit ile karşılaşınca içeriğinde toksik olan fosfin gazı açığa çıkmaktadır. 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/m^3 fosfine maruz kalması ölüme yol açar. Havadaki hacmi %1.79 orana ulaşınca patlayıcıdır. Bakır ve değerli metaller ile reaksiyona girer. Açığa çıkan gaz renksiz olup böcekler bulundukları ortamda solunuma devam ettikleri sürece stigmaları vasıtası ile vücuda giriş yapmakta ve mitokondrilerdeki sitokrom-c oksidaz enzimini inhibe ederek ölüme yol açmaktadır (Price, 1985). Metalik fosfitlerin belirli sıcaklık ve nem değerlerinde bulunduğu ortamda fosfin gazı salınımı yaptığı bilinmektedir (Banks, 1991).

Depolanmış hububat zararlısı olan *Liposcelis bostrychophila* ile yürüttükleri çalışmada PCR yöntemini kullanarak *Rickettsiaceae* familyasını araştırmışlardır. Bu familyaya ait olan *Rickettsia* ve *Wolbachia* belirlemişlerdir. Araştırmada kullandıkları primer adı fD1'dir. *Tribolium confusum* ile yürütülen bir başka analiz sonucunda endosimbiyont *Wolbachia* saptamışlardır (Weisburg vd., 1991).

Bir *Sitophilus* türü olan ve daha önce çalışılan *S. oryzae* örneklerinde ise SOPE (γ -Proteobacteria) ve *Wolbachia* belirlenmiştir. Araştırmacılar depolanmış ürünlerde yoğun bulaşma gösteren ve önemli ekonomik zararlara yol açan *Sitophilus* ile mücadelede bu bakterilerden yararlanmanın daha etkili ve çevreye duyarlı mücadele yöntemleri sunabileceğine işaret etmişlerdir (Heddi vd., 1999).

Cao vd. (2004), Çin'in değişik bölgelerinden toplanan *S. 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 LT99.9 değerleri karşılaştırıldığında; Çin'den toplanan bireylerin direnç katsayılarının daha yüksek tespit edildiğini bildirmektedirler. Avrupa'daki depolanmış ürün zararlılarında *Wolbachia* 'nin süper grup ve filogenetik analizi 16S rDNA, *ftsZ*, *wsp* ve *hcpA* dizileri temelinde belirlenmiş ve 16 türünün (%40) *Wolbachia* tarafından enfekte olduğu belirlenmiştir. Bunların altısı yalnızca A sınıfı süper gruba (tüm enfekte türlerin %15'i, enfekte türlerin %37.5'i), dördü de yalnızca süpergrup B (sırasıyla %10 ve %25)'de yer aldığını, *Wolbachia* süpergrup frekansları arasında herhangi bir fark tespit edilmediğini, her iki süpergrupun hepsinde olduğunu, çalışılan dört gen arasında sınırlı bir uyum söz konusu olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuçlar türler arasında *Wolbachia* 'nın horizontal iletimini ve farklı türler arasındaki rekombinasyonunu göstermişlerdir.

Türkiye'de *Wolbachia* üzerinde ilk kez Güz vd. (2012)'nin yaptığı çalışmada süne *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae)'in yumurta parazitoidi olan *Trissolcus* 'de *Wolbachia* enfeksiyonu saptanmıştır. *Wolbachia*, yüzey proteini (*wsp*) kodlayan gene ait DNA dizileri kullanılarak doğrulanmıştır.

Antalya ilinden toplanan *Sitophilus granarius*, *S. zeamais* ve bu türlerin parazitoidi olan *Lariophagus distinguendus*'te endosimbiont bakterilerin belirlenmesi üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu türlerde üç farklı endosimbiont bakteri cinsini; *Wolbachia*, *Arsenophonus* ve *Spiroplasma*'yı 16S rDNA moleküler analizi ile incelemişlerdir. Moleküler analizler için kullanılan 16S rDNA primerleri *Wolbachia* için wspecF ve *Spiroplasma* için ise 63F ve TK55 seçilmiş bağlanma sıcaklığı 55°C olmuştur. *S. granarius* örneklerinde *Wolbachia* ve *Arsenophonus*, *L. distinguendus* örneklerinde *Wolbachia* ve *Spiroplasma*, belirlenirken *S. zeamais* örneklerinde ise bu üç bakteri cinsine rastlanmamıştır (Tunçbilek vd., 2015).

Bir *Sitophilus* türü olan ve daha önce çalışılan *S. oryzae* örneklerinde ise SOPE (γ -Proteobacteria) ve *Wolbachia* belirlenmiştir (Heddi vd., 1999). Araştırmacılar depolanmış ürünlerde yoğun bulaşma gösteren ve önemli ekonomik zararlara yol açan *Sitophilus* ile mücadelede bu bakterilerden yararlanmanın daha etkili ve çevreye duyarlı mücadele yöntemleri sunabileceğine işaret etmişlerdir.

Spiroplasma'nin yapısını inceleyen araştırmacılar sadece uzun ve sarmal yapıda olmadığını, Y şeklinde bir yapıda olduğunu böceklerde barındığını saptamışlardır. Bu çalışmada elektron mikroskobu ve FtsZ proteininin immünogold boyamasını kullanmışlardır. Y-şekilli hücre bölünmesi modelini çok sınırlı sayıda bakteri türü gerçekleştirebilmektedir. Araştırma sonucunda bu bakterilerin arasına *Spiroplasma* de dahil edilmiştir (Ramond vd., 2016).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Türkiye'nin 4 bölgesini temsilen farklı illerden toplanmış hassas ve dirençli 8 farklı (B2, C3, D2, E3, E16, G1, G2, H2) *S. granarius* popülasyonları farklı şehirlerdeki Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı Ziraî Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü'den, Toprak Mahsulleri Ofisi'nden ve özel depolardan temin edilmiştir. Her popülasyonu temsilen rastgele seçilen bireyler %96'lık etanol içerisinde ependorf tüplerine alınmış, deneylerde kullanılabilecek kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Yapılan çalışma için her bir popülasyonu temsilen altı tane ergin birey rastgele seçilmiştir. Toplam 48 bireyin DNA ekstraksiyonları ticari kit protokolüne uyularak yapılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *Sitophilus granarius* popülasyonları

Popülasyon	Şehir	Direnç durumu
C3	Diyarbakır	Hassas
D2	Elazığ	Hassas
E3	Konya	Hassas
G1	Isparta	Hassas
E16	Konya	Dirençli (5.01 X)
B2	Ankara	Dirençli (4.19X)
G2	Isparta	Dirençli (3.48 X)
H2	Burdur	Dirençli (5.26 X)

3.2. İzolasyona Hazırlık ve DNA İzolasyon Aşaması

Çalışmada kullanılacak olan her popülasyona ait bireyler rastgele seçilerek, her popülasyon için numaralandırılmış kaba alınmış, 5 ml ticari renksiz deterjan ve 2 gram tuz ekleyip son hacim 50 mililitreye tamamlanmış olan karışımda 56 °C'de 60 dakika su banyosu inkübasyonuna tabi tutulmuş deterjanın dibe çökmesi engellenmek için her 20 dakikada bir karıştırılmıştır.

Sıcak su banyosundan alınan örnekler, karışımından içerisinden çıkarılarak önce saf su ile üç kez yıkanmış ve ardından kurutma kağıdı kullanılarak kurutulmuştur.

Örneklere ait bireyler ayrı ayrı olacak şekilde 1.5 ml'lik steril ependorf tüpünde sıvı azot kullanılarak ve yine steril olan ezme çubuklarıyla kahverengimsi renk tamamen beyaz olana kadar ezilmiştir. Ezilen örneklerin izolasyonu için ticari kit protokolü modifiye edilerek sırayla şu aşamalar takip edilmiştir:

- İçerisine 180 µl Digestion Solution eklenmiştir. Ardından 25 µl Proteinaz K ekleyip vakit kaybetmeden vortekslenmiştir.
- Daha sonra 60 dakika 56°C'de su banyosu inkübasyonuna tabi tutulmuştur.
- Su banyosunun ardından 25 µL RNase A Solution eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Ardında 200 µL Lysis Solution eklenerek karışımın homojenleşmesi için 15 saniye vortekslenmiştir.
- Vorteksten sonra 200 µL %50'lik ethanol eklenmiştir ve vortekslenmiştir.
- Hazırladığımız karışım mikropipet yardımıyla alınarak altında 2 ml'lik toplama tüpü (collection) içerisinde bulunan steril saflaştırma kolonuna transfer edilmiştir.
- İçerisine 350 µL Wash Buffer 1 eklenerek 8000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir ve saflaştırma kolonu alınarak toplama tüpündeki lizat atılmıştır.
- İçerisine 500 µL Wash Buffer 2 eklenerek 12 000g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir ve saflaştırma kolonu alınarak toplama tüpündeki lizat atılmıştır.
- Saflaştırma kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiş ve hiçbir buffer eklenmeden 12 000g'de 1 dakika tekrar santrifüj edilmiştir.
- Ardından toplama tüpü atılmış ve saflaştırma kolonu steril olan 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Saflaştırma kolonunun filtresine yavaşça 50 µL Elution Buffer eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Inkübasyonun ardından 8000g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpümüzde artık saf DNA bulunmaktadır. Kısa süreli muhafaza edilecek ise +4°C'de veya uzun süreli muhafaza edilecek ise -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Ekstraksiyondan sonra elde edilen DNA'lar kalite ve miktar analizi, nanodrop kullanılarak belirlenmiş olup 1.65 ile 1.9 nanogram/mikrolitre arasında değişen değerler elde edilmiştir.

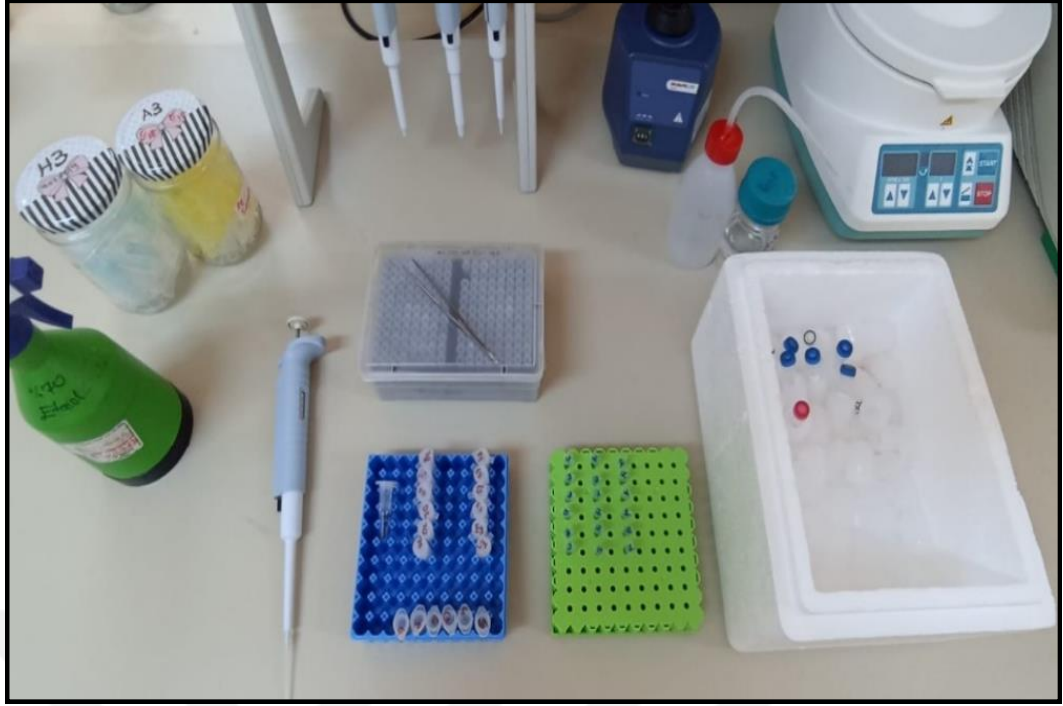
3.3. Kademeli Sıcaklık Düşürme PCR (Touchdown PCR Protokolü)

Bu teknik, standart PCR çalışmalarına çok benzemektedir. Bu PCR’da farklı olarak primer sıcaklıkları ilk önce çok yüksek tutularak primerlerin spesifik şekilde hedef diziye bağlanması amaçlanmaktadır. Primerin bağlanma sıcaklığı ilk önce 60°C tutulmakta ve her döngüde 1°C azaltılarak (10 döngü) 50°C’ye kadar düşürülmektedir. 50°C’den sonra ise derece standart olan 55°C’ye gerilip 25 döngü yapılarak PCR tamamlanmaktadır. Bu PCR tekniği, DNA dizileri üzerindeki belirli bir bölgenin spesifik olarak tespit edilmesinde kullanılmaktadır (Don vd., 1991). Literatür taraması sonucunda en yaygın görülen *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* endosimbiyont bakterilerinin primer dizileri incelenip uygun olan primerler HPLC saflıkta sentezletirilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma*’nın primer bilgileri

Bakteri suşları	Bakterilere ait primer
<i>Wolbachia</i> F; Tm: 58°C	5’-TGGTCCAATAAGTGAAGAACTAGCTA-3’
<i>Wolbachia</i> R; Tm: 59°C	5’-AAAAATTAAACGCTACTCCAGCTTCTGCAC-3’
<i>Rickettsia</i> F; Tm: 51°C	5’-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3’
<i>Rickettsia</i> R; Tm: 52°C	5’-CATCCATCAGCGATAAATCTTTC-3’
<i>Spiroplasma</i> F; Tm: 51°C	5’-GCCGAGACGGTTTAACAAG-3’
<i>Spiroplasma</i> R; Tm: 53°C	5’-TCCGCCACTGGTGTTCTC-3’

HPLC saflıkta kurutulmuş olarak gönderilen primerler 100 µM stok haline getirilmek için belirtilen miktarda (508-675 µL) nuclease-free water ile çözdürülmüştür. Çözdürülen primerler kullanılana kadar -20°C’de muhafazaya alınmıştır. Çalışma sırasında buz içerisinde muhafaza edilerek pipetleme yapılmıştır. PCR uygulaması için ticari kit’in malzemeleri ve protokolü kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Touchdown PCR ön hazırlık aşaması

Bromophenol Blue (6x) hazırlanışı; 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), %0.03 Bromophenol Blue, %0.03 Xylene cyanol FF, %60 Glycerol, 60 mM EDTA tartılıp ısıtmalı inkübatörde çözdürülmüştür.

Touchdown PCR işleminden sonra örneklerin bulunduğu her PCR tüpüne 5 µl 6x bromophenol blue (Yürütme Boyası) eklenmiştir. Mikropipetler ile karışması sağlanmıştır. Daha sonra primerler, Taq Polimeraz; Buffer ve RNAase free water eklenerek PCR aşaması başlatılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. PCR öncesi örneklerin hazırlığı

25 µl Taq PCR Master Mix (2.5 units Taq DNA Polymerase, 1x PCR
Buffer, 200 µM of each dNTP, 1.5 mM MgCl ₂)
5 µl 10x Primer Mix (2 µM of each primer) (2.5 µl F- 2.5 µl R)
15 µl RNase-free water
5 µl DNA
Son hacim; 50 µl

Touchdown PCR kullanılarak yapılan analizinde uygun program kullanılarak yapılmıştır daha sonra örnekler kullanılabilecek kadar buz dolabında muhafaza edilmiştir (Çizelge 3.4).

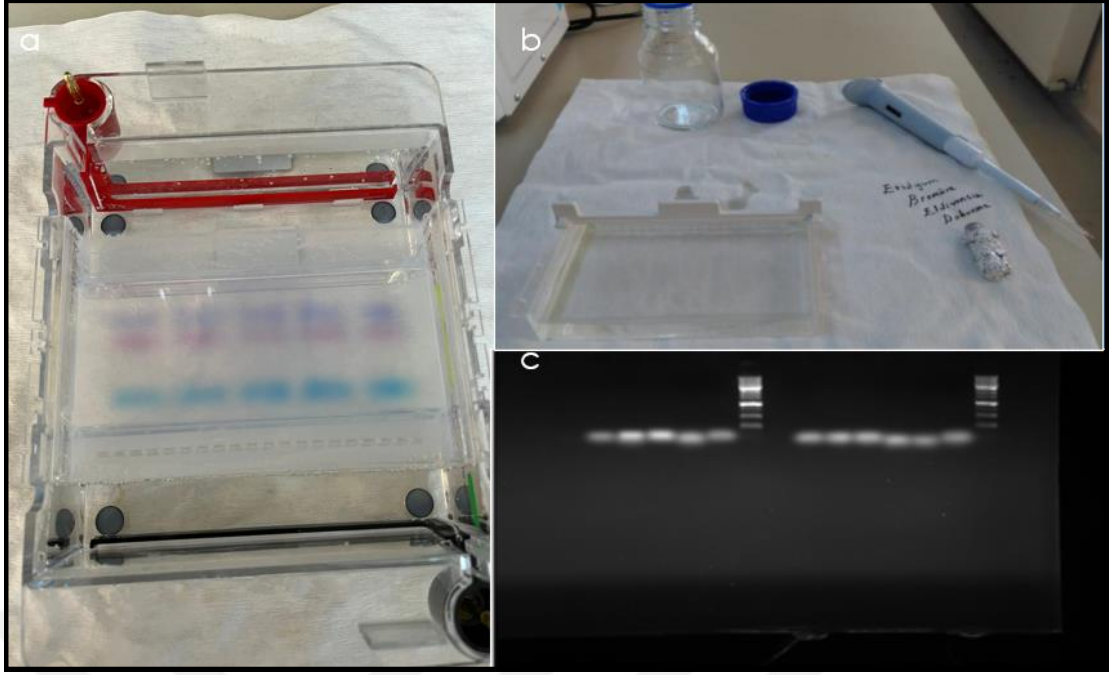
Çizelge 3.4. Touchdown PCR analizi için cihaz programı

Initial Denaturation 94°C 3 dk
Denaturation 94°C 1 dk
Annealing 60°C 1 dk (11x: -1°C, 60°C-50°C)
Extention 72°C 1 dk
11x
Denaturation 94°C 1 dk
Annealing 55°C 1 dk
Extention 72°C 1 dk
25x
Final Extention 72°C 10 dk
+4 °C

3.4. Jel Elektroforezi Protokolü

10x TBE tamponu hazırlanışı; Tris 54 gr, Borik asit 27.5 gr, EDTA 7.5 gr tartılan kimyasalları deiyonize saf suda çözündürülmüş ve pH 8.3'e ayarlanmış olup, son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Agaroz jel (%1) hazırlanışı; 10 ml TBE çözeltisine 2.4 gr agaroz eklenmiş yaklaşık 90 ml saf suyla son hacim 100 ml olacak şekilde tamamlanmıştır. Karışım mikrodalgada orta sıcaklıkta agaroz tamamen eriyip homojen görüntü elde edilene kadar çözüldükten sonra 10 µl Etidyum Bromür ekleyip, hızlıca karıştırılmıştır. Etidyum Bromürü eklendikten hemen sonra ise tarağı takılı ve etrafı kapatılmış olan jel tankına kabarcık oluşturmada yavaş bir şekilde dökülmüştür. Jel tankın içinde donana kadar beklenildikten sonra tarağı çıkartılan jel tanka alınmış, elektroforez çözeltisi jelin üzerini tamamen geçecek kadar eklenerek örnekleri yüklemeye hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Elektroforez aşamaları (a) Kullanıma hazır elektroforez tankı (b) Elektroforezi jel hazırlama (c) Elektroforez sonucu bant görünümü

PCR'dan çıkan örneklerin son hacmi 50 μ l'dir. 5 μ l Brom Fenol Blue her tüpe eklenmiştir ve son hacim 55 μ l olmuştur. Sağ ve sol uçlarda bulunan 2 kuyucuğa 2 μ l markör yüklemesi yapılmıştır. Diğer kuyucukların her birine 25 μ l PCR ürünü yüklenmiştir. Her bir endosimbiyont için uygulanan bu aşamada, en iyi görüntü elde etmek için en uygun elektroforez programları ise; *Wolbachia* için 90 Volt, 150 mA'de 90 dakika, *Rickettsia* için 60 Volt, 100 mA'de 60 dakika, *Spiroplasma* için 60 Volt, 100 mA'de 40 dakika olacak şekildedir. Her endosimbiyont için ayrı ayrı jel elektroforezi cihazında koşturma işlemi gerçekleştirilmiştir. Jel elektroforezi sonrası popülasyonlar UV kabin kullanılarak görüntülenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Ülkemiz illerinden toplanmış hassas ve dirençli olduğu daha önceki çalışmada belirlenmiş sekiz farklı (Ankara, Diyarbakır, Konya, Isparta, Burdur, Elazığ) *S. granarius* popülasyon ile çalışılmıştır. Popülasyonlardan rastgele seçilen altı adet birey kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Benzer çalışmaların taranmasıyla en iyi sonuç veren spesifik primerlere karar verilerek 48 birey için Touchdown PCR protokolü uygulanmış, sonuçlar jel elektroforezinde incelenmiştir. Elde edilen jel görüntülerine göre, taranan 48 örneğe ait *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma*'ya ait bulgular yüzde olarak aşağıdaki verilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Buğday bitinin fosfine hassas ve dirençli popülasyonlarında endosimbiyontların bulunma durumları (%)

Popülasyonların Fosfine Tepkisi	Popülasyonlar ve Direnç Katsayıları (X)	<i>Wolbachia</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Spiroplasma</i>
Hassas	Diyarbakır (C3)	83	66.4	33.2
	Isparta (G1)	83	83	66.4
	Konya (E3)	100	49.8	16.6
	Elazığ (D2)	100	49.8	83
	Ortalama (%)	91.50	62.25	49.80
Dirençli	Konya (E16) 5.01 X	0	33.6	16.6
	Ankara (B2) 4.19X	66.4	16.6	0
	Isparta (G2) 3.48 X	33.2	0	16.6
	Burdur (H2) 5.26 X	100	33.6	49.8
	Ortalama (%)	49.90	20.95	20.75

Jel görüntülerine göre, taranan 48 örneğin 33 tanesinde *Wolbachia* tespit edilmiştir. Bölgeler olarak bakıldığında ise Akdeniz Bölgesin'de 13 bireyde, Doğu Anadolu Bölgesi'nde altı bireyde ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde beş bireyde tespit edilmiştir.

Her bir endosimbiyont için ayrı ayrı bakıldığında 48 birey için *Wolbachia* bulaşıklığı olan toplam birey 33, *Rickettsia* için 20 ve *Spiroplasma* için 18 olarak tespit edilmiştir.

Yüzde olarak ifadesi ise *Wolbachia* için %68.75, *Rickettsia* için %41.66 ve *Spiroplasma* için %37.5 olarak bulunmaktadır.

Tunçbilek vd. (2015), Antalya ilinden toplanan *Sitophilus granarius* popülasyonlarında *Wolbachia*, *Arsenophonus* ve *Spiroplasma*'yı varlığına bakmışlardır. Örneklerde *Wolbachia* ve *Arsenophonus* tespit edilirken *Spiroplasma* tespit edilememiştir. Bizim sonuçlarımızda ise *Wolbachia* ve *Rickettsia*'nın yanında *Spiroplasma* da saptanmıştır.

Türkiye'nin Kırşehir ilindeki tahıl ambarlarında zararlı 10 coleopter türünden sadece *S. granarius* popülasyonlarında *Rickettsia* varlığı saptanmıştır (İpekdal ve Kaya, 2020). Bizim çalışmamızda, toplam sekiz popülasyondan G1 Isparta hariç tüm popülasyonlarda *Rickettsia* tespit edilmiştir ve çalışmamızı destekler niteliktedir.

Wolbachia'nın hassas Elazığ ve hassas Burdur popülasyonlarından elde edilen bireylerdeki bulunma oranı %100; hassas Isparta, hassas Konya ve dirençli Diyarbakır popülasyonu için %83; hassas Ankara popülasyonu için %66.4; dirençli Isparta popülasyonu için %33.2 oranında *Wolbachia* enfeksiyonu tespit edilmiş ancak dirençli Konya popülasyonunda *Wolbachia* varlığı bulunamamıştır.

Rickettsia'nın popülasyonlara göre bulunma oranları ise; dirençli Konya %83; dirençli Diyarbakır %66.4; hassas Burdur ve hassas Elazığ %49.8; dirençli Isparta ve hassas Konya %33.2; hassas Ankara %16.6 bulunmuş ancak hassas Isparta popülasyonunda bulunamamıştır.

Spiroplasma'nın popülasyonlara göre bulunma oranı ise hassas Burdur %83; dirençli Konya %66.4; hassas Elazığ ve dirençli Isparta %49.8; dirençli Diyarbakır %33.2; hassas Konya ve hassas Isparta için %16.6 bulunmuş ancak hassas Ankara popülasyonu için *Spiroplasma* bulunamamıştır.

G2 dirençli Isparta popülasyonuna baktığımızda her üç bakteri içinde bulunma oranları birbirine çok yakın ancak direnç üzerine etkisi olmadığı yorumunu yapabiliyoruz. Aynı ile ait iki popülasyonun enfekte oranlarının bu kadar farklı olmasının birçok

sebebi olabilir; çevresel faktörler, genetik, örnek alınan popülasyonun birkaç jenerasyon vermiş depolardan alınmış olması örnek verilebilir.

Yaman ve Koçak (2019), *S. oryzae* üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda fosfine dirençli 18 örneğin 16'sında, fosfine hassas 18 örneğin yedisinde üç endosimbionttan en az bir tanesi belirlenmiştir. Türkiye genelinde bu üç endosimbiont bakteri türünün en az bir tanesinin %64 oranında bir bulaşma yoğunluğunda olduğu gözlemlenmiştir. Toplam bulunma oranının, %17'sini *Wolbachia*, %56'sını *Rickettsia* ve %6'sını *Spiroplasma* oluşturmaktadır. Dirençli popülasyonlarda %28 oranında *Wolbachia*, %78 oranında *Rickettsia*, %8 oranında *Spiroplasma* bulaşı saptanmıştır, hassas popülasyonlarda ise üç endosimbiont bakteri türünün en az bir tanesinin görülme oranı %39 olup, bulaşın %11'ini *Wolbachia*, %33'ünü *Rickettsia*, %11'ini *Spiroplasma* oluşturmaktadır. Dirençli popülasyonlarda hassas popülasyonlara oranla daha çok endosimbiont bulaşının olduğu gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda *S. granarius*'da %68.75 *Wolbachia*, %41.66 *Rickettsia* ve %37.5 *Spiroplasma* enfeksiyonu bulunmuştur yıllara göre toplam enfeksiyon miktarı artmaktadır şeklinde yorum yapılabilir. Yapılan çalışmada E16 popülasyonunda *Wolbachia*'ya, G1 popülasyonunda *Rickettsia*'ya ve B2 popülasyonunda *Spiroplasma*'ya rastlanmamıştır bu durum *S. oryzae* popülasyonları ve *S. granarius* popülasyonları arasındaki enfeksiyonun yayılışı ve direnç geliştirebilme konusunda ciddi farklılıklar olabileceğine işaretir.

Wolbachia ve *Rickettsia*, yaygın böcek fakültatif simbiyontlarıdır (Anderson ve Karr, 2001). Bu endosimbioz, böceklerin sadece partenogeneziyle ilişkili değildir, aynı zamanda insektisit direnci ile de ilişkilidir (Kontsedalov vd., 2008 ; Liv vd., 2018).

Simbiyontların detoksifikasyon yetenekleri ve hızlı evrim süreçleri göz önüne alındığında konukçularında oluşan pestisit direncine katkı sağladıkları düşünülmektedir (Su vd., 2013). Bir başka çalışmada ise tüm böcek türlerinin %20-70'inde bulunan *Spiroplasma* ve *Wolbachia* 'nin patojenik ve patojenik olmayan bakterilerin enfeksiyonuna karşı konukçularını korudukları saptanmıştır (Shokal vd., 2016).

Simbiyotik aracılı insektisit direnci ve duyarlılığı, böcek türlerine, simbiyont türlerine ve kimyasal bileşiğe göre değişebilir (Liu ve Guo, 2019). Beyaz sinek *Bemisia tabaci* ve *Rickettsia* arasındaki endosimbiyont-insektisit direncinin incelendiği iki çalışmada; enfekte beyaz sineklerin enfekte olmayan beyaz sineklere oranla yaygın olarak kullanılan tiamethoxam, imidacloprid, asetamiprid, piriproksifen ve spiromesifen insektisitlerine karşı daha duyarlı oldukları belirtilmiştir (Kontsedalov vd., 2008). Ghanim ve Kontsedalov'un 2009'da yaptıkları çalışmada *Bemisia tabaci*'ye *Wolbachia* ve *Arsenophonus* ile birlikte enfekte edildiğinde tiametoksam, imidacloprid ve piriproksifene duyarlılıklarının arttığını belirtmişlerdir. Endosimbiyontların varlığı her zaman konukçuların azalan insektisit direnciyle ilişkili değildir. Bazı simbiyontlarla enfekte olmuş konukçularda insektisit direncinin arttığı ya da enfeksiyonun konukçuların insektisit direncini etkilemediği bulunmuştur. *Wolbachia* enfeksiyonun beyaz sineklerde asetamiprid ve spiromesifen'e karşı direnci arttırdığı gösterilmiştir (Ghanim ve Kontsedalov, 2009). Bizim çalışmamız sonucu 3 farklı endosimbiyont için dirençli/hassas olarak değerlendirilen popülasyonlarda endosimbiyont bulunma durumu ve çoklu enfeksiyon bulunmasında herhangi bir paralellik olmadığı bulunmuştur. Örneğin G1 Isparta popülasyonunda toplam altı bireyden *Rickettsia* beş ve *Spiroplasma* dört bireyde olmasına rağmen S+R enfeksiyonu bulunmamıştır.

Benzer şekilde *Wolbachia*, *Aedes aegypti*'nin bifentrin, temephos ve s-metopren kimyasallarına ve biyolojik kontrol ajanı *Bacillus thuringiensis* (Bt)'e duyarlılığını değiştirmemiştir (Duron vd., 2006). *Arsenophonus* ile bir arada bulunan *Rickettsia*, *B. Tabaci*'de asetamipridin insektisit direncini sağlamıştır ancak diafenthiuron duyarlılığını etkilememiştir (Kontsedalov vd., 2008; Ghanim ve Kontsedalov, 2009). Simbiyotik *Burkholderia*'nın, tarımda yaygın olarak kullanılan organofosfor ajanı olan fenitrotyionunu bozabildiğini rapor etmişlerdir (Kikuchi vd., 2012).

Vignesh vd. (2018)'de *Sitophilus oryzae* L. ile yaptıkları araştırmada, *Wolbachia* ve *Rickettsia*'nın fosfin direnci ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda sonuçlar gösteriyor ki hassas ve dirençli olarak belirlenen popülasyonlar arasında bulunma durumları bu çalışmaya destekler niteliktedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Buğday bitinin fosfine hassas ve dirençli popülasyonlarında endosimbiyontların bulunduğu toplam birey sayısı ve çoklu enfeksiyon durumları

Popülasyonların Fosfine Tepkisi	Popülasyonlar ve Direnç Katsayıları (X)	Her bir endosimbiyontun bulunduğu toplam birey sayısı			İkili enfeksiyon bulunan örnek numarası			Üçlü enfeksiyon bulunan örnek numarası
		W	R	S	W+R	W+S	S+R	W+R+S
Hassas	Diyarbakır (C3)	5	4	2	2, 3, 5	1, 6	-	-
	Isparta (G1)	5	5	4	2	-	-	1, 4, 5
	Konya (E3)	6	3	1	3, 4, 6	5	-	-
	Elazığ (D2)	6	3	5	6	1, 2, 5	-	3, 4
	Toplam (%)	91	62	50	33	25	0	5
Dirençli	Konya (E16) 5.01 X	-	2	1	-	-	-	-
	Ankara (B2) 4.19X	4	1	-	-	-	-	-
	Isparta (G2) 3.48 X	2	-	1	-	2	-	-
	Burdur (H2) 5.26 X	5	2	3	-	2, 5	-	4
	Toplam (%)	45	20	20	0	12.5	0	4.16

Çalışmaya ait bulgular yukarıdaki tabloda verilmiştir ve kısaltmalar sırasıyla; *Wolbachia* (W), *Rickettsia* (R), *Spiroplasma* (S), *Wolbachia* ve *Rickettsia*'nın aynı bireyde ve aynı anda bulunduğu ikili enfeksiyon durumu (W+R), *Wolbachia* ve *Spiroplasma*'nın aynı bireyde ve aynı anda bulunduğu durumu (W+S), *Spiroplasma* ve *Rickettsia*'nın aynı anda bulunduğu durumu (S+R), (W+R+S) ise her üç endosimbiyontunda aynı bireyde aynı anda bulunduğu durumu ifade etmek için kullanılmıştır. W, R, S başlığı altındaki sayılar her popülasyonda bulunan toplam altı bireyden toplam kaç tanesinin enfekte olduğunu gösterirken; W+R, W+S, S+R ve W+R+S popülasyonda birden altıya kadar numaralandırılmış örneklerin sayısını göstermektedir.

Hassas popülasyonlar arasında; *Wolbachia* ve *Rickettsia*'nın (W+R) ikili enfeksiyonu bulunan toplam sekiz birey vardır. Enfeksiyon C3 popülasyonunda 2, 3, 5 nolu

bireyler, E3 popülasyonunda 3, 4, 6 nolu bireyler, G1 popülasyonunda iki bireyde ve D2 popülasyonunda 6 nolu bireylerde bulunmuştur.

Wolbachia ve *Spiroplasma* ikili enfeksiyonu (W+S) bulunan toplamda altı birey vardır, enfeksiyon D2 popülasyonu 1, 2, 5 nolu bireylerde, C3 popülasyonunda 1, 6 nolu bireylerde, E3 popülasyonunda 5 nolu bireyde bulunmuştur. *Spiroplasma* ve *Rickettsia*'nın ikili enfeksiyonu (S+R) hem hassas popülasyonlarda hem de dirençli popülasyonlarda bulunamamıştır.

Wolbachia, *Rickettsia* ve *Spiroplasma*'nın üçlü enfeksiyonu (W+R+S) toplamda beş bireyde bulunmuştur. G1 popülasyonunda 1, 4, 5 nolu bireyler ve D2 popülasyonunda 3, 4 nolu bireyler üçlü enfeksiyon bulundurmaktadır.

Hassas popülasyonlarda 24 bireyde enfeksiyon yüzdelerine bakarsak; W+R için %33, W+S için %25, R+S için 0 ve W+R+S için %12 olarak belirlenmiştir.

Dirençli popülasyonlarda W+R ve S+R ikili enfeksiyonu bulunamamıştır. W+S toplam üç bireyde enfeksiyon bulunmuştur ve dağılım G2 popülasyonu 2 nolu birey, H2 popülasyonu 3, 5 nolu bireyler şeklindedir. W+R+S enfeksiyonu sadece H2 popülasyonunda 4 nolu bireyde bulunmuştur. Yüzde olarak bakarsak W+S için %12.5 ve W+R+S için oran %4 olarak belirlenmiştir.

Birden fazla üreme paraziti endosimbiontların (RPE-reproductive parasitic endosymbionts) cinsi veya aynı cinsin birden fazla ırkı ile enfeksiyon yaygın bir durumdur (Malloch vd., 2000; Jaenike vd., 2010; Martin vd., 2013). Aynı anda birden fazla ortak yaşam türüne ev sahipliği yapmanın faydaları, doğal düşmanlara karşı geliştirilmiş direnci içerebilir (Oliver vd., 2006; Guay vd., 2009). Aynı konukçada birkaç farklı endosimbiont türü ile birlikte enfeksiyonlar, çeşitli böcek gruplarında yaygın olarak bulunmaktadır (Goto vd., 2006). Çalışmamız sonucunda her bir ilden temsili alınan popülasyonlardan her birinde en az iki endosimbiont enfeksiyonu bulunmaktadır. RPE'ler arasında antagonistik ilişki olduğuna dair kanıtlarda bulunmaktadır. Örneğin, Goto vd. (2006)'da *Spiroplasma* ve *Wolbachia* arasında olumsuz bir etkileşim olduğunu bildirmiştir. Ancak çalışmamızda W+S hem hassas hem de dirençli popülasyonlarda %25 ve %12.5 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak bu

görüş için W+S enfeksiyonuna bakarak aynı fikirde değiliz ancak hassas ve dirençli popülasyonlarda S+R ikili enfeksiyonu hiç bulunamadığından bu iki endosimbiyont birbirleri için antagostik etki yapabileceğini düşüncesi doğru olabilir. Yine üçlü enfeksiyon durumu hem hassas hem dirençli popülasyonlar içinde vardır bu durumda *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* aynı anda bir bireyde bulunabilmekte ve antagonistik etki yapmamaktadır. Çalışmada bazı endosimbiyont türleri (*Rickettsia* ve *Wolbachia* gibi) çoklu-enfeksiyon olarak birlikte daha sık bulunma eğiliminde olsa da daha büyük popülasyonlar alınarak yapılacak daha kapsamlı çalışmalar sayesinde elde edilecek gözlemlerin endosimbiyontların açıklanmasında etkili olacaktır. Yapılan literatür taramasında *Wolbachia* ve *Rickettsia*'nın insektisit direnci ile ilişkili olabileceği görüşü ağırlıktayken, *Spiroplasma*'nın ise daha çok patojen savunmasında rol aldığına yönelik görüş ve bulgular bulunmaktadır. Ancak depolanmış ürün zararlısı diğer türler ile yapılan çalışmalar incelendiğinde özellikle *Rickettsia* ve *Spiroplasma*'da *Wolbachia* kadar göze çarpmaktadır. Bu sebeple bu üç bakteri de çalışma konusuna dahil edilmiştir. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda endosimbiyont bakterilerin bulunması ve fosfin direnci arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Werren vd. (1995), *Wolbachia* enfeksiyonunun Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera ve Orthoptera takımları dahil böcek türlerinin %20'sinden fazlasında olduğunu; Zug ve Hammerstein (2012)'e göre %40, Hilgenboecker vd. (2008) ve Simoes (2012)'e göre ise arthropoda şubesinde %66 oranında olduğu belirtilmektedir. Ancak bizim çalışmamızda Konya'dan alınan hassas bireyleri temsil eden E3 popülasyonunda *Wolbachia* bulunamamışken *Rickettsia* ve *Spiroplasma* bulunmuştur.

Özetlemek gerekirse; ülkemizde bulunan fosfine karşı hassas ve dirençli olan *S. granarius* L. popülasyonları arasında bakteri yoğunluk farkı bulunmaktadır ancak bakterilerin bulunma oranları arasında herhangi bir kolerasyon yoktur. Araştırma sonucunda 4 hassas, 4 dirençli *S. granarius* popülasyonlarında %68.75 *Wolbachia*, %41.66 *Rickettsia* ve %37.5 *Spiroplasma* enfeksiyonu bulunmaktadır. Popülasyon bazında ayrı ayrı değerlendirildiğinde dirençli popülasyonlarda; Ankara popülasyonunda %66.4 *Wolbachia*, %16.6 *Rickettsia* ve %0 *Spiroplasma*; Konya popülasyonunda %0 *Wolbachia*, %83 *Rickettsia* ve %66.4 *Spiroplasma*; Isparta popülasyonunda %83 *Wolbachia*, %33.2 *Rickettsia* ve %49.8 *Spiroplasma*; Burdur

popülasyonunda %100 *Wolbachia*, %49.8 *Rickettsia* ve %83 *Spiroplasma* saptanmıştır.

Hassas popülasyonlarda ise; Diyarbakır popülasyonunda %83 *Wolbachia*, %66.4 *Rickettsia* ve %33.2 *Spiroplasma*; Elazığ popülasyonunda %100 *Wolbachia*, %49.8 *Rickettsia* ve %33.2 *Spiroplasma*; Konya popülasyonunda %0 *Wolbachia*, %33.2 *Rickettsia* ve %16.6 *Spiroplasma*; Isparta popülasyonunda %33.2 *Wolbachia*, %0 *Rickettsia* ve %16.6 *Spiroplasma* oranları saptanmıştır.

Wolbachia 'nin yok edilmesi durumunda böcek gelişimini olumsuz etkileyeceği göz önüne alınmalıdır. Chen vd. (2012)'ne göre oosit üretimi için *Wolbachia* gereklidir. Vigneron vd. (2012)'e göre ise simbiyotik canlıların patojenlere karşı mücadele ederken böceğin yaşam standartlarını düşürdüğünü ve konukçu bağışıklığı üzerine yeni perspektiflerin bulunduğunu ortaya koyarak, endosimbiyontlar ve patojenler sayesinde böcek direncinin azaldığı mücadele yöntemlerinin artmakta olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda aynı tür böceğin farklı bölge ve/veya ülke popülasyonlarında, endosimbiyont kompozisyonu farklılaşmaktadır (Su vd., 2013). Çalışmada farklı bölgelerden alınan bölgelere ait alınan popülasyonlarda hassas ve dirençli arasında ciddi fark gözlemlenmemesi bu yargıyla ilişkilendirilebilir.

Bir *Sitophilus* türü olan ve daha önce çalışılan *S.oryzae* örneklerinde ise SOPE (γ -Proteobacteria) ve *Wolbachia* belirlenmiştir (Heddi vd., 1999). Depolanmış ürünlerde yoğun bulaşma gösteren ve önemli ekonomik zararlara yol açan *Sitophilus* türleriyle mücadelede SOPE bakterisindem yararlanmanın daha etkili ve çevreye duyarlı mücadele yöntemleri olabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hassas olarak belirtilen bazı popülasyonlarda bu çalışma sonucu endosimbiyont bakterilerin olması, böceğin fosfine direnç geliştirildiği yorumunu yapmaya olanak sağlamıştır. Dolayısıyla bu çalışma hem Buğday biti hem de çalışılan her bir endosimbiyont hakkında bir kaynak teşkil etmektedir.

Endosimbiyontların böceklerle insektisit direnci kazandırdıkları birçok çalışmaya konu olmuştur. Ancak yapılan bu araştırmada böcek-endosimbiyont ilişkisiyle fosfin direncine herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir.

Çalışılan endosimbiyontlar için kullanılan primerler yaygın bulunması sebebiyle seçilmiştir. Birey sayıları ve kullanılan primerler artırılarak daha hassas bir çalışmayla ciddi farkların anlaşılabilmesi mümkün olacaktır. Düşük birey sayısı ile yapılan çalışmada net bir sonuca varmak oldukça zordur. Farklı endosimbiyontların birbirleriyle ilişkilerinin ve popülasyon ilişkilerinin açıklanabilmesi için çalışmalar elzemdir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, ilerdeki çalışmalarda zararlılarla alternatif mücadele yöntemlerine ışık tutacak çalışmalar için temel niteliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Acda, M.A. & Daglish, G.J. (2000). Response to phosphine of susceptible and resistant strains of *Rhyzopertha dominica* (Fabricius)(Coleoptera: Bostrichidae) from the Philippines. *Asia Life Science*, 9(2), 103-113.
- Ahmedani, M.S. (2009). Phytosanitary Management of *Trogoderma Granarium* Everst With Methyl Bromide Alternatives to Ensure Food Security and Safety (Doctoral dissertation, Arid Agriculture University, Rawalpindi)
- Anderson, C.L. & Karr, T.L. (2001). Wolbachia: evolutionary novelty in rickettsial bacteria. *BMC Evolutionary Biology*, 1(1), 10. doi:10.1186/1471-2148-1-10.
- Anonim (2014). Working Material, Use of Symbiotic Bacteria to Reduce Mass Rearing Costs and Increase Mating Success in Selected Fruit Pests in Support of SIT Application. Reproduced by the IAEA Vienna, Austria, 122.
- Anonim (2018). Ankara Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi. <https://acikders.ankara.edu.tr>. (Son erişim tarihi: 01.11.2018).
- Anonim (2022a). Internationam Grain Council. https://www.igc.int/en/gmr_summary.aspx (Son erişim tarihi: 21.07.2022).
- Anonim (2022b). Grain Market Reports summary 2022/2023. <https://www.grainscanada.gc.ca/en/grain-quality/manage/identify-an-insect/primary-insect-pests/granary-weevil.html> (Son erişim tarihi: 23.07.2022).
- Ansell, M.R., Dyte, C.E. & Smith, R.H. (1990). *The inheritance of phosphine resistance in Rhyzopertha dominica and Tribolium castaneum*. 5th International Working Conference on Stored Product Protection. September 09-14, Bordeaux, 961-969.
- Ballinger, M.J. & Perlman, S.J. (2018). The defensive *Spiroplasma* Current Opinion in insect. *Science*, 32, 36-41. doi:10.1016/j.cois.2018.10.004.
- Bandi, C., Dunn, A.M., Hurst, G.D. & Rigaud, T. (2001). Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends in Parasitology*, 17(2), 88-94. doi:10.1016/S1471-4922(00)01812-2.
- Banks, K., Kataham, A., Jaenike, J., Eleftherianos Shokal, U., Yadav, S., Atri, J., Accetta, J. & Kenney, E. (2016). Effects of co-occurring *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts on the *Drosophila* immune response against insect pathogenic and non-pathogenic bacteria. *BMC Microbiology*, 16(1), 16. doi:10.1186/s12866-016-0634-6.
- Beard, C.B., O'Neill, S.L., Tesh, R.B., Richards, F.F. & Askoy, S. (1993). Modification of arthropods vector competence via symbiotic bacteria. *Parasitology Today*, 9(5), 179-183. doi:10.1016/0169-4758(93)90142-3.

- Benhalima, H., Chaudhry, M.Q., Mills, K.A. & Price, N.R. (2004). Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. *Journal of Stored Products Research*, 40(3), 241-249. doi:10.1016/S0022-474C(03)00012-2.
- Bourtzis, K., Braig, H.R., Karr, T.L. & Miller, T.A. (2003). Cytoplasmic incompatibility in *Insect Symbiosis*. CRC Press. p. 217-246.
- Boxall, R.A. (2001). Post-harvest Losses To insect-a world overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 48(14), 137-152. doi:10.1016/S0964-8305(01)00076-2.
- Brumin, M., Levy, M. & Ghanim, M. (2012). Transovarial Transmission of *Rickettsia* and Organ-Specific Infection of the Whitefly *Bemisia tabaci*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5565-5574. doi:10.1128/AEM.01184-12.
- Buchner, P. (1965). *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. Interscience Publishers, New York.
- Cáceres, C., Tsiamis, G., Yuval, B., Jurkevitch, E. & Bourtzis, K. (2019). Joint FAO/IAEA coordinated research project on use of symbiotic bacteria to reduce mass-rearing costs and increase mating success in selected fruit pests in support of SIT application. *BMC microbiology*, 19(1), 284. doi: 10.1186/s12866-019-1644-y
- Carvalho, G.A., Correa, A.S., Oliveira, L.O. & Guedes, R.N.C (2014). Evidence of horizontal transmission of primary and secondary endosymbionts between maize and rice weevils (*Sitophilus zeamais* and *Sitophilus oryzae*) and the parasitoid *Theocolax elegans*. *Journal of Stored Products Research*, 59, 61-65. doi:10.1016/j.jspr.2014.05.004.
- Champ, B.R. & Dyte, C.E. (1976). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report on FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pest, Italy.
- Charlat, S., Hurst, G.D.D. & Merçot, H. (2003). Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics*, 19(4), 217-223. doi:10.1016/S0168-9525(03)00024-6.
- Chen, S.J., Lu, F., Cheng, J.A., Jiang, M.X. & Way, M.O. (2012). Identification and Biological Role of the Endosymbionts *Wolbachia* in Rice Water Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 41(3), 469-477. doi: 10.1603/EN11195.
- Collins, P.J. (1998). Resistance to grain protectants and fumigants in insect pests of stored products in Australia. In *Proceedings of the Australian Postharvest Technical Conference* (pp. 55-57).

- Daglish, G.J., Collins, P.J., Pavic, H. & Kopittke, R. (2002). Effects on time and concentration on mortality of phosphine-resistant *Sitophilus oryzae* (L) fumigated with phosphine. *Pest Management Science*, 58(10), 1015-1021. doi:10.1002/ps.532.
- Dillon, N., Austin, A.D. & Bartowsky, E. (1997). Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Molecular Biology*, 5(1), 21-24. doi:10.1111/j.1365-2583.1996.tb00036.x
- Donahaye, E.J., Navarro, S., Bell, C., Jayas, D., Noyes, R. & Phillips, T.W. (2007) *Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*. Protection International Conference Gold-Coast Australia. August 8-13, Israel, 623.
- Douglas, A.E. (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annum Revolution Entomology*, 60, 17-34. doi:10.1146/annurev-ento010814-020822
- Duron, O., Labbe, P., Berticat, C., Rousset, F., Guillot, S., Raymond, M. & Weill, M. (2006). High *Wolbachia* density correlates with cost of infection for insecticide resistant *Culex pipiens* mosquitoes. *Evolution*, 60(2), 303-314. doi:10.1111/j.0014-3820.2006.tb01108.x.
- Engl, T. & Kaltenpoth, M. (2018). Influence of microbial symbionts on insect pheromones. *Natural Product Reports*, 35(5), 386-397. doi:10.1039/C7NP00068E.
- Fluger, A.C., Inbar, M., Daube, N.M., Katzir, N., Portnoy, V., Belausov, E., Hunter, M.S. & Fein, E.Z. (2012). Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated. *Protection Biology Science*, 279, 1791-6. doi:10.1098/rspb.2011.2095
- Ghanim, M. & Kontsedalov, S. (2009). Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities. *Pest Management Science*, 65(9), 939-942. doi:10.1002/ps.1795.
- Goodacre, S.L., Fricke, C. & Martin, O.Y. (2015). A screen for bacterial endosymbionts in the model organisms *Tribolium castaneum*, *T. confusum*, *Callosobruchus maculatus*, and related species. *Insect science*, 22(2), 165-177. doi:10.1111/1744-7917.12096.
- Gosalbes, M.J., Latorre, A., Lamelas, A. & Moya, A. (2010). Genomics of intracellular symbionts in insects. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 271-278. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.12.001.
- Goto, S., Anbutsu, H. & Fukatsu, T. (2006). Asymmetrical interactions between *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts coexisting in the same insect host. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4805-4810. doi:10.1128/AEM.00416-06.

- Guay, J.F., Boudreault, S., Michaud, D. & Cloutier, C. (2009). Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: role of *hamiltonella defensa* bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid. *Journal of Insect Physiology*, 55(10), 919-926. doi:10.1016/j.jinsphys.2009.06.006.
- Gündüz, A.E. & Douglas, A.E. (2009). Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1658), 987-991. doi:10.1098/rspb.2008.1476.
- Harris, H.L., Brennan, L.J., Keddie, B.A. & Braig, H.R. (2010). Bacterial symbionts in insects: balancing life and death. *Symbiosis*, 51, 37-53. doi:10.1007/s13199-010-0065-3.
- Heddi, A., Grenier, A.M., Khatchadourian, C., Charles, H. & Nardon, P. (1999). Four Intracellular Genomes Direct Weevil Biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont and *Wolbachia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(12), 6814-6819. doi:10.1073/pnas.96.12.6814.
- Henri, H. & Mouton, L. (2011). High-Resolution Melting Technology: A New Tool For Studying the *Wolbachia* Endosymbiont Diversity in the Field. *Molecular Ecology Resources*, 12, 75–81. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03064.x.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A. & Werren, J. H. (2008). How many species are infected with *Wolbachia*? a statistical analysis of current data. *FEMS microbiology letters*, 281(2), 215-220. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x.
- Ignatowicz, S. (1999). *Cases of phosphine resistance for the grain weevil Sitophilus granarius found in Poland*. Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-Product Protection, October 14-19 1998, Beijing, China, 625-630.
- Ioannidis, P. & Bourtzis, K. (2007). Insect symbionts and applications: the paradigm of cytoplasmic incompatibility inducing *Wolbachia*. *Entomological Research*, 37(3), 125-138. doi:10.1111/j.1748-5967.2007.00102.x.
- Jaenike, J., Stahlhut, J.K., Boelio, L.M. & Unckless, R.L. (2010). Association between *Wolbachia* and *Spiroplasma* within *Drosophila neotestacea*: an emerging symbiotic mutualism? *Molecular Ecology*, 19(2), 414-425. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04448.x.
- Kageyama, D., Hoshizaki, S. & Ishikawa, Y. (1998). Female-biased sex ratio in the asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*: evidence for the occurrence of feminizing bacteria in insects. *Heredity*, 81(3), 311–316.
- Kageyama, D., Nishimura, G., Hoshizaki, S. & Ishikawa, Y. (2002). Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Heredity*, 88(6), 444-449. doi:10.1038/sj/hdy/6800077.

- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K. & Fukatsu, T. (2012). Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 109, 8618-22. doi:10.1073/pnas.1200231109.
- Kliot, A., Cilia, M., Czosnek, H. & Ghanim, M. (2014). Implication of the bacterial endosymbiont *Rickettsia* spp. in the whitefly *Bemisia tabaci* interactions with Tomato yellow leaf curl virus. *American Society for Microbiology Journals*, 88(10), 5652-5660. doi:10.1128/JVI.00071-14.
- Koçak, E. & Ertürk, Ş. (2019). Türkiye’de Testereli Böcek (*Oryzaephilus surinamensis* L. Coleoptera, Silvanidae) Popülasyonlarında Endosimbiont Bakterilerin Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(1), 126-133.
- Koçak, E. & Türkmen, K. (2019). Pirinç Biti *Sitophilus oryzae* Popülasyonlarında *Wolbachia*’nın Belirlenmesi. *Yalvaç Akademi Dergisi*, 4, 23-31.
- Koçak, E. & Ünal, H. (2019). Küçük Kıрма Biti *Cryptolestes ferrugineus* (L.) Popülasyonlarında Endosimbiont Mikroorganizmaların Belirlenmesi. *Turkish Journal of Agriculture: Food Science and Technology*. doi:10.24925/turjav.v7isp2.93-96.3153.
- Koçak, E. & Yaman, M.O. (2019). Pirinç Weevil *Sitophilus oryzae* L. popülasyonlarında endosimbiont mikrobiyotik mikroorganizmalar. *Türk Tarım-Gıda Bilimi ve Teknolojisi Dergisi*, 7(2), 82-85. doi:10.24925/turjaf. v7isp2.82-85.3150.
- Kontsedalov, S., Fein, E.Z., Chiel, E., Gottlieb, Y., Inbar, M. & Ghanim, M. (2008). The presence of *Rickettsia* is associated with increased susceptibility of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides. *Pest Management Science*, 64(8), 789-792. doi: 10.1002/ps.1595.
- Kontsedalov, S., Zchori-Fein, E., Chiel, E., Gottlieb, Y., Inbar, M. & Ghanim, M. (2008). The presence of *Rickettsia* is associated with increased susceptibility of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides. *Pest management science: formerly Pesticide Science*, 64(8), 789-792. doi:10.1002/ps.1595.
- Li, Y., Liu, X. & Guo, H. (2018). Variations in endosymbiont infection between buprofezin-resistant and susceptible strains of *Laodelphax striatellus* (Fallén). *Current Microbiolog*, 75(6), 709-715. doi:10.1007/s00284-018-1436-x.
- Liu, X.D. & Guo, H.F. (2019). Importance of endosymbionts *Wolbachia* and *Rickettsia* in insect resistance development. *Current Opinion in Insect Science*, 33, 84-90. doi: 10.1016/j.cois.2019.05.003.
- Lukasik, P., Van Asch, M., Guo, H., Ferrari, J., Charles, J. & Godfray, H. (2013). Unrelated facultative endosymbionts protect aphids against a fungal pathogen. *Ecology letters*, 16(2), 214-218. doi:10.1111/ele.12031.

- Malloch, G., Fenton, B. & Butcher, R.D. (2000). Molecular evidence for multiple infections of a new subgroup of *Wolbachia* in the European raspberry beetle *byturus tomentosus*. *Molecular Ecology*, 9(1), 77-90. doi:10.1046/j.1365-294c.2000.00836.x
- Markov, A.V. & Zakharov, I.A. (2005). Sexual reproduction of insects is regulated by cytoplasmic bacteria. *Russian Journal of Developmental Biology*, 36(4), 230–239.
- Marvaldi, A.E. & Lanteri, A.A. (2005). Key to higher taxa of south American weevils based on adult characters (Coleoptera: Curculionidea). *Revista Chilena Historia Natural*, 78, 65-87.
- Matalon, Y., Katzir, N., Gottlieb, Y., Portnoy, V. & Zchori-Fein, E. (2007). *Cardinium* in *Plagiomerus diaspidis* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(2), 106-108. doi:10.1016/j.jip.2007.02.010.
- Mert, Ü. (2019). *Kapadokya Bölgesi, Nar Vadisi Geleneksel Kabak Ekim Alanları Ve Çevresinde Insecta (Arthropoda) Taksonları Üzerine Ekolojik - Faunistik Araştırma Ve Gözlemler* (Yüksek Lisans Tezi, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Moran, N.A. & Baumann, P. (1994). Phylogenetics of cytoplasmically inherited micro-organisms of arthropods. *Trends in Ecology Evolution*, 9(1), 15-20. doi:10.1016/0169-5347(94)90226-7.
- Moran, N.A. & Baumann, P. (2000). Bacterial endosymbionts in animals. *Current Opinions in Microbiology*, 3, 270- 275.
- Nayak, M.K., Collins, P.J., Pavic, H. & Cao, Y. (2003). Developments in phosphine resistance in China and possible implications for Australia. In *Proceedings of the Australian postharvest technical conference Canberra* (pp. 25-27).
- Özer, M. (1957). Türkiye’de depo, ambar, fabrika ve silolarda muhtelif hububat taneleri, un ve mamülleri ile kuru meyveler ve tütünde önemli zarar yapan böcek türlerinin morfolojileri, kısa biyolojileri ve yayılışları üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 125, 57-61.
- Penz, T., Schmitz-Esser, S., Kelly, S.E., Cass, B.N., Müller, A., Woyke, T., Malfatti, S.A., Hunter, M.S. & Horn, M. (2012). Comparative genomics suggests an independent origin of cytoplasmic incompatibility in *Cardinium hertigii*. *PLoS Genetic*, 8(10), e1003012. doi: 10.1371/journal.pgen.1003012.
- Rajendran, S. (1992). Selection for resistance to phosphine or methyl bromide in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Bulletin of Entomological Research*, 82(1), 119-124. doi:10.1017/S000748530005152X.
- Ramond, E., Maclachlan, C., Rosset, C.S., Knott, G.W. & Lemaitre, B. (2016). Cell division by longitudinal scission in the insect endosymbiont *Spiroplasma poulsonii*. *MBio*, 7(4), 16. doi:10.1128/mBio.00881-16.

- Rees, D. (2004). *Insects of Stored Products*. CSIRO Publishing, Canada.
- Reichmuth, C., Klementz D., Rassmann, W., Stenglein, M. & Münzel, M. (2007). *Phosphine Resistance in the Stored Product Insect Pests the Rusty Grain Beetle *Cryptolestes ferrugineus* and the Granary Weevil *Sitophilus granarius**. FTIC Ltd. Publishing, Israel.
- Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P. & Solignac, M. (1992). *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 250(1328), 91-98. doi:10.1098/rspb.1992.0135.
- Sapp, J. (1994). *Evolution by Association: A History of Symbiosis*. Oxford University Press.
- Saridaki, A. & Bourtzis, K. (2010). *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. *Current Opinion in Microbiology*, 13(1), 67-72. doi: 10.1016/j.mib.2009.11.005.
- Sert, O. (1995). *İç Anadolu Bölgesi Curculionidae (Coleoptera) familyası üzerinde Taksonomik Çalışmalar*. (Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Shokal, U., Yadav, S., Atri, J., Accetta, J., Kenney, E., Banks, K., Kataham, A., Jaenike, J. & Eleftherianos, L. (2016). Effects of co-occurring *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts on the *Drosophila* immune response against insect pathogenic and non-pathogenic bacteria. *BMC Microbiology*, 16(1), 16. doi:10.1186/s12866-016-0634-6.
- Simoës, P.M. (2012). *Diversity and dynamics of Wolbachia-host associations in arthropods from the Society archipelago, French Polynesia*. (Doktora Tezi, Université Claude Bernard, Biodiversité).
- Sinkins, S., Curtis, C. & O'Neill, S.L. (1997). The potential application of inherited symbiont systems to pest control. In *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction* (pp. 155-175).
- Stouthamer, R. (1993). The use of sexual versus asexual wasps in biological control. *Entomophaga*, 38(1), 3-6.
- Su, J., Chow, B., Boulianne, G.L. & Wilde, A. (2013). The BAR domain of amphiphysin is required for cleavage furrow tip-tubule formation during cellularization in *Drosophila* embryos. *Molecular biology of the cell*, 24(9), 1444-1453. doi:10.1091/mbc.e12-12-0878.
- Ter-Minasyan, M.E. (1978). *Weevils of the subfamily Cleoninae in the fauna of the USSR*. New Delhi: Amerind, 1-166.
- Tunçbilek, A.S., Bakir, S., Derin, I. & Bilbil, H. (2015). Screening of reproductive symbionts of *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais* and their parasitoid

Lariophagus distinguendus. *Integrated Protection of Stored Products IOBC-WPRS Bulletin*, 111, 511-517.

- Valero, G.L., Navarro, M.S., Brocal, V.P., Heddi, A., Moya, A., Verdugo, J.M.G. & Latorre, A. (2004). Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a Secondary Symbiont in the Aphid *Cinara cedri*. *Journal of Bacteriology*, 186(19), 6626–6633. doi: 10.1128/JB.186.19.6626-6633.2004.
- Varlı, S.V. (1998). *Balıkesir Geniş Yapraklı Ormanlarında Zarar Yapan Polydrusus Germ. (Coleoptera: Curculionidae) Türleri Üzerinde Araştırmalar*. (Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Vigneron, A., Charif, D., Monégat, V.C., Vallier, A., Gavory, F., Wincker, P. & Heddi, A. (2012). Host Gene Response to Endosymbiont and Pathogen in the Cereal Weevil *Sitophilus oryzae*. *BMC Microbiology*, 12(1), 14. doi:10.1186/1471-2180-12-S1-S14.
- Vignesh, S., Balachandar, D. & Mohankumar, S. (2018). Variation in endosymbionts of phosphine resistant and susceptible key stored grain insect pests. *Madras Agricultural Journal*, 105(4-6), 201-205. doi:10.29321/MAJ.2018.000130.
- Wade, M.J. & Chang, N.W. (1995). Increased male fertility in *Tribolium confusum* beetles after infection with the intracellular parasite *Wolbachia*. *Nature*, 373(6509), 72-74. doi:10.1038/373072a0.
- Weeks, A.R., Marec, F. & Breeuwer, J.A. (2001). A mite species that consists entirely of haploid females. *Science*, 292(5526), 2479-2482. doi:10.1126/science.1060411.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Of Bacteriology*, 173(2), 697-703. doi:10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- Werren, J.H. & Beukeboom, L.W. (1998). Sex determination, sex ratios and genetic conflict. *Annual review of ecology and systematics*, 29, 233-261. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.29.1.233
- Werren, J.H., Zhang, W. & Guo, L. (1995). Evolution and Phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive Parasites of Arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London*, 261, 55-63. doi:10.1098/rspb.1995.0117.
- Yaman M.O. & Koçak, E. (2019) Pirinç *Biti Sitophilus oryzae* (L.) Popülasyonlarında Endosimbiyont Mikroorganizmaların Belirlenmesi. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 72, 82-85. doi:10.24925/turjaf.v7isp2.82-85.3150
- Zchori-Fein, E., Faktor, O., Zeidan, M., Gottlieb, Y., Czosnek, H. & Rosen, D. (1995). Parthenogenesis-inducing microorganisms in *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Insect Molecular Biology*, 4(3), 173-178. doi:10.1111/j.1365-2583.1995.tb00023.x.

- Zchori-Fein, E., Perlman, S.J., Kelly, S.E., Katzir, N. & Hunter, M.S. (2004). Characterization of a 'Bacteroidetes' symbiont in Encarsia wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of '*Candidatus Cardinium hertigii*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 961-968. doi:10.1099/ijs.0.02957
- Zeng, L. (1999). *Development and countermeasures of phosphine resistance in stored grain insects in Guangdong of China*. Proceedings of the Seventh International WorkingConference on Stored-product Protection. October 14-19, Beijing, China, 642-647.



ÖZGEÇMİŞ

