



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KAPRA BÖCEĞİ *Trogoderma granarium*'un
KONTROLÜNDE BAKIR
NANOPARÇACIKLARININ İNSEKTİSİT
AKTİVİTESİ

Mohammed Lengichow KADİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Ağustos-2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KAPRA BÖCEĞİ *Trogoderma granarium*'un KONTROLÜNDE BAKIR NANOPARÇACIKLARININ İNSEKTİSİT AKTİVİTESİ

Mohammed Lengichow KADİR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

1. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aşlı DAĞERİ
2. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN

2022, 72 Sayfa

Jüri

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aşlı DAĞERİ
Prof. Dr. Levent ÜNLÜ
Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

Depo zararlıları (Dermestidae: Coleoptera) her yıl depolanan ürünlerin miktarında ve kalitesinde önemli bir azalmaya neden olmaktadır. *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) Kapra böceği, kontrolü oldukça zor olan ve karantinaya tabi bir depo zararlısıdır. Depolanan tahıllar içinde yaşayarak ciddi oranda ürün nitelik kaybına neden olan, insan sağlığı için tehdit oluşturan, zorlu koşullara ve birçok insektisite karşı direnç gösteren bir böcektir. Son zamanlarda, gelişmekte olan nanoteknolojik yaklaşımlar ile elde edilen nanomalzemelerin, bu tür zararlıların kontrolü için umut verici, güvenilir ve alternatif pestisitler olarak kullanılabileceği önerilmektedir. Bu çalışmada, *T. granarium*'a karşı insektisit etkinliğini araştırmak için, yeşil sentez yöntemiyle *Origanum* sp. ekstraktından bakır nanoparçacıklar (g - Cu NP) sentezlenmiştir. Sentezlenen g - Cu NP'lerin oluşumu mikroskopik ve spektroskopik teknikler kullanılarak doğrulanmıştır. g - Cu NP'lerin yüzey plazmon rezonansı 385 nm' de, UV - Görünür bölge - spektrofotometresi (Ultraviolet (UV) - visible (UV-Vis)) ile ölçülmüştür. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) görüntülerine göre g - Cu NP'leri 6.59 ± 0.57 nm boyutundadır. X - ışını Kırınım Spektroskopisi (XRD) ve Enerji Dağılımlı X - Işını Spektroskopisi (EDX) kullanılarak Cu NP'lerin kristal yapıda olduğu ve Cu, O ve diğer organik içeriği gösterilmiştir. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi (FTIR) analizi ile kullanılan bitki ekstraktının g - Cu NP'lerin sentezinde yer aldığı gösterilmiştir. g - Cu NP'lerin *T. granarium*'a karşı insektisit aktivitesinin araştırılması sonucunda ise, 250 ve 300 ppm konsantrasyonlarda %90 ölüm oranı kaydedilmiştir. *TgSOD*, *TgCAT* ve *TgGPX* genlerinin RTq-PCR kullanılarak araştırılan ifade analizi, bu genlerin g - Cu NP'ler ile beslenen böceklerde yüksek oranlarda ifade edildiklerini göstermiştir. Önemli ölüm oranlarına ve genlerin artan ifade seviyelerine dayanarak, sentezlenen g - Cu NP'lerin zararlı yönetiminde etkili olabileceği ve entegre zararlı yönetiminin (IPM) potansiyel bileşenlerinden biri hâline gelebileceği önerilebilir. Bununla birlikte, diğer NP türlerinin bu zararlı üzerindeki etkilerine ilişkin sınırlı çalışmaların bulunması nedeniyle, daha fazla araştırma yapılması tavsiye edilebilir.

Anahtar Kelimeler: Bakır nanoparçacıklar, gen ifadesi, Kapra böceği, *Origanum* sp., yeşil sentez

ABSTRACT

MS THESIS

Insecticidal Efficacy of Copper Nanoparticles for Control of Khapra Beetle *Trogoderma granarium*

Mohammed Lengichow KADİR

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

**1st Advisor: Assist. Prof. Dr. Ash DAĞERİ
2nd Advisor: Assist. Prof. Dr. Tuğba Nur ASLAN**

2022, 72 Pages

**Jury
Assist. Prof. Dr. Ash DAĞERİ
Prof. Dr. Levent ÜNLÜ
Assoc. Prof. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU**

Stored product pests (Dermestidae: Coleoptera) cause a significant decrease in the quantity and quality of stored products each year. *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), Khapra beetle is a stored product pest that is very difficult to control and subject to quarantine. This insect causes serious loss of product quality by living in stored grains, threatening human health, and showing resistance to harsh conditions and many insecticides. Recently, the emerging scientific field called "nanotechnology" suggests that nanomaterials can be used as a promising, reliable, and alternative pesticide for the control of such pests. In this study, copper nanoparticles (g - Cu NP) were synthesized from *Origanum* sp. extract by the green synthesis method to investigate the insecticide activity against *T. granarium*. The formation of synthesized g - Cu NPs was confirmed using microscopic and spectroscopic techniques. Surface plasmon resonance of g - Cu NPs was measured at 385 nm by Ultraviolet (UV) - visible (UV-Vis) spectrophotometer. According to the Transmission Electron Microscope (TEM) images, g - Cu NPs are 6.59 ± 0.57 nm in size. X - ray Diffraction Spectroscopy (XRD) and Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDX) analyses have demonstrated crystalline forms and Cu, O and other organic contents of g - Cu NPs. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis has shown that the plant extract used is involved in the synthesis of g - Cu NPs. As a result of the investigation of the insecticidal activity of g - Cu NPs against *T. granarium*, 90% mortality was recorded at 250 and 300 ppm concentrations. Expression analysis of *TgSOD*, *TgCAT*, and *TgGPX* genes investigated using Reverse transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction (RT – qPCR) analysis has shown that these genes are highly expressed in insects fed with g - Cu NPs. Based on the significant mortality rates and increased gene expression levels, it can be suggested that synthesized g - Cu NPs could be effective in pest management and can become one of the potential components of integrated pest management (IPM). However, further research can be recommended due to the limited availability of studies on the effects of other types of NPs on this pest.

Keywords: Copper nanoparticles, gene expression, green synthesis, Khapra beetle, *Origanum* sp.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmalarımın süresince her türlü bilimsel katkı ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ'ye değerli katkılarından dolayı teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans ikinci tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN'a, katkılarından dolayı saygı ve şükranlarımı arz ederim.

Bu tez çalışmasının projesini destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BAP Proje No: 221315001), tez deney ve analizlerinin büyük bir kısmının gerçekleştiği Necmettin Erbakan Üniversitesi BİTAM (Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi)'a, bana maddi destek sağlayan Türkiye Bursları (YTB)'na, Wolkite Üniversitesi ve Etiyopya Bilim ve Yüksek Eğitim Bakanlığı'na teşekkür ederim.

Tüm bu süreçte yanımda olan, çalışmalarımda büyük bir titizlikle yardımcı olan değerli arkadaşım Hasan SİVRİKAYA'ya teşekkür eder, minnettarlığımı sunarım. Çalışmalarım süresince deneylerime katkı sağlayan Öğr. Gör. Fuat ASLAN'a teşekkür ederim. Yüksek lisans sürecimde katkıları olan Kübra SEYHAN, Ümran ATA, Feyza KOSTAK'a ve diğer bölüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, hayatım boyunca sonsuz desteklerini sağlayan kıymetli anneme ve tüm aileme teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim süresince, kıymetli tavsiyeleri ve teşvikleri ile yanımda olan üniversite dışındaki tüm arkadaşlarıma özel teşekkürlerimi sunarım. Tavsiyeleriniz, teşvikleriniz ve destekleriniz olmasaydı, çalışmamı tamamlamam zor olurdu.

Mohammed Lengichow KADİR
KONYA - 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
ÇİZELGELER LİSTESİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. <i>Trogoderma granarium</i> (Kapa böceği)	5
2.1.1. <i>Trogoderma granarium</i> 'un Biyolojisi.....	5
2.1.2. <i>Trogoderma granarium</i> 'un ekonomik önemi.....	7
2.2. <i>Origanum</i> sp.	8
2.3. Nanoparçacıklar	9
2.3.1. Nanoparçacıkların sınıflandırılması.....	9
2.3.2. Nanoparçacıkların sentez yöntemleri.....	12
2.3.3. Cu Nanoparçacıklar ve Özellikleri	15
2.3.4. Nanoparçacıkların uygulama alanları	16
2.4. Güvenilir ve Çevre Dostu Alternatif Pestisit İhtiyacı: Nanopestisitler... 16	
2.4.1. Tarımda bitki koruyucu olarak nanoparçacıklar	17
2.4.2. Bitki ve depo zararlılarının kontrolünde nanoparçacıklar	18
2.4.3. İnsektisit olarak yeşil Cu NP'ler.....	20
2.4.4. Nanoparçacıkların diğer uygulamaları.....	22
2.5. Nanoparçacıklar ve Oksidatif Stres	23
2.5.1. Oksidatif stres biyobelirteçlerinin türleri	24
2.5.2. Biyobelirteçler olarak Süperoksit dismutaz, Katalaz, ve Glutasyon peroksidaz	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. <i>Origanum</i> sp. Yaprından Ekstrakt Hazırlanması	27
3.2. <i>Origanum</i> sp. ekstraktından Yeşil Sentez Yolu ile Nanoparçacık Eldesi	27
3.3. g - Cu NP'lerin karakterizasyonu	28
3.4. Böcek yetiştirme	29
3.5. Biyoassay deneyi	29
3.6. g - Cu NP'lerin <i>Trogoderma granarium</i> 'da Detoksifikasyon Enzim Genleri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	29
3.6.1. RNA izolasyonu.....	30
3.6.2. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi	30

3.6.3.	<i>Trogoderma granarium</i> detoksifikasyon genleri için uygun primerlerin tasarlanması	30
3.6.4.	Kantitatif Eş Zamanlı PCR (RT - qPCR).....	31
3.7.	İstatistiksel analiz.....	32
4.	ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	33
4.1.	Bakır Nanoparçacıklarının Sentezi	33
4.2.	Cu NP'lerin Sentezi için Optimizasyon Çalışmaları	35
4.3.	Cu NP'lerin Karakterizasyon Çalışmaları	39
4.3.1.	g - Cu NP'lerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile boyut ve şekil analizi	40
4.3.2.	Cu NP'lerin Infrared Spektrometresi ile Yapısal Analizi (FTIR).....	43
4.3.3.	Cu NP'lerin X-ışını Difraksiyonu Analizi (XRD).....	45
4.3.4.	Cu NP'lerin Termal Gravimetrik Analizi (TGA)	47
4.3.5.	Yeşil Cu NP'lerin Zeta Potansiyel ölçümü	48
4.3.6.	İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP - MS)	49
4.4.	Kapra Böceğini g - Cu NP ile Besleme Biyoassayı.....	50
4.5.	Cu NP Muamelesi Sonrası <i>TgSOD</i> , <i>TgCAT</i> ve <i>TgGPX</i> Genlerinin İfade Seviyesi Analizi	53
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	57
5.1	Sonuçlar	57
5.2	Öneriler	58
6.	KAYNAKLAR	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 . Kapra böceği larvası (a.) ve ergini (b.).	5
Şekil 2.2. <i>Trogoderma granarium</i> Everts'in yaşam döngüsü.	6
Şekil 2.3. Farklı özelliklerine göre nanoparçacıkların genel sınıflandırılmaları	10
Şekil 2.4. Kimyasal bileşimlerine göre nanoparçacıkların sınıflandırılması.	12
Şekil 2.5. Nanoparçacıkların yeşil sentezi ve karakterizasyonu	14
Şekil 2.6. SOD enzimi ile süperoksit anyonlarının moleküler oksijen ve hidrojen peroksit dismutasyonu.	25
Şekil 2.7. Katalaz ile H ₂ O ₂ 'nin su ve oksijene detoksifikasyonu.	25
Şekil 2.8. Glutatyon monomer GSH'nin GPX ile disülfid formuna indirgenmesi	26
Şekil 3.1. <i>Origanum</i> sp.'den bitki ekstraktının hazırlanması	27
Şekil 4.1. a. pH düzenlemesi olmayan reaksiyon b. pH düzenlemesi ile reaksiyon.	34
Şekil 4.2. g - Cu NP'lerin (mavi) ve <i>Origanum</i> sp. ekstraktının (kırmızı) UV / Görünür bölge absorpsiyon spektrumları	34
Şekil 4.3. g - Cu NP sentezinde eklenen ekstrakt hacmi optimizasyonu için UV / Görünür bölge analizi	36
Şekil 4.4. g - Cu NP sentezinde Cu derişiminin optimizasyonu için UV / Görünür bölge analizi	36
Şekil 4.5. g- Cu NP sentezinde pH optimizasyonu için UV / Görünür bölge analizi.	37
Şekil 4.6. g - Cu NP sentezinde reaksiyon süresinin optimizasyonu için UV / Görünür bölge analizi	38
Şekil 4.7. g - Cu NP sentezinde sıcaklık optimizasyonu için UV / Görünür bölge analizi	39
Şekil 4.8. g - Cu NP' lerin TEM görüntüleri (120 kV); a. skala: 10 nm b. skala: 50 nm	40
Şekil 4.9. TEM görüntülerinden elde edilen boyut dağılım grafiği.	41
Şekil 4.10. g - Cu NP örneğinin EDS analizi	42
Şekil 4.11. <i>Origanum</i> sp. ekstraktı (kırmızı) ve g - Cu NP'ye (siyah) ait FTIR spektrumları	44
Şekil 4.12. g - Cu NP örneğinin XRD spektrumu	46
Şekil 4.13. g - Cu NP örneğinin XRD spektrumu pik listesi.	46
Şekil 4.14. Sentezlenen nanoparçacık örneğinin XRD deseni (Rietveld analizi)	47
Şekil 4.15. g - Cu NP'nin TGA analizi.	48
Şekil 4.16. g - Cu NP örneğine ait zeta potansiyeli grafiği	49
Şekil 4.17. Kapra böceğinin g - Cu NP'lar ile beslenmesi sonrası elde edilen ölüm oranları	50
Şekil 4.18. g - Cu NP muamelesi sonrası <i>TgSOD</i> geni ifade seviyeleri.	53
Şekil 4.19. g - Cu NP muamelesi sonrası <i>TgCAT</i> geni ifade seviyeleri	54
Şekil 4.20. g - Cu NP muamelesi sonrası <i>TgGPX</i> geni ifade seviyeleri.	55

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1. Böcek zararlılarının kontrolünde NP'lerin potansiyel uygulamaları	19
Çizelge 2.2. Biyosentezlenmiş Cu NP'lerin böcek öldürücü özellikleri.....	21
Çizelge 2.3. Tarımda çeşitli nanoparçacık türlerinin uygulamaları.....	22
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerler.	31
Çizelge 3.2. RT - qPCR çalışması için kullanılan bileşenler.....	32
Çizelge 4.1. FTIR analiz sonuçları ve <i>Origanum</i> sp. ekstraktının aracılık ettiği g - Cu NP'lerin atanan fonksiyonel grupları	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

nm	:	Nanometre
µl	:	Mikrolitre
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
mg	:	Miligram
g	:	Gram
ppm	:	Milyonda bir
°C	:	Santigrat derece
rpm	:	Dakikada Devir Sayısı
pH	:	Potansiyel Hidrojen Değeri
dk	:	Dakika
s	:	Saat

Kısaltmalar

$2^{-\Delta\Delta C_t}$	: Bağıl nicel yöntem
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDX	: Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi
EPPO	: Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi
g - Cu NP	: Yeşil sentez bakır nanoparçacık
ICP - MS	: İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi
IDT	: Integrated DNA Technologies
LC ₅₀	: %50 öldürücü konsantrasyon
LC ₉₀	: %90 öldürücü konsantrasyon
LSD	: En Az Anlamlı Fark
MNP	: Metal nanoparçacık
NP	: Nanoparçacık
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT - qPCR	: Kantitatif Eş Zamanlı PCR
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
TGA	: Termal Gravimetrik Analiz
<i>TgCAT</i>	: <i>Trogoderma granarium</i> Katalaz geni
<i>TgGPX</i>	: <i>Trogoderma granarium</i> Glutasyon peroksidaz geni
<i>TgSOD</i>	: <i>Trogoderma granarium</i> Süperoksit dismutaz geni
UV / Vis	: Ultraviyole / Görünür
YPR	: Yüzey Plazmon Rezonans
XRD	: X-Işını Kırınımı

1. GİRİŞ

Depo zararlıları (Dermestidae: Coleoptera) her yıl depolanan ürünlerin miktarında ve kalitesinde önemli bir azalmaya neden olmaktadır (Shivananjappa ve ark., 2020). Böcek öldürücülerin yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bu böcekler depolanmış tahılları, özellikle buğday tanelerini yok etmeye devam etmektedir. Depolanmış tahıllara verilen zarar gelişmiş ülkelerde yaklaşık %9, gelişmekte olan ülkelerde ise %30 civarındadır (Phillips ve Throne, 2010). 300'den fazla farklı türde depolanmış ürün zararlısı vardır, ancak bunlardan sadece 18'i yüksek ekonomik öneme sahiptir (Boyer ve ark., 2012).

Kapra böceği *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), kontrolünü zorlaştıran çeşitli fizyolojik özelliklere sahip bir tahıl zararlısıdır. İlk olarak Hindistan'da ortaya çıkan bu zararlı Afrika, Asya ve Avrupa'da birçok ülkede depolanan ürünlerin en tehlikeli zararlısı olarak kabul edilmektedir. *Trogoderma granarium* larvaları sıcaklık, bağıl nem, gıda eksikliği ve yüksek popülasyon yoğunluğuna bağlı olarak çeşitli olumsuz biyotik ve abiyotik koşullarda diyapoza girebilmektedir (Kavallieratos ve ark., 2019). Diyapoz, çeşitli faktörler nedeniyle böceklerin fizyolojik ve metabolik durumlarının geçici olarak kesintiye uğramasıdır. Bu durum, genetik olarak programlanmıştır ve diyapoza giren böcekler, büyük fizyolojik değişiklikler yoluyla olumsuz durumlara gelişimsel tepkiler verebilmektedir (Hahn ve Denlinger, 2007; Güz ve ark., 2014).

Depolanan ürün zararlılarını kontrol etmek için insektisit kullanmanın etkinliği ve sürdürülebilirliği, tarımsal ve depo zararlılarının başlıca insektisitlere karşı geliştirdiği direnç nedeniyle verimli olarak kullanılamamaktadır (Nayak ve ark., 2020). Hâlihazırda, insan sağlığına, ekosistemlere ve hedef olmayan organizmalara olan zararlarıyla ilgili endişeler nedeniyle birçok insektisitin kullanımı artık önerilmemektedir. Bu nedenle, çevreyi ve canlı organizmaları korumak için alternatif insektisitlere acilen ihtiyaç duyulmaktadır (Debnath ve ark., 2012). Geleneksel insektisitlerin, özellikle fumigantların kalıcı, aşırı veya uygunsuz uygulamaları, depolama zararlıları arasında önemli bir direnç gelişimine yol açmıştır. Dirençli zararlı türleri hızla yayılarak, bu durumun daha ciddi bir hâle gelmesine neden olmaktadır. Örneğin, bir insektisit çeşidi olan malathionun zararlı kontrolünde gelişigüzel ve yaygın kullanılması, *Trogoderma granarium* ve *Tribolium castaneum* gibi depolanmış ürün

zararlılarının bu insektisite karşı direnç kazanmasına neden olmuştur (Vivekanandhan ve ark., 2021). Bazı bölgelerde, depolanmış ürün zararlılarının çeşitli türlerinde fosfin direnci ortaya çıkmış ve bu da zararlı kontrolünde başarısızlıklara ve ekonomik zararlara neden olmuştur (Chaudhry, 1997). Günümüzde oldukça yaygın ve başarılı bir şekilde uygulanan zararlı kontrol yaklaşımları, *T. granarium* ile mücadelede yetersiz kalmaktadır. Örneğin, depo zararlılarını kontrol etmek için en etkili yöntemlerden biri olarak kabul edilen alüminyum fosfit, böcekte gelişen direnç nedeniyle artık %100 güvenilir değildir. Ayrıca, alüminyum fosfit gibi kimyasalların solunması, uygulayıcılar için bir sağlık riski hâline gelmiştir (Jasrotia ve ark., 2022).

Son zamanlarda, “nanoteknoloji” olarak adlandırılan bilimsel alanın, tarımsal ve depolanmış ürün zararlılarını kontrol etmek için umut verici, güvenilir ve alternatif yollar sunması beklenmektedir (Al-Esawy ve ark., 2021; Alavi ve ark., 2019; Chhipa, 2017; Jasrotia ve ark., 2022). Nanoteknoloji, aşağıdan yukarıya veya yukarıdan aşağıya yaklaşımlarla nano boyutta malzemelerin üretilmesidir ve bunlara nanoparçacık (NP) adı verilmektedir. Aşağıdan yukarıya yaklaşım, atomların 1 - 100 nm'lik bir ölçüm ölçeğinde toplanmasıdır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımda ise, bir maddenin kütlesi nano ölçekli formlarına indirgenir (Umer ve ark., 2012). Sentezlenen NP'ler, önceki formlarına kıyasla daha fazla kullanılabilirlik imkânı sağlayan benzersiz ve farklı özellikler kazanır (Alavi ve ark., 2019).

Çeşitli araştırmalardan elde edilen sonuçlar, NP'lerin gelecekte böcek zararlılarına karşı alternatif bir böcek kontrol ajanı olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Athanassiou ve ark., 2018a). Metal, metal oksit ve diğer NP türleri biyolojik, fiziksel ve kimyasal olarak sentezlenebilir. Sentezlenen nano metaller özel, benzersiz ve geliştirilmiş fiziksel, kimyasal ve biyosidal özellikler kazanır (Alavi ve ark., 2019). Örneğin, bakır sülfat ve bakır nitrat gibi bakır çözeltilerinin kütlesi nanoformlara indirgendiğinde, oldukça iletken ve biyosidal özellikler elde ederler. Fiziksel ve kimyasal yöntemler, pahalı ekipman, tehlikeli reaktifler ve NP'leri indirmek ve stabilize etmek için gereken aşırı enerji nedeniyle biyolojik yöntemlere kıyasla daha az tercih edilen yaklaşımlardandır (Akintelu ve ark., 2020).

Yeşil veya biyolojik sentez yaklaşımları, canlı organizmalar veya bileşenleri, NP'lerin sentezinde indirgeyici ve stabilize edici ajanlar olarak kullanmaktadır (Mittal ve ark., 2013). Bu yöntem uygun fiyatlı, etkili ve çevre dostudur. Bakır nanoparçacıkları (Cu NP'ler),

biyolojik sentez yaklaşımı ile çeşitli bitki ekstraktları kullanılarak başarıyla sentezlenmiştir (Din ve Rehan, 2017). NP'lerin sentezi için kullanılan biyolojik ajanlar arasında bakteri, siyanobakteriler (Zhang ve ark., 2020), mantarlar (Khan ve ark., 2022), mayalar (Gahlawat ve Choudhury, 2019), algler (Varshneyet ve ark., 2012) ve bitkiler (Letchumanan ve ark., 2021) bulunmaktadır.

Piper retrofractum (Amaliyah ve ark., 2020), *Cissus itiginea* (Wu ve ark., 2020) ve *Thymus vulgaris* (Nasrollahzadeh ve ark., 2016) gibi çeşitli bitki özlerinin, NP'lerin yeşil sentezinde verimli, toksik olmayan ve çevre dostu özellikte olduğu ifade edilmiştir. pH, sıcaklık, bakır kaynağı ve konsantrasyonu, ekstrakt konsantrasyonu ve reaksiyon süresi NP sentezini etkileyen faktörlendendir (Akintelu ve ark., 2020). Sentezlerde NP'lerin oluşumu ilk olarak renk değişiminin gözlemlenmesi, ardından Ultraviyole / Görünür bölge Spektrofotometre (UV-Vis) analizi ile yüzey plazmon rezonans (YPR) pikinin belirlenmesi ile gösterilmektedir. NP'lerin oluşumundan sorumlu fonksiyonel grupları ortaya koymak için Fourier dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizi yapılmaktadır. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) gibi mikroskopik teknikler de NP'leri görüntülemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Umer ve ark., 2012).

NP'lerin böcek ölümüne neden olduğu, bioassay çalışmaları ile ortaya koyulmuş olmasına rağmen, altında yatan mekanizmalara dair kısıtlı sayıda çalışma vardır. NP'lerin balıklarda enflamasyona, epitel dokuda nekroza, ödem oluşumuna ve pulların dökülmesine neden olduğu gösterilmiştir. Yukarıdaki koşullara yanıt olarak, tümör nekroz faktörleri, programlanmış hücre ölümü, enflamasyon ve diğer immün yanıt veren genlerin, yüksek seviyelerde ifade edildikleri görülmüştür (Abdel-latif ve ark., 2021). Ek olarak, oksidatif stresle ilgili genlerin, Isı Şok Proteinlerinin (Heat Shock Proteins: HSPs) ve Kaspaz genlerinin artan ifadesi de NP'lerin etkisini ortaya çıkarmıştır (Abdel-latif ve ark., 2021). Karboksilesterazlar, Sitokrom P450'ler, amilaz, HSP ve katalaz, çeşitli ksenobiyotikler tarafından sıklıkla uyarılan bir gen grubuna aittir ve bunların aşırı ifadesi insektisit direncine yol açmaktadır (Amezian ve ark., 2021; Enayati ve ark., 2005; Wang ve ark., 2018).

Bu çalışmada Cu NP'ler yeşil sentez yaklaşımı (g (green) - Cu NP) ile *Origanum* sp. ekstraktı kullanılarak sentezlenmiştir. Bitki ekstraktı, kaplama maddesi olarak verimli bir şekilde kullanılmıştır. g - Cu NP'lerin insektisit etkisi *T. granarium*'a karşı bioassay yöntemi

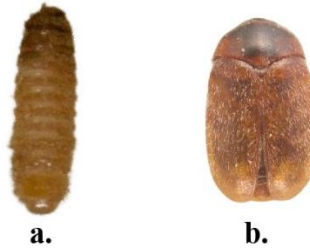
kullanılarak araştırılmıştır. *T. granarium*'a ait Süperoksit dismutaz (*TgSOD*), Katalaz (*TgCAT*) ve Glutasyon Peroksidaz (*TgGPX*) isimli üç adet detoksifiye edici genin ifade seviyeleri, g - CuNP'lerin insektisit aktivitesini araştırmak için RT – qPCR yoluyla analiz edilmiştir. Biyoassay ve gen ifade analizi çalışmaları sonucunda, g - Cu NP'lerin, günümüzde mücadele edilmesi bir hâyli zor olan *T. granarium*'a karşı insektisit etkinliği ortaya çıkarılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Trogoderma granarium* (Kapra böceği)

2.1.1. *Trogoderma granarium*'un Biyolojisi

Kapra böceği, *Trogoderma granarium* (Şekil 2.1.), çeşitli depolanmış tahıl taneleriyle beslenmekte ve en zararlı 100 istilacı böcek türü arasında sınıflandırılmaktadır (Athanassiou ve ark., 2019). Kapra böceği, EPPO (Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü) tarafından karantina böceği olarak kabul edilir (EPPO Veritabanı, 2021). Bu zararlı ilk olarak Hindistan alt kıtasında rapor edilmiş, daha sonra Afrika, Avrupa, Orta Doğu, Avustralya ve Amerika dâhil olmak üzere çeşitli bölgelerin sıcak ve kurak bölgelerinde yayılım göstermiştir. Örneğin, Hindistan, bu karantina zararlısı nedeniyle Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Çin'den gelen yasaklarla karşı karşıya kalmıştır (Yadav ve ark., 2022). ABD, Kanada ve Avustralya dâhil olmak üzere birçok ülkede *T. granarium*'un yayılmasını önlemek için, katı karantina önlemleri uygulanmaktadır (Morrison ve ark., 2020). Dünya Ticaret Örgütü Komitesi, bu zararlının yayılmasını önlemek için buğday ve diğer depolanmış tahıllarda kontamine olmuş ürünlerin ithalatını kısıtlamaktadır (Athanassiou ve ark., 2019).

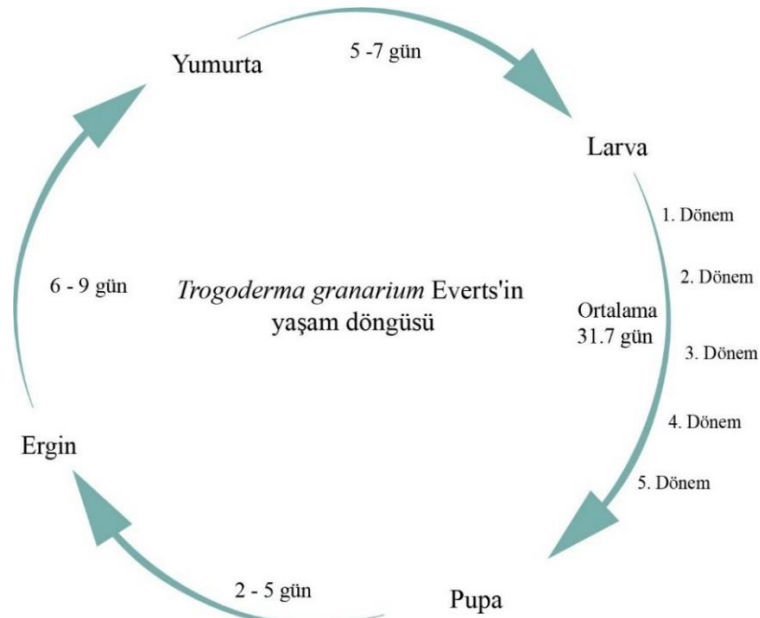


Şekil 2.1 . Kapra böceği larvası (a.) ve ergini (b.) (New South Wales Department of Primary Industries, Ağustos - 2022).

Sıcaklık ve bağıl nem *T. granarium*'un yaşam döngüsünde çok önemli bir rol oynamaktadır. Böceğin gelişiminde optimum sıcaklık 35 °C, bağıl nem ise %65 seviyesindedir (Rizwan ve ark., 2018). Kapra, diğer depolanmış ürün böcekleri ile birlikte yetiştirildiğinde, rekabetçi doğası ve diğer spesifik özellikleri, bu böceği diğer zararlılardan

daha baskın ve başarılı kılar. Bu tür, nem içeriği %2'den düşük olan birçok depo tahılını istila edebilir. Hatta, popülasyonun miktarını geniş bir sıcaklık aralığında çoğaltması ile diğer zararlılardan kolaylıkla ayırt edilebilir (Athanassiou ve ark., 2019).

T. granarium'un yumurtadan ergine kadar süren yaşam evresindeki görünümü, döngü içindeki değişen özellikleri, metamorfoz ile karakterize edilir (Athanassiou ve ark., 2019). Gupta ve Kataria (2014) tarafından Kapra böceğinin üreme verimliliği ve uzun ömürlülüğü üzerine yapılan bir araştırma, Kapra böceğinin yaşam döngüsünü 45 - 50 gün içinde tamamladığını göstermiştir (Şekil 2.1). Pupadan erginlerin çıkmasından sonra, 2 - 3 gün içinde çiftleşme gerçekleşmekte ve dört gün süre ile yumurta bırakma işlemi sürmektedir. Tek bir dişi 58 adede kadar yumurta bırakabilirken, çoklu çiftleşme yeteneği sayesinde bu sayı 130'u bulabilmektedir. Bırakılan yumurtalardan 5 - 7 gün içerisinde birinci dönem larvalar ortaya çıkar. Boyları 1 mm ile 5.7 mm arasında değişen Kapra böceği larvaları, sıcaklığa bağlı olarak 4 - 8 larva dönemi geçirirler. Örneğin, birinci dönem larvanın beşinci dönem larvaya ulaşması ortalama 31,7 gün sürer ve larva son dönemi takiben pupaya girer. Pupalar yaklaşık beş gün sonra ergin bireylere dönüşür ve çiftleşme süreci başlar (Gupta ve Kataria, 2014). Kapra böceğinin larva gelişim dönemleri, henüz aydınlatılamamış mekanizmaları nedeniyle en zararlı ve kontrol edilmesi zor olan dönemidir (Athanassiou ve ark., 2019; Wakil ve ark., 2021).



Diğer depolanmış ürün böceklerinin aksine, Kapra böceği zorlayıcı koşullarda dâhi uzun süre varlığını sürdürebilir. Bu kapasite, beşinci dönem larva aşamasında isteğe bağlı bir diyapoz (fakültatif diyapoz) durumuna girme yeteneği ile sağlanmaktadır. Optimal koşullara bağlı olarak, son dönem larvalar, daha sonra erkek ve dişi erginler olarak çıkacakları “pupa” adı verilen bir aşamaya girerler. Besin yokluğunda beşinci dönemdeki larvalar “diyapoz” adı verilen kesintiye uğramış bir fizyolojik ve metabolik duruma girerler ve 6 yıla kadar beslenmeden yaşayabilirler. Besin yokluğunun dışında diyapoz oluşumuna en fazla neden olan diğer tetikleyici unsurlar arasında düşük / yüksek sıcaklık, insektisit uygulanması, feçal kalıntılar, yüksek nüfus yoğunluğu ve nem bulunmaktadır (Lindgren ve Vincent, 1959; Burges, 1963; Stanic ve ark., 1963; Bell ve ark., 1984; Wilches ve ark., 2016). Fotoperiyot da diyapoz durumunu düşük seviyede tetikleyen etkenlerdendir. Sıcaklık, bağıl nem ve besin mevcudiyeti optimum şekilde sağlandığında, diyapoz doğal olarak sonlanmaktadır (Athanassiou ve ark., 2019). Diyapoz, bu zararlının uluslararası ticaret yoluyla yayılmasına ve insektisit uygulamalarından etkilenmemesine katkıda bulunmuştur. Böylece yayılmanın çeşitli alanlarda genişleyen istilalarla sonuçlanmasına sebep olmuştur (Nair ve Desai, 1972).

2.1.2. *Trogoderma granarium*'un ekonomik önemi

Coleoptera'dan yaklaşık 600, Lepidoptera'dan yaklaşık 70 ve akarlardan yaklaşık 355 tür dâhil olmak üzere yaklaşık 1000 tür zararlı, depolanan tahıllarda miktar ve kalite kaybına neden olmaktadır (Jasrotia ve ark., 2022). Tarım ürünlerinin hasat sonrası bir mevsimden diğerine depolanması, eski insan uygulamalarından biridir. Böcekler, akarlar ve keneler de dâhil olmak üzere depo zararlıları, tahıl, baklagiller, sebze tohumu, pamuk, mısır, fındık vb. gibi tarımsal ürünlerinin miktarına ve kalitesine ciddi şekilde zarar vermektedir. Örneğin Kapra böceği, incir, kuru üzüm, şeftali, kuru erik, hurma, manyok cipsi, yumurtalı erişte, ölü böcekler ve diğer hayvansal ürünler olmak üzere, 100'den fazla depolanmış ürün çeşidini istila eder (Christos ve ark., 2019; Yadav ve ark., 2022).

Depolanmış ürün zararlılarından kaynaklanan hasat sonrası kayıplar, mahsul ekonomisine dolaylı ve doğrudan kayıplar olarak katkı sağlamaktadır. Bu zararlılar, depolanan tahılların nem içeriğini ve sıcaklığını değiştirerek antibiyotiğe dirençli patojenik

mikroorganizmalara ev sahipliği yapmakta ve patojenezde konakçı olabilmektedir. Ayrıca bıraktıkları doku parçaları, kabuklar ve atıklar sebebiyle depolanan ürünlere ve bunlardan beslenen canlılara zarar verirler (Hamel ve ark., 2020; Jasrotia ve ark., 2022). Tahılların Kapra zararlısı ile istilası, glüten, vitaminler, yağlar ve şekerler gibi besin içeriklerine doğrudan büyük zarar vermektedir. Depolanan tahıllardaki Kapra böceği kaynaklı kayıp bazen %73'e kadar çıkmakta ve ortalamada ise %6 – 33 arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Kapra böceği, tahıllarda bıraktığı zararlı ve allerjen etkili atıklarla sağlıkla ilgili sorunların yanı sıra, mahsul ve ticaret kısıtlamalarına neden olarak, ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Yadav ve ark., 2022). Prasad ve ark. (1997) buğday tanelerinin %15 Kapra böceği ile kontaminasyonunun, tanelerde mevsimsel depolama sırasında sırasıyla %2,6 ve %24 civarında ağırlık ve canlılık kaybına neden olduğunu göstermiştir (Yadav ve ark., 2017).

Kapra böceğinin tahıl kabuğunun içinde kamufle olması, yumurtalarının çıplak gözle görülmemesi, larvaların oyuklarda saklanması gibi özellikleri, böceğin tespitini ve kontrolünü son derece zorlaştırmaktadır (Christos ve ark., 2019b; Boyer ve ark., 2012; Hamel ve ark., 2020). Kapra böceğinin tespiti için çeşitli tanımlama yöntemleri kullanılmıştır. Örneğin, stereomikroskop, morfolojik tanımlama tekniklerine dâhil edilmiştir. Bu zararlının tanımlanmasında immünolojik ve moleküler tekniklerin kullanıldığı da bildirilmiştir (Yadav ve ark., 2022). Günümüzde *T. granarium*'u kontrol etmek için kullanılan yaklaşımlar arasında yüksek ve düşük sıcaklık uygulaması, radyasyon, modifiye atmosfer, botanik ürünler, biyolojik ajanlar, böcek büyüme düzenleyicileri ve böcek öldürücüler bulunmaktadır (Athanassiou ve ark., 2019).

2.2. *Origanum* sp.

Origanum sp. Lamiaceae familyasına ait çok yıllık bir bitkidir ve Asya, Avrupa ve Kuzey Afrika'da yetişmektedir. Bu aromatik bitki, birçok mutfakta ve geleneksel tıpta oldukça yaygın kullanılmakta olup ve eşsiz aroması nedeniyle Türkiye'de en çok kullanılan baharatlardan biridir (Kourimská ve ark., 2016; Marrelli ve ark., 2018). *Origanum* sp. terpenler, bisiklik monoterpenler, uçucu yağ, fenolik bileşikler, flavanonlar, flavonoidler,

rosmarinik asit, karvakrol, benzoik asit, tokoferoller ve sinnamik asit türevleri dahil olmak üzere biyoaktif maddeler bakımından zengindir (Atar ve Hatice, 2020, Marrelli ve ark., 2018). Uçucu yağlar, çeşitli bitki bileşenlerinden elde edilen uçucu, kokulu, kokulu - yağlı sıvılardır (Leyva-López ve ark., 2017). Carvacrol, thymol, c-therpinene ve p93 simen, *Origanum* sp.'deki uçucu yağların aktif bileşiklerini oluşturur (Jouki ve ark., 2014). Bu bileşikler mükemmel insektisidal aktiviteye sahiptir. Örneğin, karvakrol, timol ve terpinenin, gıda kaynaklı hastalıkların bulaşmasından sorumlu olan *Calliphora vomitoria* L. erginlerine karşı önemli insektisidal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Bedini ve ark., 2021). Ayrıca geniş bir antibakteriyel, antifungal, antioksidan ve antiviral aktiviteye sahiptir. *Origanum* uçucu yağlarının bu özellikleri, bu bitkiyi gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde oldukça değerli bir bitki hâline getirmektedir (Jouki ve ark., 2014; Leyva-López ve ark., 2017).

2.3. Nanoparçacıklar

Yunanca "cüce" anlamına gelen "Nano" kelimesi, milyarda biri (1×10^{-9}) temsil etmektedir. Nanoparçacıklar (NP'ler), 1 - 100 nm boyut aralığındaki parçacıklardır; büyük parçalı malzemeler bu boyut aralığına indirildiğinde olağandışı fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikler kazanırlar (Verma ve Kumar, 2019). Küçük boyutlarından dolayı sahip oldukları büyük yüzey alanı/hacim oranı, onları biyotıp, kataliz, elektronik ve nanot taşıyıcı olarak oldukça uygulanabilir kılar. Ayrıca antimikrobiyal, insektisit, antikanser ve ilaç taşıyıcı ajanlar olarak kullanım alanları bulunmaktadır (Gnanasangeetha ve Suresh, 2020).

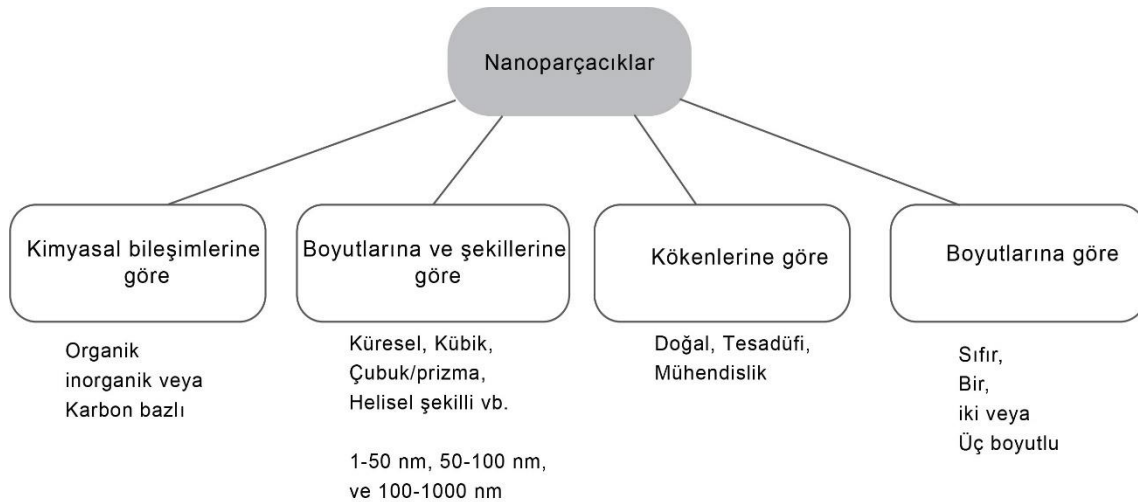
2.3.1. Nanoparçacıkların sınıflandırılması

NP'ler kimyasal bileşimlerine, boyut ve şekillerine, kökenlerine, morfolojilerine, vb. göre çeşitli sınıflara ayrılmaktadır (Şekil 2.2). Kökenlerine göre doğal, tesadüfi veya mühendislik ürünü NP'ler olarak sınıflandırılırlar; ancak bunların tüm türleri ayrıca organik, inorganik ve karbon bazlı nanoparçacıklar olarak kategorize edilebilmektedirler (Din ve Rehan, 2017; Gnanasangeetha ve Suresh, 2020; Khan ve ark., 2022; Ealia ve Saravanakumar, 2017). Doğal NP'ler en yaygın olarak doğada ultra ince parçacıklar olarak bulunur. Bu tür NP'ler, fırtına, volkanlar, orman yangınları, uzay ve kristal yapılardan meydana gelebilmektedir. Güç üretimi, motor egzozu, malzeme kaynağı, gıda işleme, sigara dumanı

ve bina gibi istenmeyen yan ürünler olarak üretilen NP'lere “tesadüfi NP’ler” denilmektedir. Tasarlanmış NP'ler ise, belirli özelliklerde iyileştirmeler sağlamak için yapay olarak üretilmiş NP'lerdir (Khan ve ark., 2022).

Tüm NP'lerin en az bir boyutu olduğu kabul edilir. 0, 1, 2 ve 3 boyutlu yapılar nano boyut türleridir. Kuantum noktalarının belirli bir uzunluğu, genişliği ve yüksekliği yoktur; bu nedenle, tek bir noktada sabitlenmiş boyutsuz NP'lerdir. Küçük boyutlarından dolayı bunlara “0 boyutlu” denilmektedir. Tek boyutlu NP'ler, grafen gibi yalnızca bir parametreye sahip olanlardır. Karbon nanotüpler gibi iki boyutlu NP'ler uzunluk ve genişliğe sahipken, altın nanoparçacıklar gibi üç boyutlu NP'ler üç parametrenin hepsine sahiptir: uzunluk, genişlik ve yükseklik (Din ve Rehan, 2017; Ealia ve Saravanakumar, 2017).

Nanomalzemeler boyutlarına göre 1 - 50 nm, 50 - 100 nm ve 100 - 1000 nm olarak sınıflandırılır. Kategorizasyon, sırasıyla ultra ince dağılma, yüksek dağılma ve tortul özelliklerine dayanmaktadır (Strambeanu ve ark., 2015). Morfolojilerine göre yine küresel, üçgen, kübik, oval biçimli, prizma biçimli, çubuk biçimli, tüp biçimli, spiral ve diğer biçimler olarak sınıflandırılırlar. Ayrıca çeşitli içsel kristal formlara sahip olabilirler. Kristal formlar arasında basit kübik, ikosahedron, dekahedron, farklı kübik yüzler ve daha birçokları bulunur (Khan ve ark., 2022).



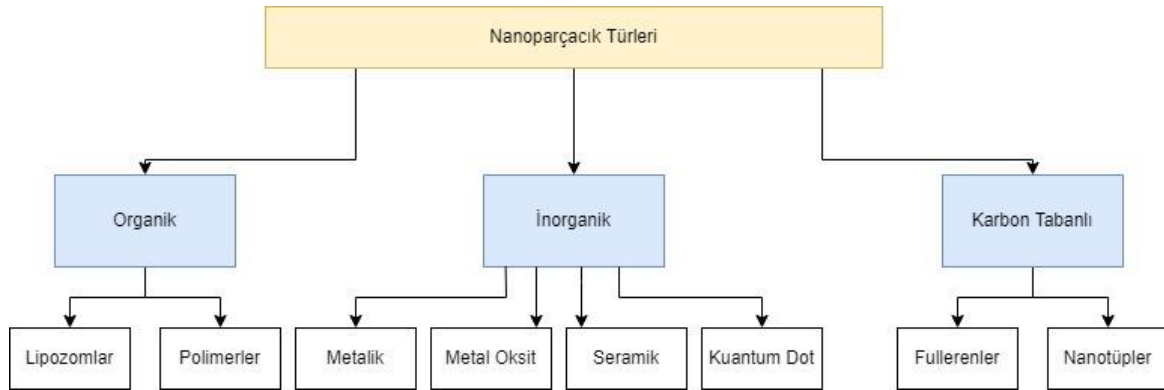
Şekil 2.3. Farklı özelliklerine göre nanoparçacıkların genel sınıflandırılmaları

Köken, boyut, büyüklük ve şekle dayalı sınıflandırmalarının yanı sıra, NP'ler kimyasal bileşimlerine göre organik, inorganik ve karbon bazlı NP'ler olarak sınıflandırılır (Şekil 2.3). Organik kimyasal bileşim kategorisindeki NP'ler arasında lipozomlar, polimerler, dendrimerler vb. bulunur. Bunlar, ilaç dağıtım sistemlerinde ve nano taşıyıcılarda biyomedikal uygulamalarda en yaygın olarak kullanılan NP'lerdir (Mauricio ve ark., 2018).

Öne çıkan iki karbon bazlı NP grubu fullerenler (sırasıyla 7.114 ve 7.648 nm çapa sahip C60 ve C70) ve 1-2 nm çapa sahip karbon nanotüplerdir. Verimli elektriksel iletkenlikleri, yüksek mukavemetleri, yapıları, elektron afiniteleri ve uyarlanabilirlikleri nedeniyle önemli bir ticari ilgi uyandırmışlardır. Ayrıca nanokompozit dolgu maddeleri, gaz adsorbanları ve çeşitli inorganik ve organik kataliz için destek ortamları olarak kullanılırlar (Khan ve ark., 2019).

İnorganik tipler, metal, metal oksitler, bimetalik ve seramik NP'ler gibi metalik elementlerden sentezlenen bir grup NP'dir. Biyolojik, tıbbi, tarımsal ve teknolojik alanlardaki geniş uygulamaları nedeniyle, metal ve metal oksit NP'leri, araştırmaların dikkat çeken bir odak noktasıdır. Yıkıcı (azaltarak) veya yapıcı (birleştirerek) yaklaşımlar, 1 ila 100 nm arasında değişen boyutlarda metal nanoparçacıklar (MNP'ler) yapar. Bakır (Cu), Bakır oksit (CuO), Gümüş (Ag), Altın (Au), Paladyum (Pd) ve Çinko Oksit (ZnO) gibi hemen hemen tüm metalik elementlerin nanoparçacık hâli sentezlenebilir. Oksijensiz bir ortam altında gerçekleştirilmediği sürece, bahsedilen MNP'lerin bazıları metal oksit NP'lerine dönüşür. Bu durum, ilgili MNP'lerin özelliklerini değiştirerek bazen onlara artan reaktivite gibi istisnai özellikler verir (Ealia ve Saravanakumar, 2017).

Cu ve CuO NP'ler gibi metal NP'ler, özellikle yeşil sentezlenmiş olanlar, olası tarımsal, biyomedikal ve endüstriyel uygulamaları nedeniyle çeşitli alanlarda büyük ilgi görmüştür.



Şekil 2.4. Kimyasal bileşimlerine göre nanoparçacıkların sınıflandırılması (Mauricio ve ark., 2018).

2.3.2. Nanoparçacıkların sentez yöntemleri

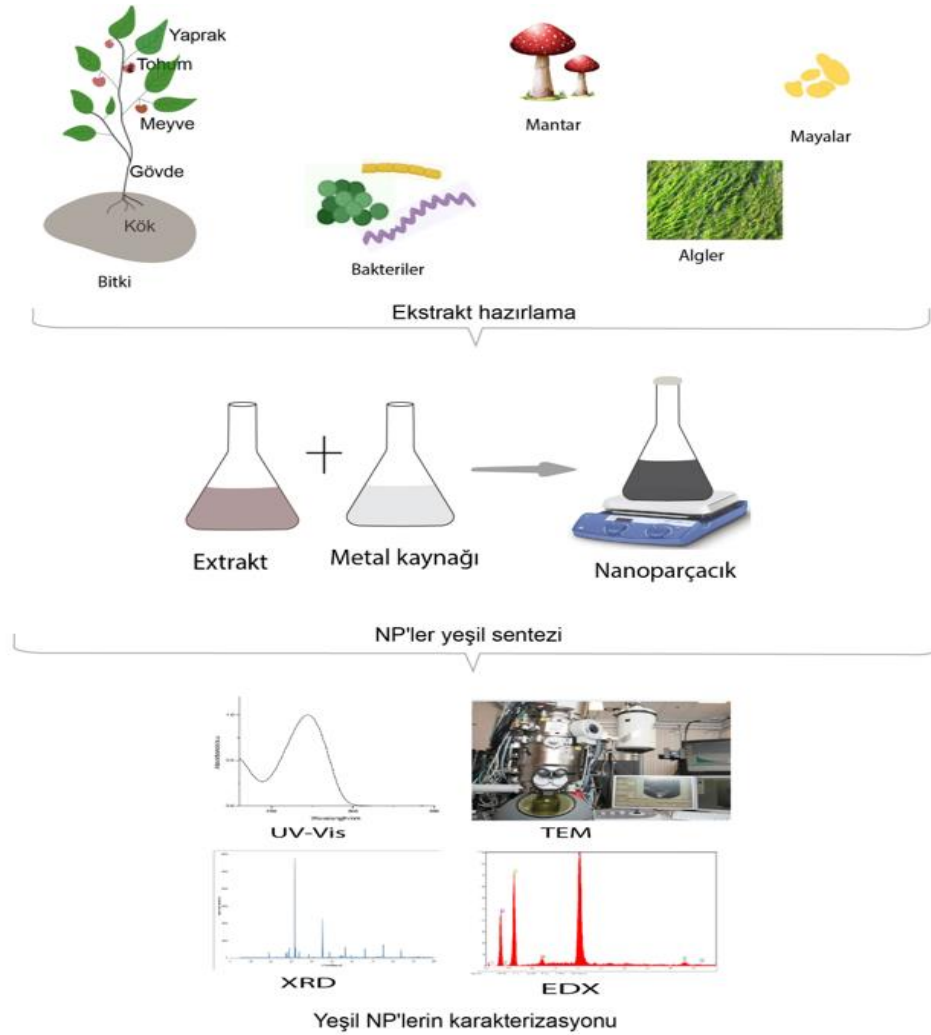
NP'lerin sentezi, metal iyonlarının monovalent durumlarına indirgenmesini, indirgenmiş metallerin aglomerasyonunu ve aglomeratların kaplanmasını içeren üç aşamada gerçekleşir (Verma ve Kumar, 2019). NP'leri sentezlemek için kullanılan yöntemler genellikle aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya yaklaşımlara ayrılır. Aşağıdan yukarıya, NP'lerin atomlardan oluşturulması ve yukarıdan aşağıya ise bir parçacığın kütesinin 1 - 100 nm ölçeğine indirgenmesidir. Bütün bunlar fiziksel, kimyasal ya da biyolojik yöntemlerle gerçekleştirilir.

2.3.2.1. Nanoparçacıkların yeşil sentezi

Bakteri özleri (El-Saadony ve ark., 2020), maya (Gao ve ark., 2018), bitkiler (Kamli ve ark., 2021), algler (siyanobakteriler) ve mantarlar (Khan ve ark., 2022) yeşil sentez yaklaşımında NP'lerin üretimi için etkin bir şekilde kullanılmıştır. Bu biyolojik ajanların ekstraktlarının nanosentezde kullanılması son zamanlarda ilgi çekici bir araştırma alanı hâline gelmiştir. Sentezlenen NP'lerin çoğu, uygulanabilirlikleri açısından test edilmiş ve farklı alanlarda dikkate değer sonuçlar vermiştir. Biyolojik ajanlardan NP'lerin sentezi ve karakterizasyonu Şekil 2.4'te gösterilmektedir. Yeşil sentez yaklaşımında, pH, reaksiyon süresi, sıcaklık, kristal konsantrasyonları ve bitki ekstraktının doğası gibi farklı parametreler, NP'lerin boyut ve morfolojisinde farklılıklar ortaya çıkarmaktadır. NP oluşumları, UV -

Görünür bölge, TEM, SEM, XRD ve FTIR dâhil olmak üzere farklı analitik teknikler kullanılarak doğrulanabilir (Gnanasangeetha ve Suresh, 2020).

Biyolojik ajanların tercih edilme nedenleri arasında çevresel güvenlik, verimlilik, işlenebilirlik ve NP'lerin bol miktarda elde edilebilmesi sayılabilir (Badawy ve ark., 2021). Biyolojik ajanlar arasında en çok tercih edileni bitkilerdir. Bitkiler, birincil ve ikincil metabolitlerin önemli kaynaklarıdır. Polisakkaritler, proteinler, amino asit kalıntıları, saponin, flavonoidler, terpenoidler ve fenolik bileşenler gibi bitki metabolitleri, NP sentezinde önemli bir rol oynamaktadır (Gnanasangeetha ve Suresh, 2020). Yapılan çalışmalarda, farklı fiziksel ve kimyasal parametrelere sahip Cu NP'leri üretmek için farklı bitki ve bitki parçacıklarından bitki özleri kullanılmıştır. Bitkilerin biyolojik ajan olarak kullanımı, bakteri ya da mantarlarda olduğu gibi özel kültürleme, izolasyon veya karakterizasyon teknikleri gerektirmediği için üretim maliyetini azaltmaktadır (Gnanasangeetha ve Suresh, 2020).



Şekil 2.5. Nanoparçacıkların yeşil sentezi ve karakterizasyonu

Origanum sp. bitkisinin ekstraktı, farklı NP'lerin sentezinde, metalleri indirgemek ve kaplamak amacıyla birçok çalışmada kullanılmıştır. Bunlar arasında Gümüş NP'ler (AgNP'ler) (Renu ve ark., 2013), Altın NP'ler (AuNps) (Benedec ve ark., 2018), Paladyum NP'ler (Pd NP'ler) (Rafi Shaik ve ark., 2017), Titanyum dioksit NP'ler (TiO₂ NP'ler) (Bahmani, 2019) ve Çinko oksit NP'ler (ZnO NP'ler) (Luque ve ark., 2022) bulunmaktadır. g - Cu NP'ler, çeşitli bitki ekstraktları kullanılarak sentezlenmiştir; ancak *Origanum* sp. kullanılarak sentezlenen Cu NP'ler literatürde kısıtlı sayıda bulunmaktadır (Sankar ve ark., 2014; Aguilar ve Rosas, 2019; Alshehri ve Malik, 2020). Dahası, *Origanum* sp. ekstraktından sentezlenmiş Cu NP'lerin, herhangi bir böcek zararlısına karşı insektisit etkisini araştırmak üzere gerçekleştirilmiş bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

g - Cu NP'ler yeşil sentez yolu ile ilk olarak manolya bitkisinden başarılı bir şekilde üretilmiştir (Lee ve ark., 2011). Daha sonra *Artabotrys odoratissimus* (Kathad ve Gajera, 2014), *Citrus medica* (Shende ve ark., 2015), *Azadirachta indica* (Nagar ve Devra, 2018) ve *Beta vulgaris* (Chandrasekaran ve ark., 2020) dâhil olmak üzere farklı türlerdeki bitkilerden Cu ve CuO NP'lerin sentezi gerçekleştirilmiştir.

2.3.3. Cu Nanoparçacıklar ve Özellikleri

Cu NP'ler, alkali ve soy metal NP'lere kıyasla, düşük maliyetleri, kolay ulaşılabilirlikleri ve basit reaksiyon koşulları nedeniyle daha çok tercih edilirler. Sulu ortamda, g - Cu NP'ler, CuO NP'lere oksidasyon ile dönüşme eğilimindedir. Yüzeydeki oksit tabakaların üretimi (Cu oksitler) termodinamik olarak saf Cu metalinden daha karardır. Ayrıca, iyi korunmadığında g - Cu NP'lerin bir araya gelerek agregasyona neden olduğu görülmüştür. Polivinil alkol, polietilen glikol, polivinil pirolidon polimerleri ve organik ligandlar gibi çeşitli koruyucu maddeler, agregasyon ve oksidasyon problemlerinin üstesinden gelmek için kullanılabilmektedir (Rajesh ve ark., 2016).

Cu bazlı NP'ler, yüksek reaktiviteleri, katalitik aktiviteleri, verimli sensörleri, ayrıca mikropalara, kanser hücrelerine, zararlı böceklerle karşı biyosidal özellikleri nedeniyle en çok tercih edilen NP'lerdir. Bu özellikler onları nanotıpta enfeksiyon kontrolünde ajan olarak (Verma ve Kumar, 2019) ve zararlı yönetiminde nanopestisitler olarak kullanılmalarına, optik cihazlar, yarı iletkenler ve nanoakışkanlar üretiminde yer almalarına imkân sağlar (Velsankar ve ark., 2022). Ayrıca çay, muz, narenciye ve kahve gibi çeşitli bitkileri mantarlardan, yaprak ve meyve hastalıklarından korumak için CuO kullanılmıştır (Rai ve ark., 2018).

Badawy ve ark. (2021), *Aspergillus niger* suşu (G3-1) ile sentezlenen CuO NP'lerinin, belirli buğday böceklerine karşı kayda değer bir insektisidal etkinlik gösterdiğini göstermiştir. Sentezlenen CuO NP'ler boyutları 14.0 ile 47.4 nm arasında değişiklik göstermiştir. CuO NP'lerin insektisit olarak uygulanması ile *Sitophilus granarius*'da %55 - 94.4 ve *Rhyzopertha dominica*'da ise %70-90 oranlarında ölüm kaydedilmiştir. CuO NP'ler

ayrıca zararlı Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin güçlü bir inhibitörü olarak görev yapmıştır. CuO NP'ler ile etkili bir şekilde kontrol edilen bakteriler arasında *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* bulunmaktadır (Vinothkanna ve ark., 2022).

Cu NP'ler elektro ve fotokatalizde, su kirleticilerinin uzaklaştırılmasında, güneş pillerinde, biyodizel gibi alanlarda kullanılmaktadır (Sukumar ve ark., 2020). Cu bazlı NP'ler, zararlı bozunmayan boyaları kaldırarak daha temiz bir ortam oluşturmaya yardımcı olabilir. Örneğin, CuO NP'ler, oda sıcaklığında Kongo kırmızısı, Metilen mavisi vb. gibi boyaların indirgenmesinde dikkate değer ölçüde katalitik aktivite göstermiştir. Bu NP'lerin kolayca geri kazanıldığı ve aynı verimlilikte 6 döngüye kadar yeniden kullanıldığı bulunmuştur. Bu nedenle, CuO NP'ler zararlı boyaları azaltarak daha temiz ortamları meydana getirmede çok fazla potansiyele sahiptir (Manjari ve ark., 2017). Bunun yanı sıra, g - CuO NP'ler, malakit yeşil boyasını azaltarak katalitik aktiviteler de sergilemiştir (Dobrucka, 2018).

2.3.4. Nanoparçacıkların uygulama alanları

NP'ler biyoloji, tarım, biyotıp, çevresel iyileştirme, elektronik ve enerji sektörleri gibi alanlarda sunabilecekleri sayısız potansiyel pratik uygulamalar nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Çeşitli yöntemler kullanılarak sentezlenen NP'ler, potansiyel uygulamaları için kapsamlı bir şekilde çalışılmış ve araştırılmıştır. Ayrıca, çevresel olarak güvenli olmayan ve insanlar ile diğer su ve toprakta bulunan yaşam formları için yaşamı tehdit eden standart tarım kimyasallarının kullanımlarının yerini alma potansiyeline sahiptirler (Abd-Elsalam, 2022). Cu, Au ve Ag NP'ler bu konuda kapsamlı olarak incelenen NP'ler arasındadır ve tarımsal zararlıların kontrolü ve bitki koruma alanlarında potansiyel uygulama imkânı sundukları bilinmektedir.

2.4. Güvenilir ve Çevre Dostu Alternatif Pestisit İhtiyacı: Nanopestisitler

Pestisitler, tarımsal zararlılar ile mücadelede çok önemli bir rol oynamalarına rağmen, direnç gelişimi ciddi ve devam eden küresel bir sorun hâlini almaktadır (Vivekanandhan ve

ark., 2021b). Depo zararlılarını kontrol etmede önemli ölçüde kullanılan melatonin, diklorvos, Pirimiphos-metil ve fumigant metil bromür gibi birçok pestisit yasaklanmıştır (Hamel ve ark., 2020). Asya'da *R. dominica*, *S. oryzae*, *Cryptolestes ferrugineus* ve *T. granarium* (Everts) popülasyonları, insektisitlere karşı güçlü direnç geliştirmiş birkaç böcek türü arasında belgelenmiştir (Hamel ve ark., 2020). Toprakta ve suda yüksek miktarlarda zirai kimyasal kirleticilerin birikmesi ise, geleneksel pestisit kullanımının getirdiği başka bir sorundur (Mohamed ve ark., 2022). Öte yandan, 2030 yılına kadar kimyasal pestisit kullanımı ve riskini yarı yarıya azaltmak için aralıksız bir çaba vardır (Hamel ve ark., 2020).

2.4.1. Tarımda bitki koruyucu olarak nanoparçacıklar

Virüsler, bakteriler, mantarlar, nematodlar ve böcek zararlıları gibi bitki hastalıklarına neden olan ajanların, gıda mahsullerinin üretim verimliliğinde %10 ila 40'lık bir azalmaya neden olduğu tahmin edilmektedir (Mohamed ve ark., 2022). NP'lerin yabancı otlar, böcekler, keneler ve akarları kontrol etmede potansiyel kullanımları beklenmektedir. Ayrıca NP'ler gübre, insektisit taşıyıcı ajanlar, besin ve su emilimini artırıcı ajanlar olarak da kullanılabilirler (Koul, 2019). Yakın zamanda, pirinç biti (*Sitophilus oryzae* L.), kırmızı un böceği (*Tribolium castaneum* Herbst.) ve börülce böceği (*Callosobruchus maculatus* F.) gibi depolanmış ürün böceklerinin kontrolü üzerindeki ZnO ve SiO₂ NP'lerinin toksisitesi üzerine gerçekleştirilen bir çalışma, sırasıyla %81,6, %98,3 ve %58,3 ölüm oranı ortaya koymuştur (Haroun ve ark., 2020). NP'ler, kimyasalların çözünürlüğünün artması, düşük doz gereksinimleri ve pestisit bileşenlerinin kontrollü salınımı dâhil olmak üzere, geleneksel pestisitlere göre çok sayıda avantaja sahiptir (Jasrotia ve ark., 2022).

NP'lerin bir başka potansiyel uygulama alanı da nano gübrelerin geliştirilmesidir. Nanogübreler, nitrojen, fosfor, potasyum gibi makro ve mikro bitki besin nanoformlarıdır ve ekinlere düzenli bir şekilde sağlanmaktadır (Mejias ve ark., 2021). Nanogübrelerde besinler, tek başına veya kombinasyon hâlinde, besinleri standart gübrelerden daha yavaş salan nano boyutlu NP adsorbanlarına bağlanır. Tarımsal girdilerdeki aktif maddelerin sahaya özel ve kontrollü salınımı ile çiftçilerin gübre harcamaları azaltılabilir. Ayrıca, gıda mahsulü

beslenmesini artırarak toprak sağlığının geliştirilmesine ve jeobiyolojik toprak döngüsünün sürdürülmesine yardımcı olabilir (Chhipa, 2017; Zulfiqar ve ark., 2019).

Daha fazla araştırma, NP'lerin besin geliştirmede potansiyel olarak uygulanabilir olabileceğini göstermiştir. Cu NP'ler, ekin bitkileri için yeşil nanopestisit taşıyıcı ajanlar ve nanogübreler olarak hizmet ederek, tarımsal üretimi geliştirmede potansiyel ajan olarak önerilmiştir (Abd-Elsalam, 2022). Cu/CuO NP'leri mısır (*Zea mays* L.) bitkilerine sprey olarak ve çözelti költürü yöntemi ile uygulanması bitki büyümesini %51 oranında arttırmıştır. Ek olarak, uygulanan NP'nin bitki hücresine hızla girdiği ve farklı metabolik enzimleri optimum dozda asimile ettiği ve pozitif yönde düzenlediği gösterilmiştir (Adhikari ve ark., 2016). Nanoparçacıkların tüm potansiyel uygulamalarına rağmen, lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarına yol açabilen serbest radikallerin neden olduğu toksisite gibi biyolojik sistemler ve çevre üzerindeki olumsuz etkilerine ilişkin endişeler de araştırılması gereken bir diğer konudur (Agrawal ve Rathore, 2014).

2.4.2. Bitki ve depo zararlılarının kontrolünde nanoparçacıklar

Tahılların zararlılar tarafından istilasını, yıllık hasat edilen mahsulün dörtte biri ile yarısı arasında bir kayba neden olan dünya çapında bir sorundur. Birçok nanoformölasyon yapısındaki NP, zararlıları kontrol etmek için umut verici bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Bu NP'ler nanoformölasyonlar, nanoemölüsiyonlar veya nanosüspansiyonlar şeklinde olabilir. NP'lerin kullanımı, insektisitlerin etkisini ve aktif bileşenlerin kararlılığını artırarak, gerekli insektisit dozunu azaltarak ve tarımsal girdileri koruyarak geleneksel pestisitlerle ilişkili kısıtlamaların üstesinden gelebilir (Jasrotia ve ark., 2022).

NP'ler ayrıca pestisit nanotaşıyıcıları olarak da kullanılabilir. NP'lerin pestisit taşıyıcısı olarak kullanılması, onlara “hedefe hızlı teslimat” yolu ile bir seferde yüksek miktarda pestisit yükleme yeteneği verdiği ve geniş yüzey alanını imkânı sağlaması nedeniyle umut vericidir. Nanoformölasyonlar, artan çözünmeyen kimyasal çözünürlük, kararlılık, gelişmiş hareketlilik ve yavaş salınım gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Ayrıca tehlikeli organik çözücüler içermezler ve artan insektisidal aktivitelere sahiptirler. Böylece, NP'ler, emölüsiyon

hâline getirilebilir; konsantreler olarak adlandırılan pahalı, yanıcı ve toksik organik formülasyon çözücülerini kullanmaktan kaçınarak geleneksel pestisit formülasyonlarının eksikliklerini önleyebilir. Geleneksel insektisitlerin aksine, nanopestisitler veya pestisit kapsüllü nanoparçacıklar sık uygulama gerektirmez. Bunun nedeni, NP'lerle kapsüllenmiş pestisitlerin, konsantre ve sıklıkla uygulanan toksik maddenin aksine, genellikle kademeli olarak salınmasıdır (Athanassiou ve ark., 2018a).

Yapılan araştırmalara göre, NP'lerin bitki hastalıkları ve zararlılarının kontrolünde, daha yüksek potansiyel etkinliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin, gümüş, çinko oksit, demir ve daha birçok NP, zararlılara karşı yüksek verimli biyosidal aktivite göstermiştir (Çizelge 2.1). Cu NP'ler, mahsul gelişiminde alternatif herbisitler ve gübreler olarak kullanılabilir. Cu NP'lerin uygulanmasının 2014'te 570 ton iken, 2025'te 1600 tona yükseleceği tahmin edilmektedir. Cu NP'lerin ayrıca *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni* mayası ve küflere karşı antibakteriyel özellikleri olduğu bilinmektedir (Bakshi ve Kumar, 2021).

Çizelge 2.1. Böcek zararlılarının kontrolünde NP'lerin potansiyel uygulamaları

NP türleri	NP'lerin böcekler üzerindeki insektisit etkileri	Ölümcül konsantrasyonlar (LC _{50/90}) veya ölüm yüzdesi	Kaynak
Fe₃O₄	Beslenme ve temas toksisite çalışmaları, Manyetit NP'lerin insektisit etkilerini ortaya koymuştur. Küre şekilli, 23 ila 30 nm boyutlarında, Fe ₃ O ₄ NP'lerin, <i>Musca domestica</i> 'nın larvalarına ve pupalarına karşı etkili olduğu gözlemlenmiştir.	LD ₅₀ ve LD ₉₀ değerleri, besleme ve temas yoluyla sırasıyla 60 ve 75 µg / mL olarak görülmüştür.	Toto ve ark., 2022
Cu NP	Mantar aracılı yeşil sentezlenmiş Cu NP'ler, <i>Tenebrio molitor</i> ve farklı sivrisinek larvalarına karşı yüksek derecede böcek öldürücü etkinlik göstermiştir.	LD ₅₀ ve LD ₉₀ değerleri, <i>T. molitor</i> larvaları için sırasıyla 6.487 - 29.363 µg/mL'dir.	Vivekanandh an, ve ark., 2021b
ZnO	Çinko oksit (ZnO) ve hidrofilik silika NP'ler, <i>Sitophilus oryzae</i> L., <i>Callosobruchus maculatus</i> ve <i>Tribolium castaneum</i> 'a karşı böcek öldürücü etki göstermiştir.	Listelenen üç böcek zararlısında ZnO sırasıyla %98,3, 98 ve 57 oranlarında ölüme neden olmuştur. En yüksek konsantrasyondaki silika NP'ler ise, sırası ile %100, 88.3 ve 36 mortaliteye neden olmuştur.	Haroun ve ark., 2020

g - Cu NP	Biyosentezlenmiş Cu NP'ler <i>Tribolium castaneum</i> 'a karşı önemli ölçüde toksik etki göstermiştir.	LC ₅₀ , 5 günlük uygulama sonrası, 37 ppm olarak kaydedilmiştir.	El-Saadony ve ark., 2020
CuO - NP	CuO NP'ler, <i>Sitophilus granarius</i> ve <i>Rhyzopertha dominica</i> 'da önemli ölçüde böcek öldürücü etki göstermiştir.	<i>S. granarius</i> için %55 - 94.4 oranlarında mortalite saptanmış ve <i>R. dominica</i> 'da ise 10 günlük uygulama sonrası %70 - 90 arasında mortalite oranı bulunmuştur.	Badawy ve ark., 2021
AgNP	Gümüş NP'ler, farklı sivrisinek türleri <i>Anopheles stephensi</i> , <i>Aedes aegypti</i> ve <i>Culex quinquefasciatus</i> 'ta dikkat çekici derecede öldürücü etki göstermiştir.	Sineklerdeki ölümler sırasıyla, LD ₅₀ = 26.712 µg/mL; LD ₉₀ = 49.061 µg/mL, LD ₅₀ = 29.626 µg/mL; LD ₉₀ = 54.269 µg/mL) ve LD ₅₀ = 32.077 µg/mL; LD ₉₀ = 58.426 µg/mL).	Veerakumar ve ark., 2014

2.4.3. İnsektisit olarak yeşil Cu NP'ler

Son birkaç yılda nanobilimin ortaya çıkışı, alternatif pestisitler, herbisitler, ilaçlar ve katalizörler bulma konusunda yüksek araştırma ihtiyacı oluşturmuştur. Cu, antik çağlardan beri çeşitli formülasyon oranları ile bir insektisit olarak kullanılmıştır. Mantar ve bakterilerin neden olduğu hastalıklara karşı bitki koruyucu olarak tarımda Cu uygulaması yüzyıllardır iyi bilinmektedir. Cu, bitkilerin ihtiyaç duyduğu hayati bir mikro besin olmasına rağmen Cu bazı fungusidler lipidlere, DNA'ya, proteinlere ve diğer biyomoleküllere zarar verebilecek oldukça reaktif hidroksil radikalleri üretir (Rai ve ark., 2018).

Son on yılda, birçok araştırmacı, nanoparçacıkların tıbbi ve ekonomik açıdan önemli zararlıları kontrol etmedeki etkinliğine ilişkin birkaç keşif çalışması yürütmüştür (El-Saadony ve ark., 2020). Araştırma raporları, g - Cu NP'lerin kültür bitkilerinin mantar ve zararlılarına karşı etkili biyosidal özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Bu özellikler yenilikçi nanopestisit formülasyonları için kullanılabilir.

Nanoparçacıkların pestisit olarak kullanılması, pestisitlerin aşırı kullanımından kaynaklanan toksisite sorununu azaltabilir. Yeşil Cu NP'lere dayalı biyosensörler, zararlıların kontrolü ve gıda bozulmasına neden olan hastalıkları tespit etmek için kullanılabilir. Bu ve diğer birçok avantaj nedeniyle, nanoteknolojinin mevcut gıda ve tarım endüstrilerini iyileştirmek için en iyi seçenek olabileceği tahmin edilmektedir (Rai ve ark., 2018). Çizelge

2.2'de listelenen çalışmaların bazıları, biyolojik ajanlar tarafından sentezlenen yeşil g - Cu NP'lerin biyolojik olarak parçalanabilir, bütçe açısından uygun ve kimyasal pestisitlere güvenilir bir alternatif olduğunu göstermiştir.

Çizelge 2.2. Biosentezlenmiş Cu NP'lerin böcek öldürücü özellikleri

Öncül Nanoparçacık	Kullanılan indirgeme ve kaplama ajanları	Reaksiyon koşulları	Uygulanılan organizma	Ölümöl konsantrasyonlar	Kaynak
1mM CuSO ₄ ; g - Cu NP'ler	Entomopatogenic fungi <i>Metarhizium robertsii</i>	8.5:1.5, 72 saat 60 °C	<i>Tenebrio molitor</i> , <i>Anopheles stephensi</i> , <i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex quinquefasciatus</i>	LC ₉₀ = 29.363 µg/mL, sırasıyla 23.717 µg/mL, 65.144 µg/mL, 14.997 µg/mL	Vivekanandhan ve ark., 2021b
2 mM CuSO ₄ ·5H ₂ O; CuO NP'ler	<i>Aspergillus niger</i>	24 saat boyunca 30 ± 2 °C, 150 rpm inkübasyon	<i>Sitophilus granarius</i> ve <i>Rhyzopertha dominica</i>	LC ₉₀ =300 (mg)/100 g tohum, <i>S. granarius</i> için 8. ve <i>R. dominica</i> için ise 10. günde ulaşılmıştır.	Badawy ve ark., 2021
CuSO ₄ ·5H ₂ O; g - Cu NP'ler	<i>Pseudomonas fluorescens</i> MAL2	4:1 metal: ekstrakt oranı, 35 °C, 90 dk, pH=7	<i>Tribolium castaneum</i>	LC ₅₀ = beşinci günden sonra 36,89 µg/mL	El-Saadony ve ark., 2020
1mM CuO solüsyon; g - Cu NP'ler	<i>Annona squamosa</i> L., tohum ekstraktı	3:1 metal: ekstrakt oranı, 28 ±2 °C, 24 saat	<i>Anopheles stephensi</i> ve <i>Tenebrio molitor</i>	Sırasıyla 111.758µg/ml ve 338.680µg/ml LC ₉₀ bulunmuştur	Vivekanandhan ve ark., 2021a
10 mM CuSO ₄ ; g - Cu NP'ler	<i>Morganella morganii</i> - bakteri	24-48 h, 30 °C, 150 rpm inkübasyon	<i>Anopheles stephensi</i> , <i>Culex quinquefasciatus</i> ve <i>Aedes aegypti</i>	8. saatten sonra sırasıyla 163.513 µg/ml, 180.236 µg/ml ve 156.015 µg/ml	Lalitha ve ark., 2020
10 mM CuSO ₄ ; g - Cu NP'ler	<i>F. proliferatum</i> (YNS2)	1:2 metal:ekstrakt oranı	<i>A. stephensi</i> , <i>A. aegypti</i> ve <i>C. quinquefasciatus</i>	2130,99 µg/ml 894,90 µg/ml ve 173,92 µg/ml	Kalaimurugan ve ark., 2019
1mM CuSO ₄ ·5H ₂ O; g - Cu NP'ler	<i>Azadirachta indica</i> (Fermente edilmiş nim ağacı (hint leylağı))	20:80 metal: ekstrakt oranı, pH 11, 100 °C	<i>Bactrocera dorsalis</i>	-	Paragas ve ark., 2021
5mM CuSO ₄ ; g - Cu NP'ler	<i>Artocarpus heterophyllus</i> yaprak ekstraktı	4:6 metal: ekstrat oranı, 24 saat	<i>Aedes aegypti</i>	24. saatten sonra 4. dönem larvada LC ₅₀ =5,08 mg/ml'dir.	Agnita Sharon ve ark., 2018

2.4.4. Nanoparçacıkların diğer uygulamaları

NP'lerin diğer uygulamaları arasında üretim malzemeleri ve biyomalzemeler, çevresel iyileştirme, elektronik, güç, enerji üretimi vb. bulunur. NP'ler cıva, kurşun, kadmiyum, arsenik, metil mavisi, metil turuncu ve kongo kırmızısı gibi ağır metalleri temizleyebilir ve parçalanamayan maddeleri bozabilir. Böylece, zararlı kimyasallarla kirlenmiş malzemelerin iyileştirilmesi ve yeşil kimyada çevresel sensörler olarak hareket ederek, çevre açısından güvenli ürünler yaratmada önemli hâle gelirler (Rafi Shaik ve ark., 2017). Metal NP'ler düşük maliyet, toksik olmama ve sentez kolaylığı gibi çekici nitelikleri nedeniyle yüksek ilgi görmüştür. Ayrıca çeşitli alanlarda da çeşitli potansiyel uygulamalara sahiptirler (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Tarımda çeşitli nanoparçacık türlerinin uygulamaları

Tarımda NP'lerin uygulamaları	NP türleri	NP'lerin özellikleri	Uygulamanın özeti	Kaynak
	Cu	Küresel, 10 - 70 nm boyutlu	g - Cu NP'ler <i>Tribolium castaneum</i> 'a karşı böcek öldürücü verimlilik göstermiştir.	El-Saadony ve ark., 2020
	Cu	Çok yüzlü, 200 – 500 nm	Biyosentezlenmiş g - Cu NP'ler, <i>Fusarium solani</i> , <i>Neofusicoccum sp.</i> ve <i>Fusarium oxysporum</i> gibi ekonomik açıdan önemli bitki fotojenik mantarlarında derin morfolojik değişikliklere neden olmuştur.	Pariona ve ark., 2019
	CuO	Küresel, 12 - 38 nm	Enfekte domates fideleri, biyolojik olarak üretilen CuO NP'leri ile muamele edilmiştir. CuO NP'leri, <i>Fusarium oxysporum</i> 'nın hif gelişimini ve spor çimlenmesini baskılamıştır. Ayrıca bitki büyüme indekslerini ve meyve kalitesini artırmıştır.	Ashraf ve ark., 2021
	Ag	Küresel ve yarı küresel şekil, 50 nm	<i>Purpureocillium lilacinum</i> mantarı kullanılarak sentezlenen AgNP'ler, bitkiye zarar veren <i>A. flavus</i> mantarını ve <i>M. incognita</i> kök-düğüm nematodunu etkili bir şekilde inhibe etmiştir.	Khan ve ark., 2022
	ZnO	Altıgen wurtzite ve küresel parçacıklar, < 50 nm	Yeşil sentezlenen ZnO NP'ler, konsantrasyona bağlı serbest radikal temizleme, antibakteriyel ve metilen mavisi (MB) boya bozunma aktiviteleri göstermiştir.	Rahaiee ve ark., 2020

Silika	15-20 nm boyutunda	NP'ler, <i>T. castaneum</i> 'da yedinci günden sonra %53'e varan, ölüm oranı göstermiştir.	Debnath ve ark., 2012
--------	--------------------	--	-----------------------

2.5. Nanoparçacıklar ve Oksidatif Stres

Süperoksitler, peroksitler, hidroksil radikalleri ve tekli oksijenler topluca Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species : ROS) olarak adlandırılır ve hücre sinyali ve homeostazını sürdürmek için üretilen canlı hücrelerin yan ürünleridir (Rashdan, 2021). Bu moleküller, bağışıklık, sinyalleşme ve hücrelerin çoğalması gibi birçok biyolojik aktivitede çok önemli işlevlere sahiptir. Hücrenin ideal fizyolojik durumunda, ROS moleküllerinin üretimi ve detoksifikasyonu antioksidan süreçlerle dengelenir (Cheng ve ark., 2018). Bununla birlikte, aşırı ROS üretimi, organizmaların lipid, protein, amino asit ve nükleik asit bileşenlerini anında yok edebilir ve sonuçta membran bütünlüğüne zarar vererek hücrelerin ölümüne neden olabilir. Ayrıca daha yüksek protein oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna yol açabilir (Cheng ve ark., 2018; Zeng ve ark., 2020). Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan moleküller arasında bir dengesizlik olduğunda ortaya çıkar.

NP'lere maruz kalmanın önemli sonuçları, artan ROS üretimi ile oksidatif stres oluşumu ve potansiyel hücre ölümüdür (Horie ve Tabei, 2021; Rashdan, 2021; Sezer Tuncsoy ve ark., 2019). Oksidanlar veya serbest radikal moleküller nanoparçacıkların yüzeyine bağlandığında, yüzey aktif bölgeler oluşturulur. Bu bölgeler, daha fazla radikal oluşturmak için ortam oksijeni ile etkileşime girer ve bu da ROS üretimine neden olur (Rashdan, 2021).

Hücresel oksidasyon - indirgeme sinyal ağları, açıkça mitokondri ve peroksizomlarla ilişkilidir. Nanoparçacıklar ve hücreler arasındaki etkileşimler de mitokondriyal arızaya neden olabilir. NP'ler mitokondri, peroksizom, lizozom ve Golgi aygıtı gibi organellerin hatalı çalışmasına neden olur. Bu şekilde hücresel oksidatif dengesizliğe neden olurlar (Horie ve Tabei, 2021). ROS'un aşırı üretimi, diğer organellerin de hasar almasını şiddetlendirir. Sonuç olarak, oksidatif stres göstergeleri, NP'lerin öldürücülüğünü değerlendirmek için çok önemli bir araçtır (Horie ve Tabei, 2021).

2.5.1. Oksidatif stres biyobelirteçlerinin türleri

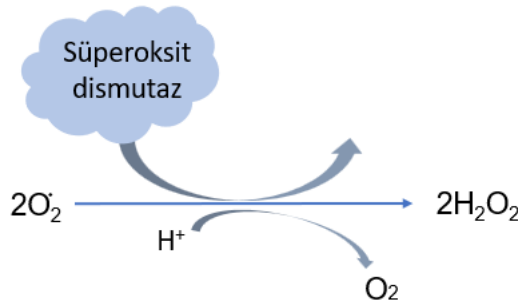
Oksidatif stres belirteçleri üç gruba ayrılabilir: Birinci grup, ROS, reaktif nitrojen türleri ve hızlı oksidatif hasara yol açan serbest radikallerle reaksiyona giren kimyasal ajanları içerir. Örnekler arasında yaygın olarak kullanılan ROS tespit kimyasalı Dihidroetidyum ve serbest radikal temizleyici 2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (DCFH-DA) (DHE) yer alır. İkinci grup, oksitlenmiş lipidler, proteinler, nükleik asitler ve bunların yan ürünleri gibi oksitlenmiş biyolojik molekülleri içerir. Bu kategori malondialdehit (MDA) ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) içerir. Üçüncü kategori, oksidatif stresle mücadele eden sisteme bağlı biyolojik moleküllerdir. Bu kimyasallar oksidatif stres aktivasyonu ve adaptasyonlarında yer alır (Horie ve Tabei, 2021).

Çoğu organizma, homeostazı korumak ve doğal olarak oluşan hücrel ROS seviyelerini dengelemek için antioksidan savunma mekanizmaları kullanır. Mekanizma, enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerden oluşan karmaşık bir mekanizmadır. Katalaz (CAT), Glutation peroksidaz (GPX), Superoksit dismutaz (SOD), Thioredoksin redüktazlar (TrxR'ler), Glutasyon S-transferaz (GST) ve Isı Şoku Proteinleri (Heat Shock Proteins : HSPs) üçüncü kategoriye ait antioksidan savunma sistemlerinin önemli enzimlerinden ve işaretleyici genlerinden bazılarıdır. Bu biyolojik belirteçler genellikle toksisite değerlendirme göstergeleri olarak kullanılmaktadır (Dziewiecka ve ark., 2016; Ribeiro ve ark., 2015; Tuncsoy ve Mese, 2021).

Çok sayıda çevresel biyoizleme çalışması biyokimyasal ve moleküler biyobelirteçleri kullanmaktadır. Bu tür biyolojik belirteçler metallere duyarlıdır ve potansiyel oksidatif stresin göstergeleridir. Bu biyobelirteçler, detoksifikasyon amacı ile bol miktarda ifade edilen detoksifiye edici genlerdir. Organizmaların antioksidan sistemi hücrel homeostazın korunmasına yardımcı olur ve aktif ROS'un zararlı etkilerinden korur (Nair ve ark., 2013).

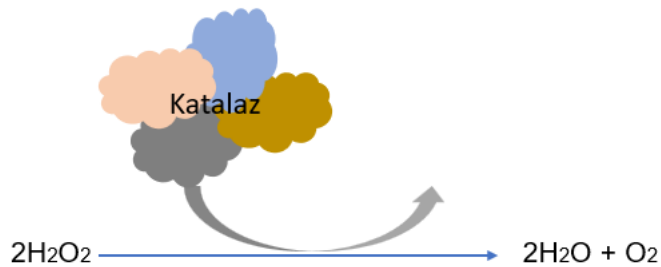
2.5.2. Biyobelirteçler olarak Süperoksit dismutaz, Katalaz, ve Glutasyon peroksidaz

Süperoksit dismutaz (SOD), serbest radikallerin detoksifikasyonunda aktif olarak yer alan bir enzimdir. Enzim, ROS'a karşı ilk savunma hattında gruplandırılmıştır. Birincil rolü, süperoksit anyonlarının moleküler oksijen ve hidrojen peroksit'e dismutasyonudur. Bu enzim, oksidatif stresin üstesinden gelerek böceklerin ömrünün uzamasını sağlamaktadır (Berwal ve Ram., 2018; Zhang ve ark., 2017; Kobayashi ve ark., 2019).



Şekil 2.6. SOD enzimi ile süperoksit anyonlarının moleküler oksijen ve hidrojen peroksit'e dismutasyonu

Hücredeki birçok metabolik aktivite, hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi tehlikeli yan ürünler üretir. Böceklerde H_2O_2 'nin su ve oksijene (Şekil 2.5) parçalanmasını katalize etmek için baskın H_2O_2 uzaklaştırıcı Katalaz'dır (CAT) (EC 1.11.1.6). CAT, tüm aerobik organizmalarda bulunan tetramerik “hem” içeren peroksizomal hidroperoksidaz antioksidan enzimdir (Cheng ve ark., 2018; Felton ve Summers, 1995; Nair ve ark., 2013).

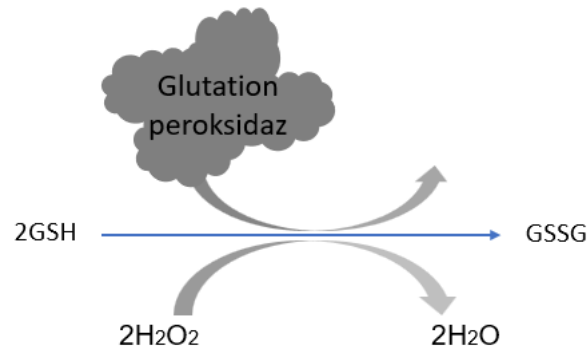


Şekil 2.7. Katalaz ile H_2O_2 'nin su ve oksijene detoksifikasyonu

Böcekler, oksidatif hasara karşı savunmak için büyük ölçüde CAT kullanırlar. Çeşitli indükleyici streslere karşı CAT dizileri ve ifade seviyeleri, böceklerde transkripsiyonel ve

translasyonel seviyelerde incelenmiştir (Yamamoto ve ark., 2005, Xu ve ark., 2017, Wang ve ark., 2012). Beyaz benekli çiçek böceği (*Protaetia brevitarsis*) üzerinde yapılan bir çalışma, aşırı ifade edilen CAT enzimlerinin H_2O_2 bozulmasını katalize edebildiğini göstermiştir (Kim ve ark., 2008). Sırasıyla *Heortia vitessoides*, *Xylotrechus rusticus*, *Frankliniella occidentalis*, *Rhopalosiphum padi* ve *Chillo suppressalis*'te termal stres dâhil olmak üzere çeşitli çevresel streslere yanıt olarak yüksek seviyede CAT ifadeleri tespit edilmiştir (Cheng ve ark., 2018; Ding ve ark., 2015; Li ve ark., 2018; Lu ve ark., 2017; Qin ve ark., 2017; Xu ve ark., 2017).

Glutasyon peroksidaz (GPx), indirgenmiş glutasyon monomer GSH'nin disülfid formuna oksidasyonunu katalize eder. Disülfid formları daha sonra hidroperoksitlere (H_2O_2 ve lipid hidroperoksitler) indirgenebilir. Bu hidroperoksitler sonunda su ve oksijene dönüştürülür (Rashdan, 2021) (Şeki 2.6).

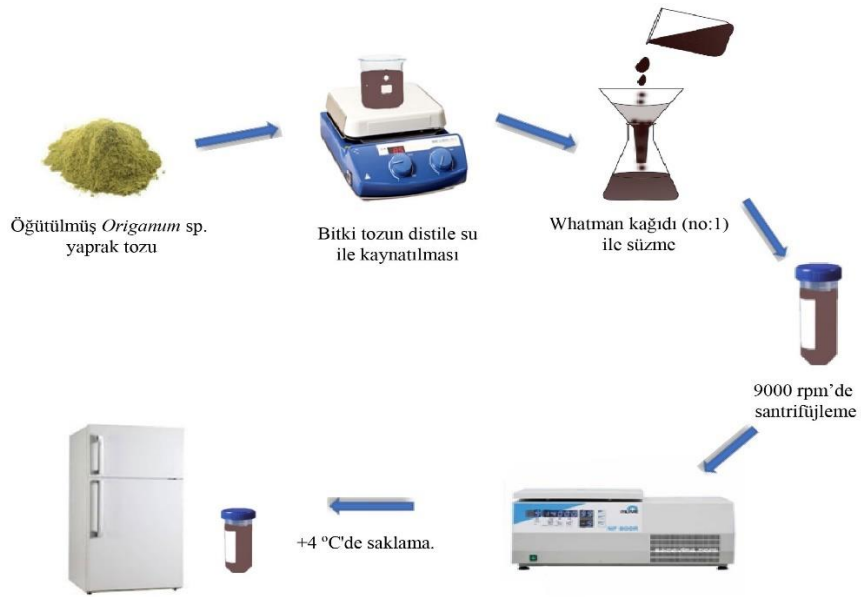


Şekil 2.8. Glutasyon monomer GSH'nin GPX ile disülfid formuna indirgenmesi

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *Origanum* sp. Yaprakından Ekstrakt Hazırlanması

Cu NP'lerin yeşil sentezini (g – Cu NP) gerçekleştirmek için piyasadan satın alınan kekik baharatı (*Origanum* sp., Lamiaceae) (Buhara Baharat Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti) kuru yaprakları ince toz haline getirilmiştir. 10 g bitki tozu, 1:10 w/v oranında 100 ml distile su (dH₂O) içinde çözülmüştür. Karışım, 15 dakika boyunca 90 °C'de ısıtılmıştır. 15 dakika sonra karışım Whatman 1 numaralı filtre kâğıdı kullanılarak süzölmüştür. Numuneler, bitki kalıntılarını gidermek için 9000 rpm'de santrifüj (Nüve NF 800R) edilmiştir. Elde edilen süpernatant, partiküler maddeden dikkatlice ayrılmış ve berrak ekstrakt, yeni bir temiz tüpe aktarılmıştır. Süpernatant sonraki deneysel kullanım için 4 °C'de saklanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Origanum* sp.'den bitki ekstraktının hazırlanması

3.2. *Origanum* sp. ekstraktından Yeşil Sentez Yolu ile Nanoparçacık Eldesi

Origanum sp.'den Cu NP'lerin yeşil sentezi için 10 mM CuSO₄ (Sigma – Aldrich, PHR1477, Türkiye) çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan Cu çözeltisine 15 ml ekstrakt damla damla ilave edilmiştir ve çözelti 15 dakika karıştırılmaya bırakılmıştır. Daha sonra karışımın pH'sı 1mM NaOH kullanarak 9'a ayarlanmıştır ve karışım 2 saat karıştırmaya bırakılmıştır.

Renk değişiminin gerçekleşmesinin ardından NP içeren çözelti aglomeratlardan kurtulmak için 9000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Np içeren süpernatantlar yeni steril tüplere aktarılmıştır.

g - Cu NP sentez koşullarının optimizasyonu için, kullanılan ekstrakt miktarı, Cu derişimi, reaksiyon süresi, pH ve sıcaklık parametreleri değiştirilerek deneyler tekrarlanmıştır. Ekstraktın optimum miktarını bulmak için bakır çözeltisine damla damla, farklı hacimlerde ekstrakt ilave edilmiştir ve karıştırılmaya bırakılmıştır. Optimum CuSO_4 konsantrasyonunu belirlemek için CuSO_4 'ün değişen konsantrasyonları (5, 10, 15 ve 20 mM) optimum ekstrakt hacmi ile belirlenmiştir. Verimli g - Cu NP'ler oluşturmada, optimum reaksiyon süresini tespit etmek için 15 dakikadan başlayarak, 120 dakikaya kadar reaksiyonlar yapılmıştır ve her 15 dakikada bir spektrofotometrik analizi yapılmıştır. Ayrıca reaksiyonun optimum pH ve sıcaklığı için farklı pH ve sıcaklıklarda sentezler yapılmıştır. Optimum pH tayini için, reaksiyon süresi 75 dakika tutularak sentezler pH: 6, 7, 8, 9, 10 ve 11' de yapılmıştır. Reaksiyon sıcaklığı 25 °C, 55 °C ve 85 °C'ye ayarlanarak sıcaklık optimizasyonu yapılmıştır. Reaksiyonların sonunda, koyu kahverengi renk dönüşümü gözlenmiştir. g - Cu NP'lerin sentezinin ilk kalitatif tayini, renk değişimi sayesinde yapılmıştır.

3.3. g - Cu NP'lerin karakterizasyonu

Origanum sp. ekstraktından g - Cu NP'lerin oluşumu UV - Görünür bölge spektroskopisi ile doğrulanmıştır. g - Cu NP'lerin boyutlarını ve morfolojilerini analiz etmek için TEM analizi yapılmıştır. CuSO_4 'ün Cu NP'lere indirgenmesi ve stabilizasyonundan sorumlu fonksiyonel gruplar daha sonra FTIR ile incelenmiştir. Sentezlenen NP'lerin kristal yapısı XRD ile incelenmiştir. EDX analizi ile örneğin bileşimi analizi edilmiştir. Termo Gravimetrik Analizi (TGA), Cu NP'lerin termal stabilitesini ortaya çıkarmak ve NP'lerin yüzeyindeki ekstrakt bileşenlerinin yüzdesini belirlemek için yapılmıştır. Son olarak, üretilen NP'lerin konsantrasyonu İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrometrisi (ICP - MS) ile belirlenmiştir.

3.4. Böcek yetiştirme

Kapra böceklerini yetiştirmek üzere buğday taneleri 55 °C'de 6 saat sterilize edilmiştir. *Trogoderma granarium* kültürü plastik kaplarda (11,5 cm çap x 18,5 cm yükseklik) yetiştirilmiştir. Plastik kapların kapaklarında minik delikler açılmış ve havalandırma için ince bir file kumaşla kapatılmıştır. Etüvde 35 ± 1 °C'de, $\%65 \pm 5$ bağıl nemde üreme sağlamak için her bir plastik kaba 500 gr buğday ve 100 adet son dönem larva ilave edilmiştir. Yeni neslin larva gelişim dönemleri takip edilmiştir. Pupalar, bioassay ve gen ifade analizi çalışmaları için yeni ortaya çıkan erginleri kullanmak üzere toplanmıştır.

3.5. Biyoassay deneyi

Pupalardan yeni çıkan erginler toplanarak g - Cu NP ile besleme deneyi uygulanmıştır. Bunun için 20 g buğday tartılarak 12 farklı petri kabına ilave edilmiştir. 200, 250 ve 300 ppm olmak üzere farklı konsantrasyonlardaki 2 ml g - Cu NP'ler her bir petriye homojen ve dikkatli bir şekilde dağıtılmıştır. NP'lerle muamele edilmiş buğdayların kurutulması, 35 ± 1 °C'de 40 dakika boyunca etüv kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pupalardan yeni çıkmış olan 20 adet *T. granarium* ergini, g - Cu NP'ler ile muamele edilmiş 20 g buğday içeren petri kaplarına aktarılmış ve beslenmeye bırakılmıştır. Böceklerin ölüm oranı 12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat sonra kaydedilmiştir. Kontrol deneylerini gerçekleştirmek için, yukarıdaki aynı adımlar izlenmiş, ancak g - Cu NP'ler yerine ddH₂O kullanılmıştır. Her deney, üç tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir ve %50 ve %90 ölüm oranları (LC₅₀, LC₉₀) her bir konsantrasyon için hesaplanmıştır.

3.6. g - Cu NP'lerin *Trogoderma granarium*'da Detoksifikasyon Enzim Genleri

Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Süperoksit dismutaz (*TgSOD*), Katalaz (*TgCAT*) ve Glutasyon peroksidaz (*TgGPX*)'ın dâhil olduğu oksidatif strese duyarlı genlerin ifade seviyeleri, Kantitatif Eş Zamanlı PCR (RT - qPCR) tekniği kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışma, toplam RNA

izolasyonunu, izole edilmiş RNA'ların kantifikasyonunu, cDNA sentezini, sentezlenmiş cDNA'ların kantifikasyonunu, RT - qPCR ve istatistiksel analizleri içermiştir.

3.6.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için 12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saatlik uygulamayı içeren her deney seti için erginler toplanmıştır. Üreticinin talimatlarına göre NucleoZOL Reaktifi (Machery-Nagel GmbH, Düren, Almanya) kullanılarak, total RNA izolasyonu yapılmıştır. Böcek örnekleri, 500 µl reaktif içeren bir mikrosantrifüj tüpüne konularak mikro havaneli yardımıyla homojen hâle getirilmiştir. 15 saniye kuvvetli çalkalama ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra, numuneler 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. RNA içeren süpernatantlar, yeni ve temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. RNA'lar daha sonra izopropanol eklenerek çöktürülmüştür. Tüpün dibinde oluşan görünür RNA pelletleri iki kez 500 µL %75 etanol ile yıkanmıştır. Son olarak, pelletler RNaz içermeyen su eklenerek sulandırılmış ve RNA'ların miktarı ve 260 nm ve 280 nm'deki absorbansları Multiskan GO Mikroplaka Spektrofotometresi (Termo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılarak tayin edilmiştir.

3.6.2. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi

Örneklerden izole edilen RNA, üreticinin tavsiye ettiği protokole göre OneScript® Plus cDNA Sentez Kiti (ABM Good, Kanada) kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. 20 µl toplam reaksiyon hacmi için, önerilen cDNA sentezi bileşenleri 4 µl 5X RT tamponu dâhil, 1 µl dNTP, 1 µl Oligo - dT primer, OneScript® Plus RTase ve 1 µg RNA'dan oluşmuş, kalan hacim ise ddH₂O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. cDNA sentez reaksiyonu, 55 °C'de 15 dakika ve 85 °C'de 5 dakika inkübasyondan oluşmuştur. Inkübasyon sonunda örnekler buz üzerinde hızlıca soğutulmuş ve cDNA'lar sonraki uygulamalar için -20 °C'de saklanmıştır.

3.6.3. *Trogoderma granarium* detoksifikasyon genleri için uygun primerlerin tasarlanması

TgSOD, *TgCAT*, *TgGPX* ve housekeeping gen β -aktin (*TgACT*) kodlayan dört adet unigene, *T. granarium*'un daha önceden oluşturulmuş cDNA kütüphanesinden bulunmuştur (Dağeri, 2022). Primerler Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) sitesi kullanılarak tasarlanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerler.

Gen	Primerlerin Dizisi (5'-3')
<i>TgSOD</i>	F: CAGGCTGCGTCAAAGTGGTC R: GCTCCCAGACGTCGATTCCA
<i>TgCAT</i>	F: GTCTGGAACCGACCCCGATT R: GTGCGGCCACACTTTTGTCA
<i>TgGPX</i>	F: GGACTCTGGGCGATTTTCATC R: CGACTTCAGCAGATCCTTAGG
<i>TgACT</i>	F: ATGGCGTGTGGCAAAGCGTAA R: CCTTCAACACACCAGCTATGT

3.6.4. Kantitatif Eş Zamanlı PCR (RT - qPCR)

RT - qPCR deneyleri, QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) kullanılarak, g - Cu NP ile muamele edilmiş oksidatif strese yanıt oluşturması beklenen örneklerin transkripsiyonel düzenlemesini incelemek için 50 ng cDNA kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyonlar, FastStart Essential DNA Green Master (Roche) kullanılarak, toplamda 20 μ l reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. RT - qPCR koşulları, 95 °C'de 10 dakika süreyle bir ön inkübasyon, ardından 95 °C'de 10 saniye, primerlerin spesifik bağlanma sıcaklığında 10 saniye, 72 °C'de 10 saniye boyunca 40 döngü ve ardından 40 °C'de 10 sn boyunca soğutma basamaklarından oluşmuştur. Her reaksiyonun ardından, üreticinin talimatına göre her fragmentin bütünlüğünü doğrulamak ve kontaminasyon kontrolünü sağlamak için bir erime eğrisi analizi yapılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. RT - qPCR çalışması için kullanılan bileşenler

Reaksiyon bileşenleri	Hacim
FastStart Essential DNA Green Master	10 µl
İleri Primer (10 µM)	1 µl
Geri Primer (10 µM)	1 µl
cDNA	50 ng
Ultra saf Su	3 µl
Toplam hacim	20 µl

Her reaksiyon üç teknik tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Göreceli *TgSOD*, *TgCAT*, ve *TgGPX*'in ifade seviyelerini hesaplamak için bağıl nicel yöntem olan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ kullanılmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

3.7. İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirme Minitab 19.0 (Minitab Ltd, Brandon Court, Birleşik Krallık) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Uygulamalar arasındaki istatistiksel anlamlılık farklılıklarının belirlenmesi, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak yapılmış ve bunu Tukey HSD (Honestly Significant Difference) testi izlemiştir. 0.05'ten küçük bir *p* değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Bakır Nanoparçacıklarının Sentezi

Bakır nanoparçacıklarının sentezinde, reaksiyon mekanizması, bakır iyonlarının bakır atomlarına indirgenmesini, bakır nanoparçacıklarının çekirdeklenmesini ve ardından bakır nanoparçacıkları ekstrakt bileşenleri ile kaplanırken çekirdek büyümesini içermektedir. Bu, nanoparçacıkların sentezinde ekstrakt bileşenlerinin çoğu zaman indirgeyici ve kaplama maddesi olarak rol almasından kaynaklanmaktadır (Verma ve Kumar, 2019; Manjari ve ark., 2017). Nanoparçacık sentezinin ilk göstergesi renk değişimidir, bu nedenle g - Cu NP'lerin sentezinde *Origanum* sp. bitkisinin biyo-indirgeyici ve biyo-kaplama maddesi olarak etkinliği, reaksiyon karışımının renk değişimi takip edilerek belirlenmiştir.

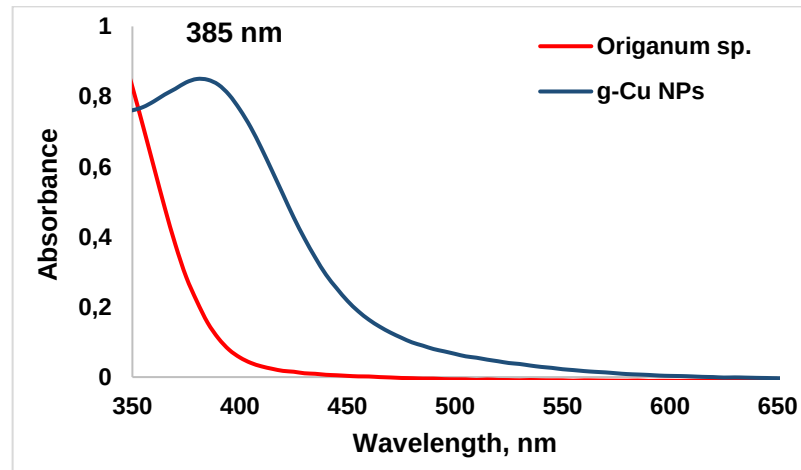
Origanum sp. bitkisinin Cu NP'lerin sentezinde biyolojik indirgeyici ve biyolojik kaplayıcı bir ajan olarak etkinliğini araştırmak için iki eş zamanlı deney yapılmıştır. İlk deneyde 0.156 g CuSO₄ kristali 100 ml distile su ile çözülerek 10 mM CuSO₄ çözeltisi hazırlanmıştır. Manyetik bir karıştırıcı üzerinde 100 ml'lik bir behere 15 ml bakır çözeltisi ve karıştırılan çözeltiye 15 ml ekstraktan damla damla ilave edilmiştir. Reaksiyon 2 saat ve renk değişikliği olmayınca gece boyunca pH düzenlemesi olmadan oda sıcaklığında devam ettirilmiştir. Reaksiyonun karışımının yaklaşık pH'ı 5 bulunmuştur. İkinci deneyde, 15 ml 10 mM CuSO₄ çözeltisine damla damla 15 ml ekstrakt ilave edilerek 15 dk karıştırmaya bırakılmıştır. Daha sonra reaksiyon karışımının pH'ı 9'a ayarlanarak 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. İlk deneyde gece boyunca karıştırma sırasında çok hafif bir renk değişimi olurken (Şekil 4.1a), reaksiyon başlangıcında reaksiyon karışımının açık kahverengi rengi, ikinci deneyde pH:9'a ayarlandıktan sonra koyu kahverengiye dönmüştür (Şekil 4.1b).



Şekil 4.1. a. pH düzenlemesi olmayan reaksiyon b. pH düzenlemesi ile reaksiyon.

pH düzenlemesi olmadan yapılan sentez sonucu, *Origanum* sp. ekstraktının rolünün, indirgeme değil, sadece bakır iyonlarını stabilize etmek olduğunu göstermektedir. Çünkü, sentezde bakır nanoparçacıkların oluşumu için önemli bir renk değişimi olmamıştır. Bu sonuç, *Origanum* sp. ekstraktının Cu^{2+} iyonunu Cu^0 atomuna indirgeme kapasitesinin düşük olmasından kaynaklanmış olabilir, çünkü indirgeme potansiyelinin gücü, pH: 5'te bakır iyonlarını bakır atomlarına indirmek için yeterli değildir.

Cu NP'lerin oluşumunu doğrulamak ve YPR piklerini belirlemek için pH düzenlemesi ile sentezlenen numune için bir UV - Görünür bölge absorpsiyon spektrumu alınmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. g - Cu NP'lerin (mavi) ve *Origanum* sp. ekstraktının (kırmızı) UV / Görünür bölge absorpsiyon spektrumları

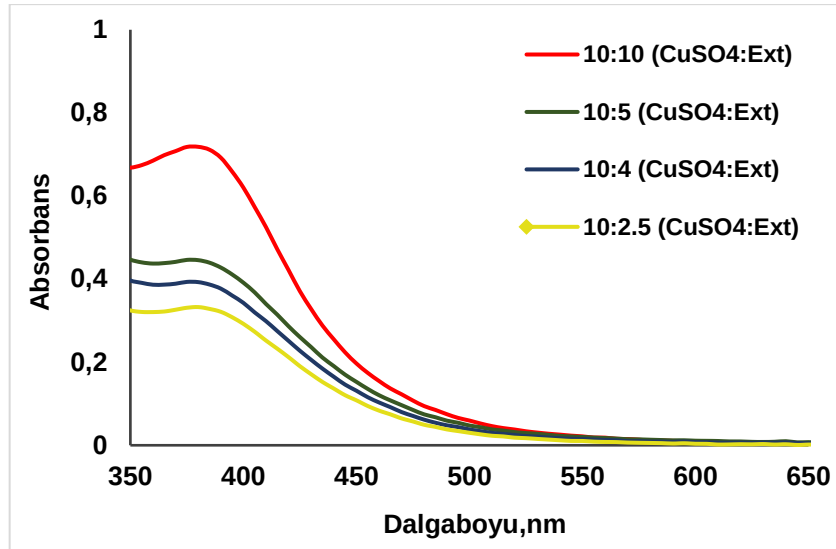
Şekil 4.2'de Cu NP'lerin 385 nm'deki UV / Görünür bölge absorbans pikleri, *Origanum* sp. ekstraktı ile sentezlenen Cu NP'lerin YPR bandıdır. Çünkü, nano boyutlu

parçacıkların YPR bantları değişmekte ve çeşitli kaplama ajanlarının kullanımında farklılık göstermektedir (Ismail, 2020).

4.2. Cu NP'lerin Sentezi için Optimizasyon Çalışmaları

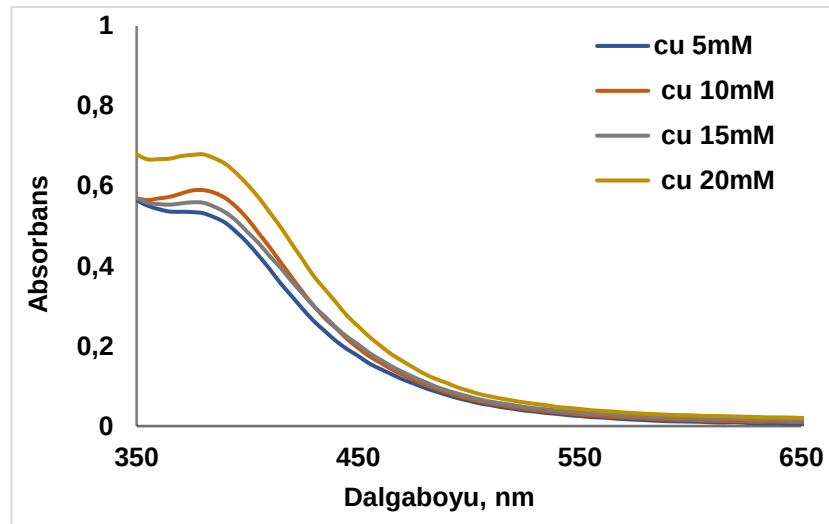
Biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalar için biyouyumlu, monodispers, küçük boyutlu ve kararlı nanoparçacıkların sentezlenmesi önemlidir. Çünkü NP'lerin boyut, bileşim ve biyouyumluluğu ile doku, hücre ve böceklerin metabolizmaları gibi biyolojik aktiviteleri önemli ölçüde etkilemektedir (Shahzad ve ark., 2021). NP'lerin morfolojisi, şekli, boyutu ve diğer özellikleri, bazı parametrelerdeki değişiklikten önemli ölçüde etkilenmektedir. Bu parametreler, sentezde kullanılan ekstraktın hacmini, çözeltinin konsantrasyonunu, reaksiyon karışımının pH'ını ve reaksiyon sıcaklığını içermektedir (Zhang ve ark., 2020). UV - Görünür bölge spektrumları üzerinde YPR pikleri takip edilerek boyut, yapı, stabilite ve NP'lerin toplanması gibi bazı genel bilgiler elde edilebildiğinden, bu parametrelerin etkisini araştırmak için UV - Görünür bölge spektrumlar kullanılmıştır (Patra ve Baek, 2014).

g - Cu NP sentezi optimizasyonları, bir seferde bir parametre değiştirilirken, diğer tüm reaksiyon parametreleri sabit tutularak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda kullanılan ekstrakt oranının değiştirilmesi g - Cu NP sentezini etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Ekstrakt oranının değiştirilmesi yoluyla absorpsiyon piklerindeki değişiklik, NP'lerin boyutundaki varyasyona bağlanabilmektedir. İlk olarak, daha düşük ekstrakt hacimlerinin eklenmesi, g - Cu NP'leri stabilize etmek için yeterli bulunmamıştır ve aynı zamanda, daha yüksek ekstrakt hacimlerinin eklenmesi de, g- Cu NP'lerin aglomerasyonuna veya çökmesine yol açmıştır. g- Cu NP'lerin sentezi için bakır çözeltisinin ekstrakt hacmine oranı 1:1, 2:1, 2.5:1 ve 4:1 (hacim:hacim) olarak çalışılmıştır ve diğer reaksiyon parametreleri ise sabit tutulmuştur (10 mM Cu çözeltisi, pH: 9, oda sıcaklığı, 2 saat reaksiyon süresi). Sonuçta, optimum hacim oranı, 380 nm'de daha keskin YPR piki verdiği için 1:1 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. g - Cu NP sentezinde eklenen ekstrakt hacmi optimizasyonu için UV / Görünür bölge analizi

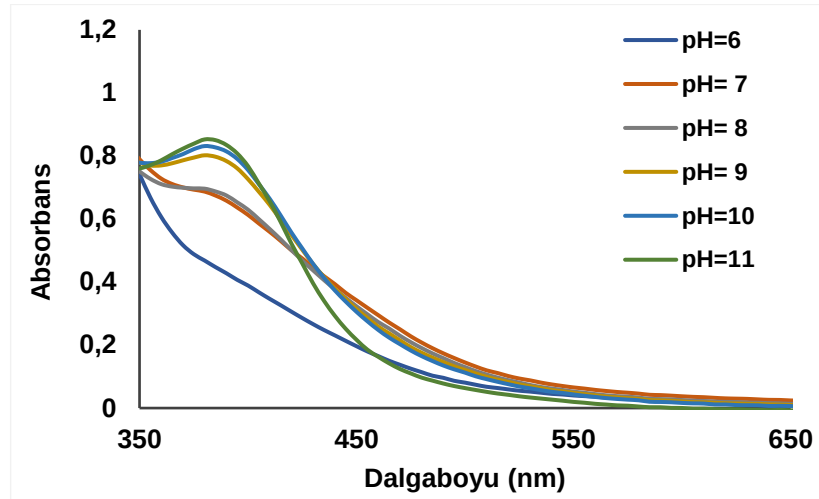
Belirlenen ekstrakt miktarının optimizasyonundan sonra, belirlenen ekstrakt hacmi kullanılarak (1:1) ve diğer reaksiyon koşulları (pH:9, Cu:ekstrakt=1:1, reaksiyon süresi: 2 saat ve oda sıcaklığı) sabit tutularak g - Cu NP'nin sentezi; 5, 10, 15, 20 mM bakır çözeltileri ile tekrarlanmıştır ve bakır nanoparçacıklarının YPR piki UV / Görünür bölge spektrometresi ile takip edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. g - Cu NP sentezinde Cu derişiminin optimizasyonu için UV / Görünür bölge analizi

20 mM bakır çözeltileri ile elde edilen bakır nanoparçacıklarının YPR pikinin şiddetinin artması bununla birlikte pikin genişlemesi ile YPR dalgaboyunun belirlenmesindeki zorluk nedeniyle ve 9000 rpm'de daha fazla çöken aglomere NP olduğu için, yani NP süspansiyonunun stabilitesi daha düşük olduğu için, sentezlere 10 mM bakır ile devam edilmiştir (Şekil 4.3).

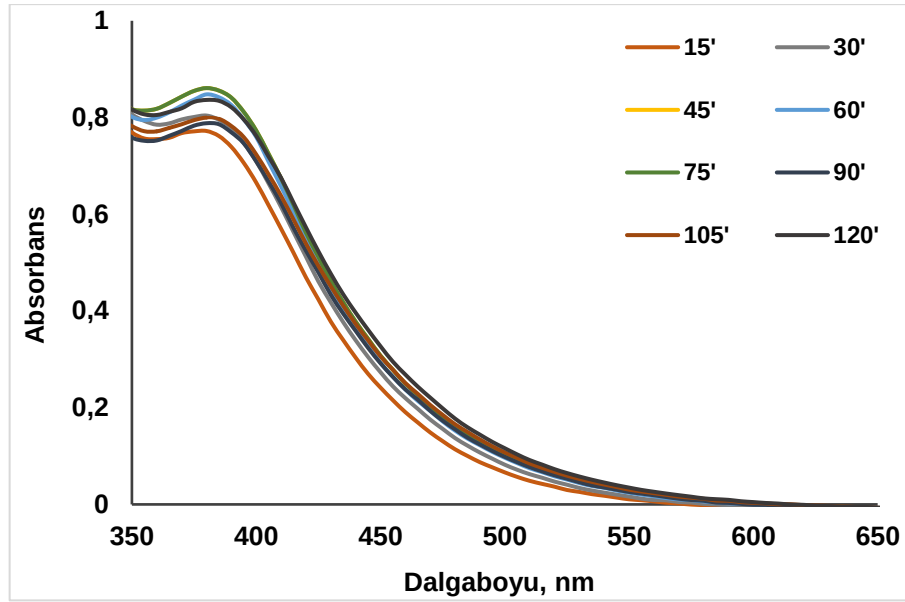
Nanoparçacık oluşumuna pH etkisini incelemek için, Cu NP' ler pH: 6, 7, 8, 9, 10, 11' de diğer parametreler sabit tutularak sentezlenmiştir ([Cu]: 10 mM, Cu:extract = 1:1, reaksiyon süresi: 2 saat ve oda sıcaklığı). Farklı pH'lerde sentezlenen NP'ler UV / Görünür Bölge spektrofotometresinde analiz edilmiştir ve absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. g- Cu NP sentezinde pH optimizasyonu için UV / Görünür bölge analizi

Cu NP' lerin artan pH ile absorbans piklerinin değiştiği görülmüştür. Artan pH ile absorbans pikleri artmıştır. pH değişimi ile birlikte YPR dalgaboyunda kayma olmamıştır. pH: 6' da maksimum absorbans dalgaboyu gözlemlenmemiştir. Bu sonuç pH ayarlaması olmadan yapılan g - Cu NP sentezinde renk değişiminin gözlemlenmemesini de doğrulamaktadır (Şekil 4.1a). Düşük pH değerleri zayıf absorbans bandları vermiştir. Bu sonuç, düşük pH değerlerindeki, düşük NP çekirdek oluşum hızına bağlanmaktadır (Gahlawat ve Choudhury., 2019). pH:9'da elde edilen YPR piki belirgindir, pH:11' de pH: 9' a göre sadece ~%6' lık bir artış vardır. g - Cu NP' lerin oluştuğu ancak fizyolojik pH' ya en yakın pH' da sentezin yapılması düşünülmüştür. Sentezlere pH:9' da devam edilmiştir.

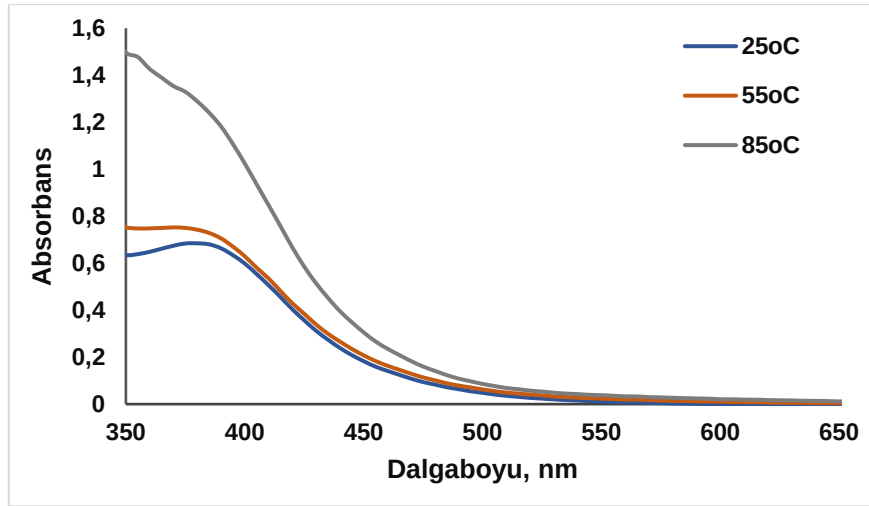
Belirlenen koşullarda ([Cu]: 10 mM, Cu:ekstrakt=1:1, pH:9 ve oda sıcaklığı), reaksiyon süresinin nanoparçacık oluşuma etkisi incelenmiştir. Sentez, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 dk boyunca YPR pikinin takip edilmesiyle gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. g - Cu NP sentezinde reaksiyon süresinin optimizasyonu için UV / Görünür bölge analizi

Nanoparçacık sentez süresinin 75. dakikasına kadar, g - Cu NP'ye ait YPR pikinin şiddeti artmaya devam etmiştir. 75. dakikaya kadar NP oluşumu devam etmiştir. Bu süreden sonra g - Cu NP'ye ait YPR pikinin şiddeti azalmıştır. Her sentez sonrası 9000 rpm' de yapılan santrifüj sonrasında çöken NP'ler karşılaştırıldığında 75. dakikadan sonra elde edilen çökeleklerin yani aglomere parçacıkların arttığı görülmüştür. Bu sonuç ile, nanoparçacık çekirdek oluşumunun 75 dakikada tamamlandığı, reaksiyon süresi uzadıkça parçacık büyümesinin gerçekleştiği düşünülmüştür. NP sentezlerine 75 dakika boyunca devam edilmiştir.

Sıcaklığın NP oluşumunda ve NP boyutunda etkili olduğu bilinmektedir (Bandeira ve ark., 2020; Bala ve ark., 2015). Bununla birlikte, boyuta sadece sıcaklığın değil, sıcaklık ile birlikte diğer parametrelerin de artış ya da azalış yönünde etki gösterdiği çalışmalar da literatürde bulunmaktadır (Letchumanan ve ark., 2021). Yüksek sıcaklıkta yeşil sentez yoluyla metal oksitler daha hızlı ve etkin bir şekilde sentezlenebiliyorken, yüksek sıcaklık denemeleri metallerin indirgenmesinden sorumlu biyoaktif moleküllerin sıcaklık ile birlikte inaktive olmasıyla, NP üretiminin düşük miktarlarda olmasıyla sonuçlanabilmektedir (Akintelu ve ark., 2020). 100 °C ve üzerindeki sıcaklıklar bitki ekstraktlarındaki biyoaktif molekülleri degrades ederler, bu yüzden çok fazla tercih edilmemektedir (Rajendran ve Sen., 2016). Bu nedenlerle, g - Cu NP sentezi diğer parametreler sabit tutularak ([Cu]: 10 mM, Cu:ekstrakt=1:1, pH:9 ve reaksiyon süresi: 75 dakika), 3 farklı sıcaklıkta (25, 55, 85 °C) denenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. g - Cu NP sentezinde sıcaklık optimizasyonu için UV / Görünür bölge analizi

g - Cu Np sentezinde sıcaklık arttıkça (55 ve 85 °C), aglomere NP' lerin arttığı ve zaman içerisinde çökmelerin olduğu yani NP süspansiyonunun 4 °C' de bile stabilitesinin düşük olduğu görülmüştür. Şekil 4.7'de görüldüğü üzere, oda sıcaklığının (~25 °C) üzerindeki sıcaklıklarda, g - Cu NP piklerinin genişlemesi ile YPR dalgaboyunun belirlenmesindeki zorluk ortaya çıkmıştır, bu aynı zamanda NP' lerin büyüdüğünün de bir göstergesidir (Mott ve ark., 2007). Bu nedenle, sentez kolaylığı da sağlayacağı için, sentezlere oda sıcaklığında devam edilmiştir.

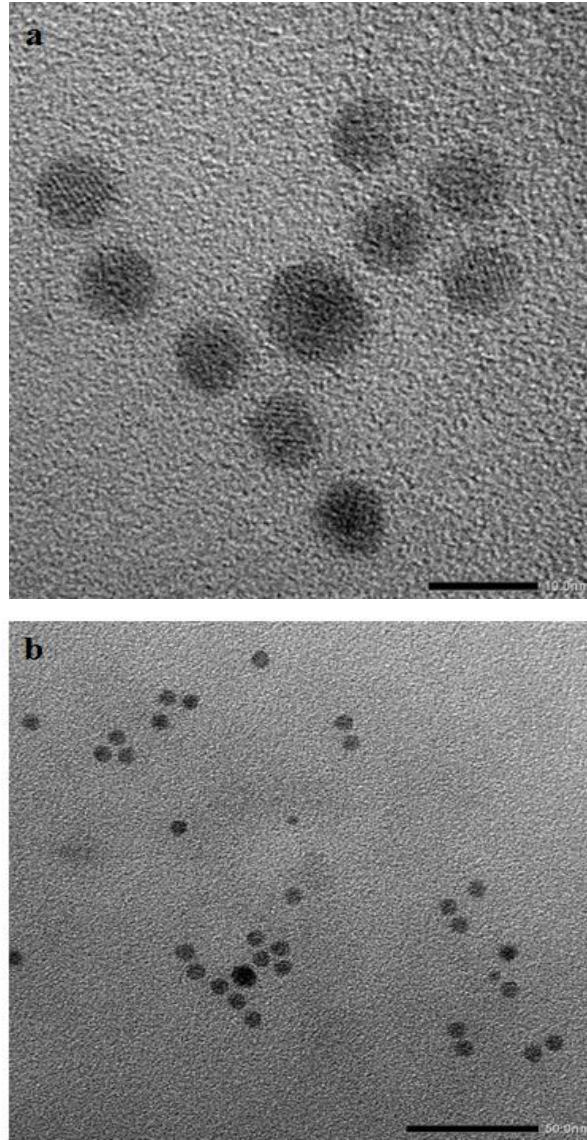
Sonuç olarak, karakterizasyon ve biyoassay deneylerinde kullanılan g - Cu Np' lerin sentez koşulları; [Cu]: 10 mM, Cu:ekstrakt=1:1 (hacim:hacim), reaksiyon pH: 9, reaksiyon süresi: 75 dakika, reaksiyon sıcaklığı: oda sıcaklığı şeklinde olmuştur.

4.3. Cu NP'lerin Karakterizasyon Çalışmaları

Cu NP'lerin yeşil yöntemle *Origanum* sp. ekstraktı kullanılarak sentezinin optimizasyon çalışmaları UV/Görünür bölge spektrofotometresi ile verimli bir şekilde yapıldıktan sonra, g - Cu NP'ler aşağıdaki spektroskopik ve mikroskopik teknikler kullanılarak karakterize edilmiştir. Bu tekniklerden Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) analizleri, X ışığı kırınımı (XRD), fourier transform Kızılötesi spektroskopisi (FTIR), Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX), Termo Gravimetrik Analiz (TGA) ve İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrometrisi (ICP - MS) gerçekleştirilmiştir.

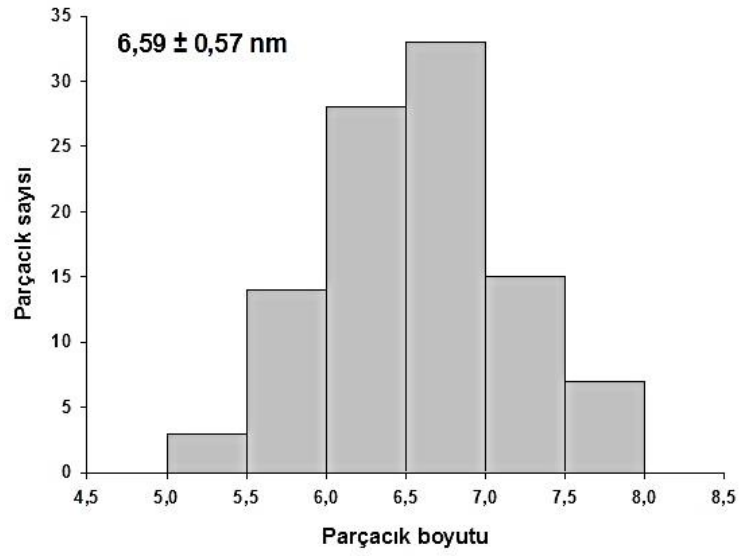
4.3.1. g - Cu NP'lerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile boyut ve şekil analizi

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM), NP'lerin morfolojisini ve boyutunu analiz etmek için en yaygın kullanılan araçlardan biridir. NP'lerin oluşumunu göstermek için g - Cu NP'lerin TEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.8 a-b).



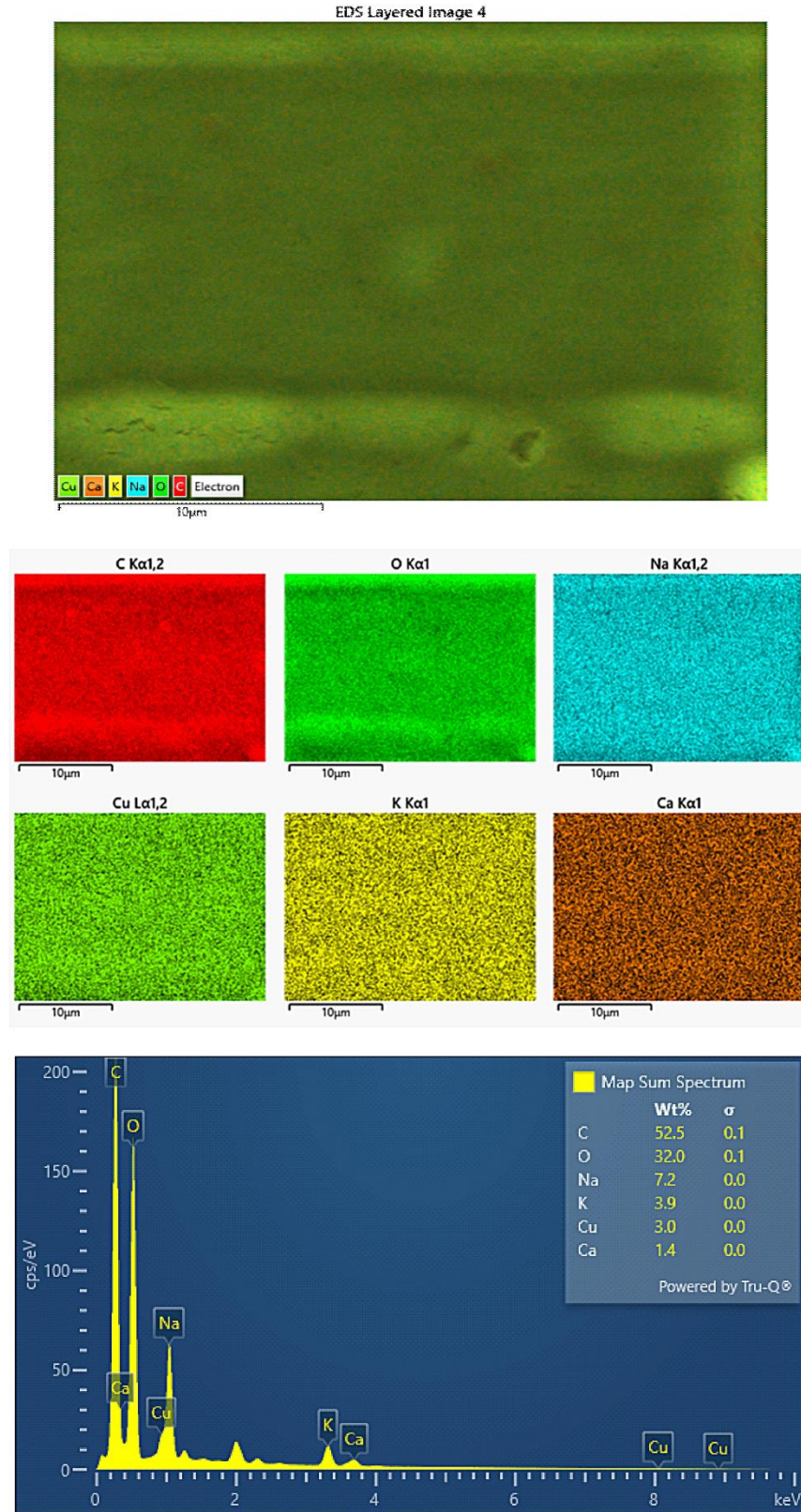
Şekil 4.8. g - Cu NP' lerin TEM görüntüleri (120 kV); a. skala: 10 nm b. skala: 50 nm

Şekil 4.8 a ve b'de görüldüğü üzere, TEM görüntüleri sentezlenen g - Cu NP' lerin oluşumunun monodisperse ve küresel şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. TEM görüntülerinden elde edilen boyut dağılım grafiği, 100 parçacık boyutu ölçülerek elde edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. TEM görüntülerinden elde edilen boyut dağılım grafiği

Origanum sp. ekstraktı ile sentezlenen g - Cu NP' ler 6.59 ± 0.57 nm boyutundadır. TEM görüntülerinden ve boyut diyagramından elde edildiği üzere, NP çok küçük (<10 nm) boyutta ve homojen boyut dağılımına sahiptir. Aynı zamanda, g - Cu NP'lerin 4.30 nm kalınlığında iridyum kaplaması yapılarak Taramalı Elektron Mikroskopisi (FESEM) cihazı ile EDS analizi yapılmış ve örneğin bileşimi gösterilmiştir (Şekil 4.10).



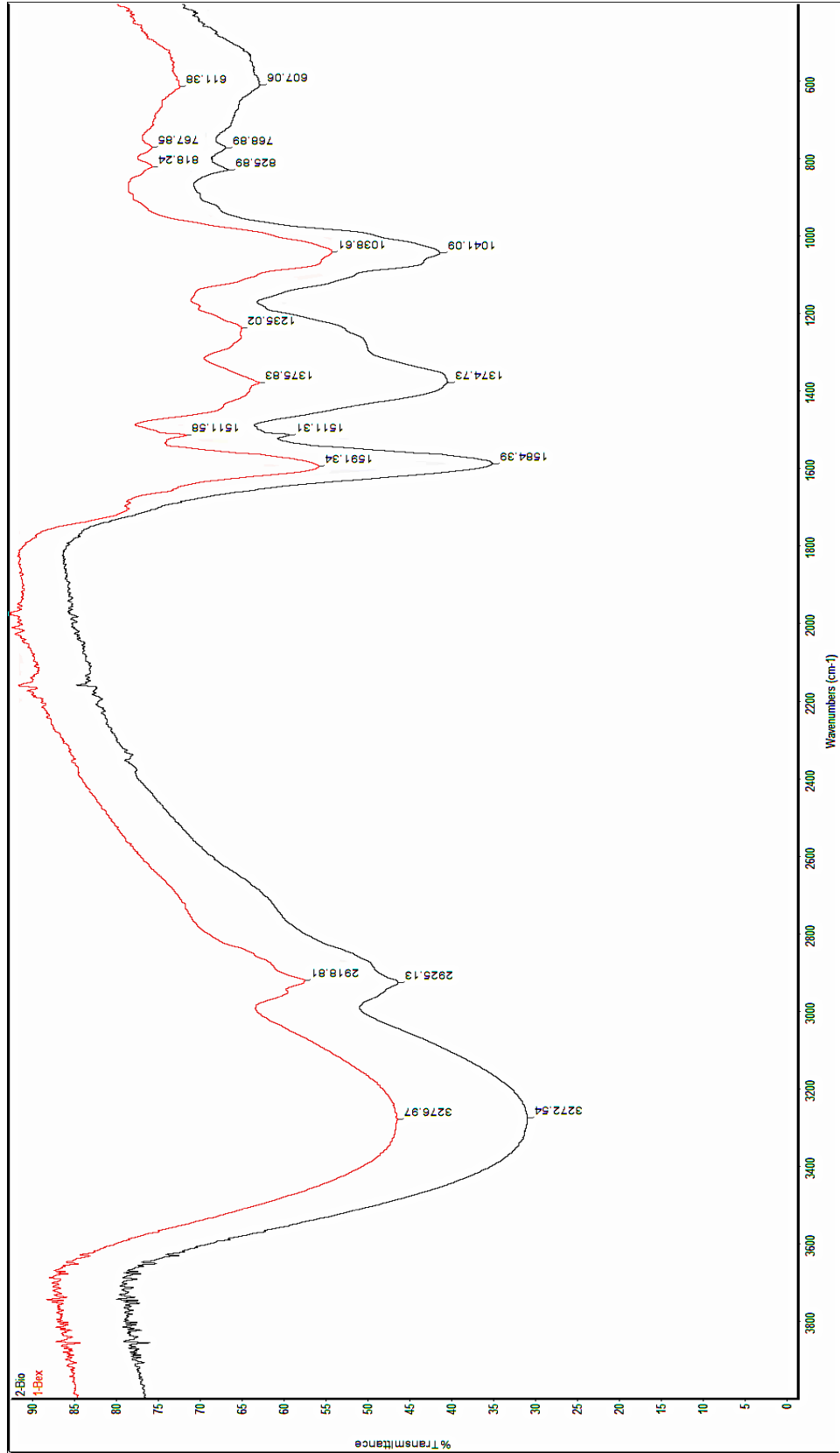
Şekil 4.10. g - Cu NP örneğinin EDS analizi

EDS spektrumundan, g - Cu NP örneğinin Cu, O, C, Na, K, ve Ca içeriği görülmektedir. Cu dışındaki içerikler bitki ekstraktından kaynaklanmaktadır. Aynı

zamanda, Cu NP sentezi sırasında ve sentez sonrasında saklama ve uygulama koşullarında, Cu kolay oksitlenebilen bir element olduğu için, Cu NP oluşumu yanında, CuO NP oluşumu da gerçekleşmektedir. Oksijen içeriği hava ile oksitlenen CuO NP'lerden de kaynaklanmaktadır.

4.3.2. Cu NP'lerin Infrared Spektrometresi ile Yapısal Analizi (FTIR)

Yeşil Cu NP'lerin yüzeyinde bulunan ve *Origanum* sp. ekstraktının içeriğindeki fonksiyonel grupların ya da metabolitlerin nitel analizi için *Origanum* sp. ekstraktının ve *Origanum* sp. ekstraktı ile sentezlenmiş Cu NP örneklerinin FTIR spektrumları 4000 - 400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında alınmıştır ve spektrumlar üst üste çakıştırılarak verilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *Origanum* sp. ekstraktı (kırmızı) ve g - Cu NP'ye (siyah) ait FTIR spektrumları

Örneklere ait FTIR spektrumlarından gözlemlenen şiddetli bantlar; g - Cu NP' ler için, 3276.97, 2918.80, 1591.34, 1511.58, 1375.83, 1235.02, 1038.61, 818.24, 767.85,

611.38 cm^{-1} ; *Origanum* sp. ekstraktı için, 3275.54, 2925.13, 1584.39, 1511.31, 1374.74, 1041.09, 825.89, 768.89, 607.06 cm^{-1} şeklindedir. Bantların hangi fonksiyonel gruplara karşılık geldiği çizelge 4.1’de verilmiştir.

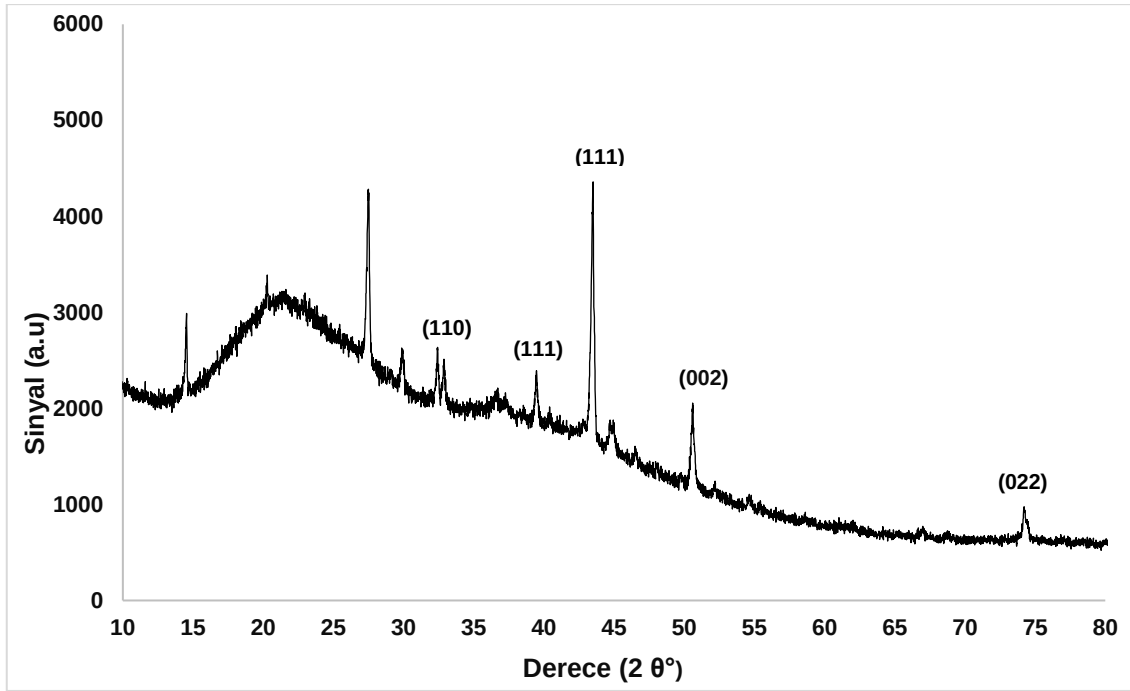
Çizelge 4.1. FTIR analiz sonuçları ve *Origanum* sp. ekstraktının aracılık ettiği g - Cu NP’lerin atanan fonksiyonel grupları

Dalga sayısı (cm^{-1})	Titreşimler	Fonksiyonel gruplar	Bant şiddeti	Kaynak
3100-3300	O–H gerilme	Alkol (asit)	Çok geniş	(Kamli ve ark., 2021; Luque ve ark., 2022; Sankar ve ark., 2014; Sankar ve ark., 2013).
2950-2850	C–H gerilme	Alkanlar	Küçük	
1550-1650	N–H bükme	Aromatik aldehitler	Küçük	
1450-1550	N–H bükme	Birincil amidler	Küçük	
1300-1450	N-O gerilme	Nitro	Orta	
1150-1250	C–O gerilme	Eterler	Orta	
1000-1050	C–O gerilme	Alkol	Orta	
800-900	1 C-H düzlem dışı	Aromatikler	Küçük	
600-800	1 C-H düzlem dışı	Aromatikler	Küçük	

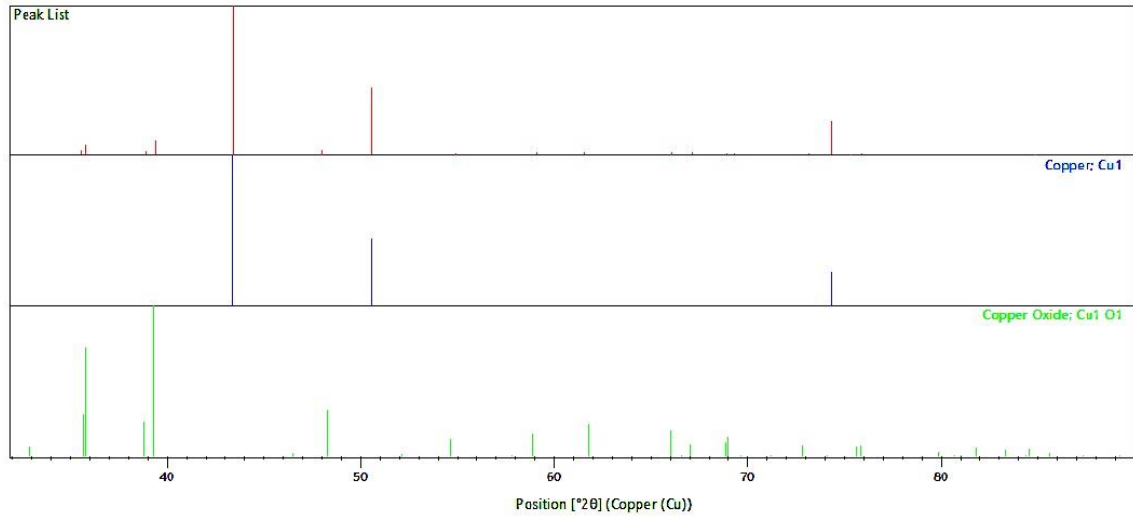
g - Cu NP’ e ait spektrumun ekstrakt spektrumu ile karşılaştırılmasıyla, bantlara ait güçlü tepe noktalarının dalga sayılarının biraz kaydığı, ancak aynı fonksiyonel grupların her iki örnekte de bulunduğu görülmüştür. Sentezlenen g - Cu NP’ lerin *Origanum* sp. ekstraktı ile sentezlendiği spektrumlardan doğrulanmaktadır. Dalga sayılarındaki kaymalar, ekstrakt bileşenlerinin g - Cu NP oluşumunda rol almasından (indirgeme ve oksitleme) ve NP yüzeyine bağlanmasından kaynaklanmaktadır.

4.3.3. Cu NP’lerin X-ışını Difraksiyonu Analizi (XRD)

Sentezlenen g - Cu NP’lerin XRD ölçümleri yapılarak kristal yapısı ve faz saflığı incelenmiştir (Şekil 4.12 ve 4.13).



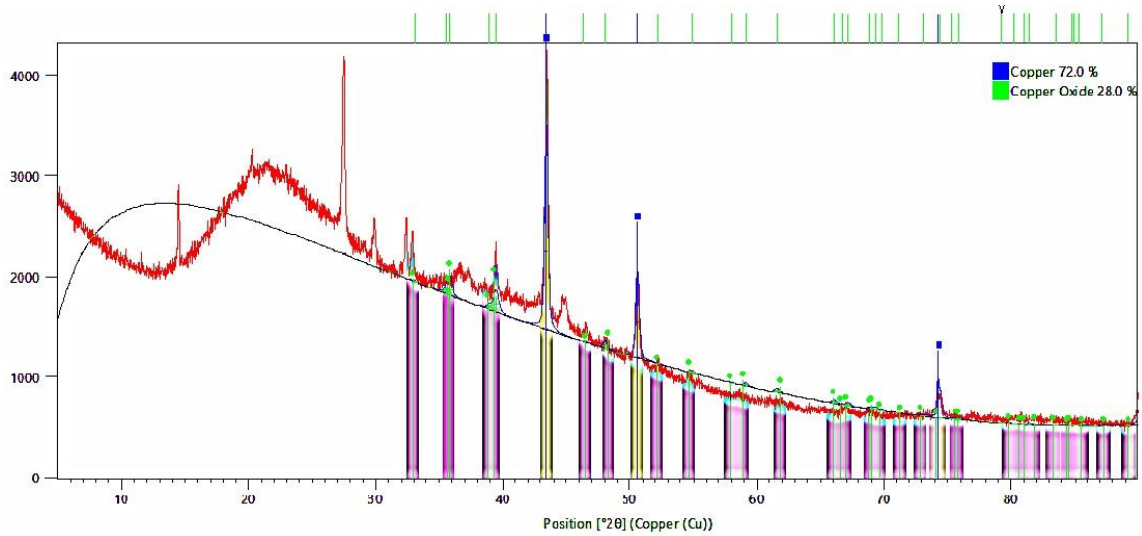
Şekil 4.12. g - Cu NP örneğinin XRD spektrumu



Şekil 4.13. g - Cu NP örneğinin XRD spektrumu pik listesi

XRD spektrumlarındaki keskin pikler g - Cu NP' lerin kristalinitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Elde edilen spektrum sonucuna göre, ICSD: 655129 numaralı karttaki açı değerleri $2\theta = 43.4^\circ$ (111), 50.6° (002), 74.4° (022); metalik Cu kristal yapısına karşılık gelmektedir (Yates ve ark., 1933). ICSD: 628618 numaralı karttaki açı değeri $2\theta = 32.4^\circ$ (110), 39.4° (111); CuO kristal yapısına karşılık gelmektedir (Forsyth ve ark., 1991). 30° nin altındaki tanımlanamayan piklerin ekstraktan kaynaklandığı düşünülmektedir (Khan ve ark., 2020).

XRD sonuçlarına göre ayrıca Rietveld analizi de yapılmıştır ve Cu ve CuO % bileşimleri de hesaplanmıştır (Şekil 4.14).

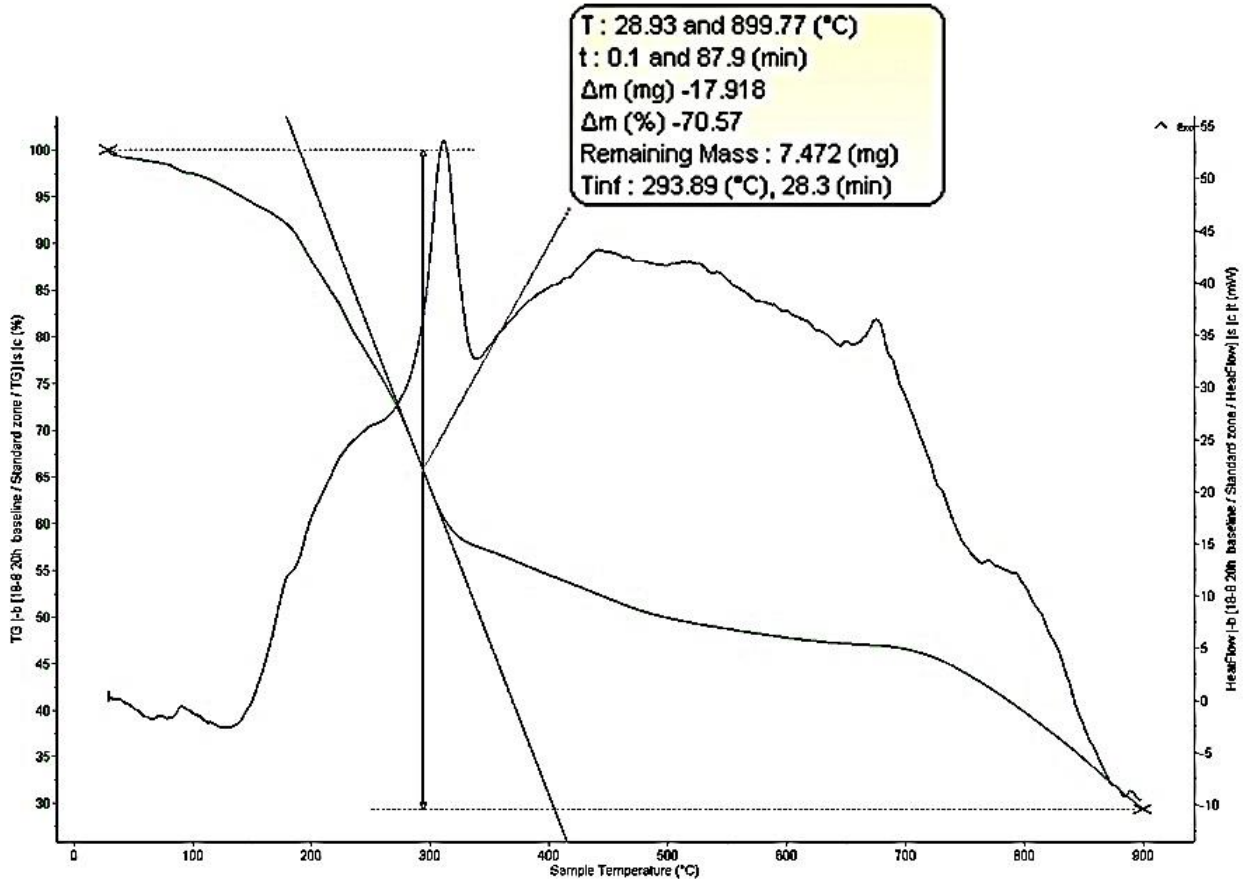


Şekil 4.14. Sentezlenen nanoparçacık örneğinin XRD deseni (Rietveld analizi)

Rietveld analizine göre, sentezlenen g - Cu NP' ler %72 metalik Cu ve %28 CuO fazından oluşmaktadır. Bakır kolay oksitlenen bir element olduğu için CuO fazı da kristal yapının içinde genellikle bulunmaktadır (Rajesh ve ark., 2016).

4.3.4. Cu NP'lerin Termal Gravimetrik Analizi (TGA)

TGA ölçümü ile örneğe ait erime noktası, camısı geçiş sıcaklığı, nem, saflık, dönüşüm sıcaklığı, ısı kararlılığı ve oksidatif kararlılık gibi bilgiler elde edilebilmektedir (Gond ve ark., 2021). Yeşil Cu NP örneğinin ısısal bozunma davranışı TGA ile incelenmiştir (Şekil 4.15).

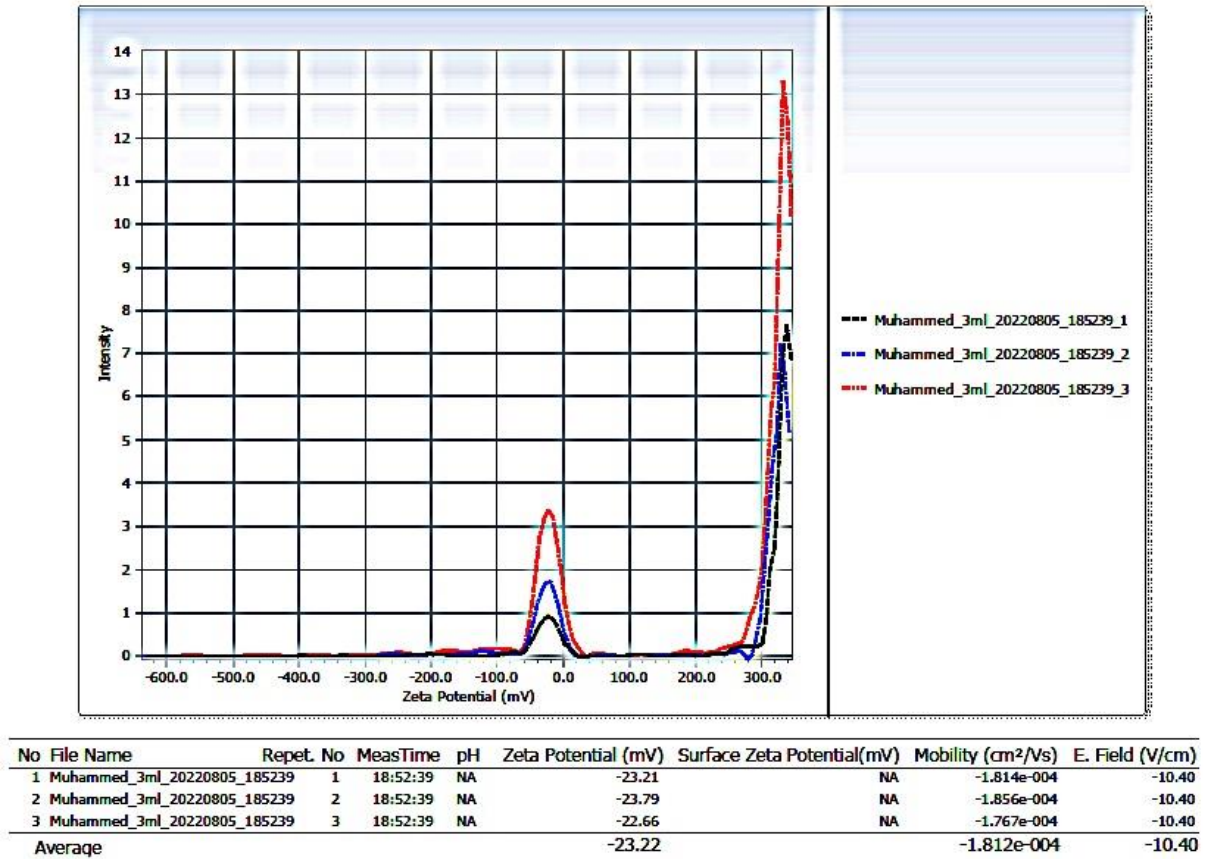


Şekil 4.15. g - Cu NP'nin TGA analizi

TGA kütle kaybı-sıcaklık grafiğinden g- Cu NP örneğinin 20 ile 900 °C sıcaklık aralığında %70,57 kütle kaybına uğradığı görülmüştür. Bu sonuç, g - Cu NP süspansiyonunun içerdiği bitki ekstraktından gelen organik bileşenlerin yüzdesini vermektedir.

4.3.5. Yeşil Cu NP'lerin Zeta Potansiyel ölçümü

Sentezlenen g - Cu NP' lerin sulu çözeltide kararlılıklarının belirlenmesi amacıyla yüzey karakterizasyonu yapılmıştır. Zeta potansiyel ölçüm cihazı ile g - Cu NP' lerin yüzey yükleri üç tekrarlı olarak ölçülmüştür (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. g - Cu NP örneğine ait zeta potansiyeli grafiği

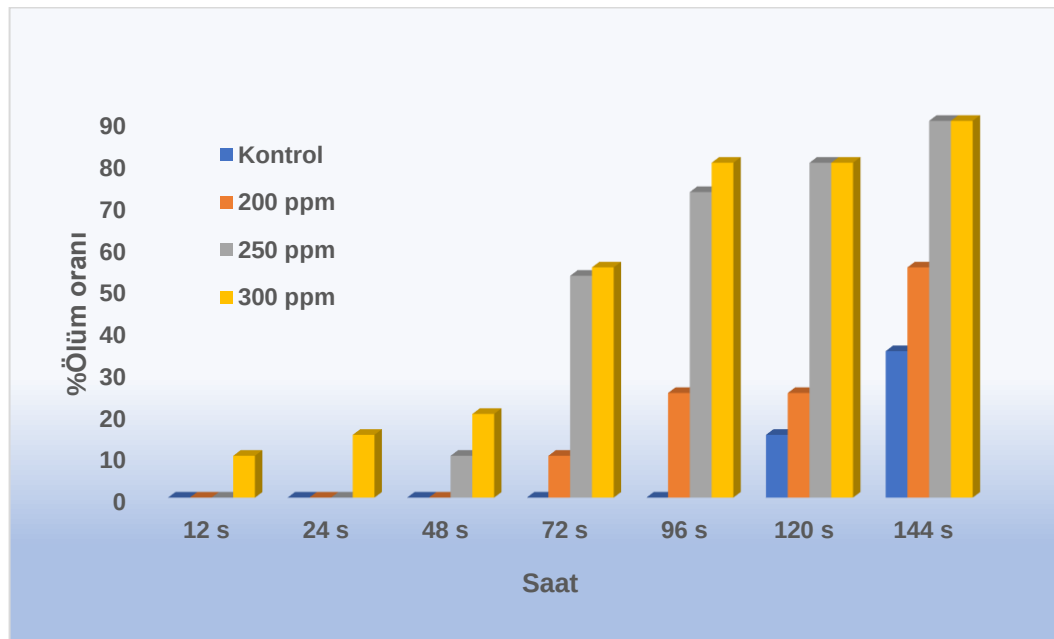
Sulu çözeltideki g - Cu NP örneğinin zeta potansiyeli ortalama - 23.22 mV olarak ölçülmüştür. Bitki ekstraktı içeriğindeki polifenol gruplarının yüzeyi stabilize etmesinden dolayı yüzey yükünün negatif olduğu düşünülmektedir (Yusefi ve ark., 2021). Zeta potansiyel değeri 30 mV ve üzeri zeta potansiyeli değerleri yüzey yük yoğunluğunun fazla olduğunun göstergesidir. Bu sayede NP' ler aglomere olmazlar (Clogston ve Patri, 2011; Honary ve Zahir, 2013). NP yüzey yükünün sağladığı potansiyel değeri (-23.22 mV) sınır değere yakın bulunmuştur ve NP örneğine yeterli elektrostatik kararlılık sağlayarak haftalarca stabil kalmasını sağlamıştır.

4.3.6. İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP - MS)

Biyoassay uygulamalarında kullanılacak NP süspansiyonunun derişimi, ICP - MS cihazı ile belirlenmiştir. ICP - MS ölçümü için NP' ler HCl içinde vorteksenerek parçalanmıştır. Cu derişimi tayininden sonra, farklı derişimlerde g - Cu NP süspansiyonu hazırlamak için, gerekli seyreltmeler deiyonize su ile yapılmıştır.

4.4. Kapra Böceğini g - Cu NP ile Besleme Biyoassayı

Geçmiş çalışmalarda, Ag NP'ler (Almadiy ve ark. 2018), silikon oksit (SNP'ler), alüminyum oksit (ANP'ler) ve çinko oksit (ZNP'ler) (Raduw ve Mohammed, 2020), silika NP'ler (Ziaee ve Babe Amir-Satehi 2020), AEROSIL 200 (Abdelfattah ve Zein 2019), Cu NP'lerin şimdiye kadar uygulanmadığı *T. granarium*'a karşı uygulanmıştır. 200, 250 ve 300 ppm konsantrasyonlardaki g - Cu NP eklenmiş buğday taneleri ile beslenen *T. granarium* erginlerinde gelişen insektisit etkisi her 12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saatte gözlenmiştir. NP konsantrasyonu ve maruz kalma süresi arttıkça, böceklerin ölüm oranının da önemli ölçüde arttığı görülmüştür. LC₅₀ değeri 250 ve 300 ppm konsantrasyon uygulamalarından 72 saat sonra tespit edilmiştir. LC₉₀ değeri, hem 250, hem de 300 ppm konsantrasyondaki muamelelerin 144. saatinden sonra bulunmuştur. 200 ppm'lik konsantrasyonun LC₅₀ değeri 144. saatin sonunda tespit edilmiştir. Kontrol örneklerinde 120. saate kadar herhangi bir ölüm görülmemiştir. Böylece hem 250, hem de 300 ppm'deki konsantrasyonların 72. saatte LC₅₀ ölüm oranı ile ergin böceklerde ölüme neden olduğu aşikârdır. Ayrıca, hem 250 ppm, hem de 300 ppm konsantrasyonları 120. saatten sonra benzer oranda insektisit etkisi sağlamıştır. Biyoassay sonuçlarına göre, g – CuO NP'lerin farklı konsantrasyonlardaki uygulamaları *T. granarium*'a karşı insektisidal bir ajan özelliği göstermiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Kapra böceğinin g - Cu NP'lar ile beslenmesi sonrası elde edilen ölüm oranları

Dang, zika ve chikungunya hastalık vektörü *Aedes aegypti* üzerinde *Tridax procumbens*'in yaprak ekstraktı kullanılarak yeşil sentezlenmiş CuO - NP'lerin larvisidal aktivitesi Selvan ve ark., tarafından 2018 yılında araştırılmıştır. Araştırmacılar yüksek bir ölüm oranıyla CuO NP'lerin güçlü bir larvisidal etkisini rapor etmişlerdir. *Artocarpus heterophyllu*'nun ıslak yapraklarından yapılan Cu NP biyosentezinin *Aedes aegypti*'nin birinci ve dördüncü dönem larvalarına karşı uygulanması sonucu, oldukça insektisidal etkiler tespit edilmiştir (Agnita Sharon ve ark., 2018). Sambong (*Blumea balsamifera*) ekstraktının aracılık ettiği sentezlenmiş g - Cu NP'lere maruziyetten sonraki 12 saat içinde, meyve sineklerinde %25 - 100 arasında değişen ölüm oranları tespit edilmiştir (Paragas ve ark., 2020). *Annona squamosa* L. tohumundan sentezlenen Cu NP'lerin *Anopheles stephensi*, *Tenebrio molitor* ve hedef olmayan *Artemia nauplii*'ye karşı insektisidal etkinliği Vivekanandhan ve ark., (2021a) tarafından rapor edilmiştir. Cu NP'lerin böcek larvalarını kontrol etmede ve hedef olmayan *Artemia nauplii*'ye yönelik toksisiteyi azaltmada önemli bir etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Böcek kontrolünde *A. squamosa* L. tohumundan elde edilen Cu NP'lerin kullanılmasının daha hızlı, daha güvenli ve daha yeşil bir seçenek olabileceği sonucuna varılmıştır. *Lantana camara* ekstraktı ile sentezlenen 20 ppm g - CuNP'ler, *Anophel* sivrisineklerinde %100 larva ölümüne sebep olmuştur. Bununla birlikte, 140 ppm oranında tek başına bitki ekstraktı kullanıldıktan sonra yine aynı etki gözlenmiştir (Abd El Hafiz ve ark. 2019). İki noktalı örümcek akarı *Tetranychus urticae* (TTSM) Koch tarla, sera, sebze ve meyvelerin en önemli tarımsal zararlılarından biridir. Dorri ve ark. (2018), 5 farklı konsantrasyonda (0 g/l, 1 g/l, 2.5 g/l, 4 g/l ve 5,5 g/l) bakır nanokapsül (Cu_2O) püskürterek TTSM'yi kontrol altına almaya çalışmıştır. CuO nano-kapsülünün uygulanmasından sonra TTSM popülasyonunun önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir (Dorri ve ark. 2018).

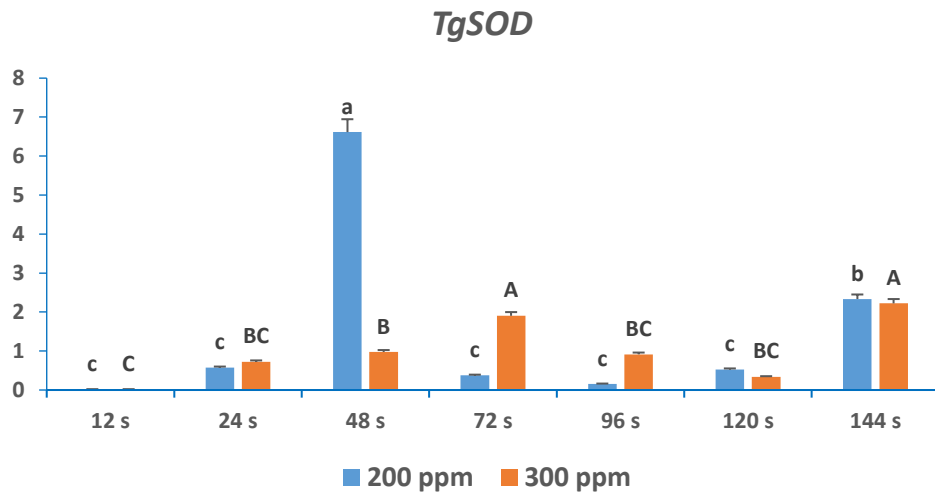
Geniş bir potansiyel alan yelpazesinde farklı tipte NP'lerin biyosentezlenmesi sadece bitkilerle sınırlı değildir. Geçmiş bir çalışmada, El-Saadony ve ark. (2020), *Pseudomonas fluorescens* suşu kullanarak 10 ila 70 nm arasında değişen boyutlarda Cu-NP'ler biyosentezlemiştir ve bu Cu-NP'lerin çok düşük konsantrasyonla kayda değer bir insektisidal etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Depolanan ürün zararlısı *T. castaneum*'a karşı 5 günlük muamele sonunda LC_{50} değeri 37 ppm olarak bulunmuştur. Ayrıca, bu biyosentezlenmiş Cu-NP'lerin kimyasal olarak sentezlenmiş Cu-NP'lerden daha etkili olduğunun sonucuna da ulaşılmıştır (El-Saadony ve ark., 2020). Badawy ve ark. (2021), *Aspergillus niger* suşunun (G3-1) metabolitlerini kullanarak CuO - NP'leri

sentezlemiş ve bunların depo zararlıları *Sitophilus granarius* ve *Rhyzopertha dominica*'ya karşı insektisidal aktivitelerini doza ve zamana bağlı şekillerde incelemişlerdir. CuO - NP muamelesi, böcekler *S. granarius* ve *R. dominica* üzerinde sırasıyla %55 - 94.4 ve %70 - 90 ölüm oranlarına neden olmuştur. Entomopatojenik *Metarhizium robertsii* bazlı biyosentezlenmiş, 15.67 - 62.56 nm boyutlu, g - Cu NP'ler *Anopheles stephassi*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* ve *Tenebrio molitor*'un dâhil olduğu böcek zararlılarına karşı önemli insektisidal aktiviteler göstermiştir. LC₉₀ konsantrasyonlarının sırasıyla 23.717 µg/mL, 65.144 µg/mL, 14.997 µg/mL ve 29.363 µg/mL dozları olduğu bulunmuştur (Vivekanandhan ve ark., 2021b). *Fusarium proliferatum* (YNS2) aracılığı ile biyosentezlenen g - Cu NP'ler, *Anophelex stephassi*, *Aedes aegypti* ve *Culex quinquefasciatus* larvalarına karşı önemli larvisidal aktivite göstermiştir. g - Cu NP'lerin LC₅₀ değeri sırasıyla 39.25 µg/ml, 81.34 µg/ml ve 21.84 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Kalaimurugan ve ark., 2019). Başka bir çalışmada, *Morganella morganii* hücre içermeyen süpernatant bakterisinin aracılık ettiği g - Cu NP'lerin sivrisinek larvaları üzerindeki larvisidal aktiviteleri test edilmiştir. Zamana ve doza bağlı olarak, sentezlenen g-Cu NP'lerin böcekler üzerinde toksik etkisi rapor edilmiştir (Lalitha ve ark., 2020). Öte yandan, Cu NP'lerin pestisit β-sipermetrin ile kombinasyonunun *Spodoptera litura* larvaları üzerindeki insektisidal etkinliği arttırdığı bildirilmiştir (Lu ve ark. 2019).

Bu çalışma ile *Origanum* sp.'den sentezlenen g - Cu NP'ler ilk defa *T. granarium* türü üzerinde insektisit etkisi araştırılmak üzere uygulanmıştır. g - NP'lerin depo zararlıları ile mücadelede ve bitki koruma alanlarında böceklerle karşı uygulanması, oldukça yeni ve gelişmekte olan bir alandır. NP'lerin insektisit özellikleri, fizyolojik değişikliklere neden olan morfolojik özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Nel ve ark., 2006; Yasur ve ark., 2015). Metaller normal koşullarda dâhil olmadıkları biyokimyasal reaksiyonlara dâhil olarak, organizma üzerinde toksik etkilere neden olurlar (Hopkin, 1989). Bu tez çalışması sonucunda NP'lerin uygulandığı konsantrasyonlardaki ölüm oranlarının böceklerde türden türe ve NP sentez yöntemine göre farklılık gösterdiği sonucuna ulaşılabilir. Gerçekleştirilen geçmiş çalışmalar ve bu tez kapsamında elde edilen sonuçlara göre, NP'lerin böcek kontrolü ve müteakip tarımsal iyileştirme çalışmaları için umut verici bir biyokontrol ajan olabileceği fikri ortaya çıkmaktadır.

4.5. Cu NP Muamelesi Sonrası *TgSOD*, *TgCAT* ve *TgGPX* Genlerinin İfade Seviyesi Analizi

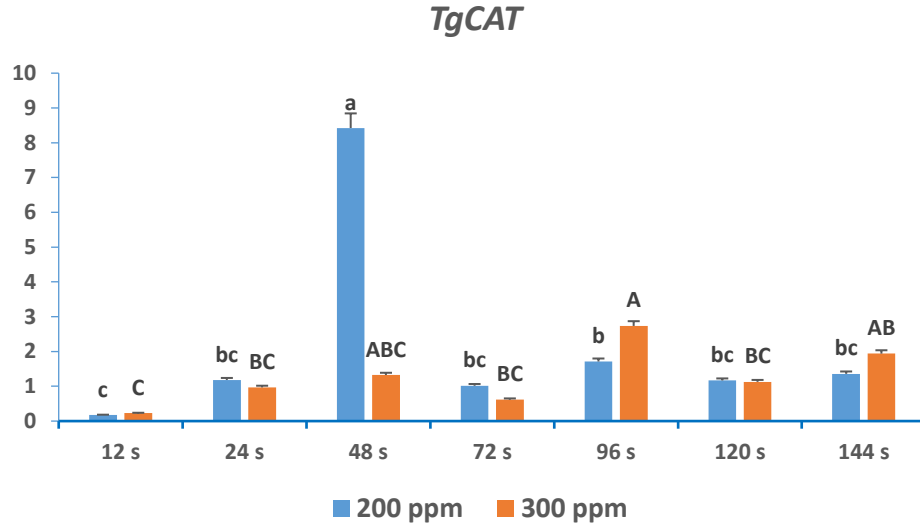
En yüksek *TgSOD* transkript miktarı, Kapra böceklerini 200 ppm konsantrasyonda g - Cu NP'lerle muamele edilmiş buğday taneleri ile beslemenin sırasıyla 48. ve 144. saatinden sonra tespit edilmiştir. 200 ppm konsantrasyon muamelesinin 12., 24., 72., 96. ve 120. saatlerinden sonra *TgSOD* seviyesi aşağı yönde regüle edilmiştir. En yüksek *TgSOD* transkript miktarı, *T. granarium* erginlerinde 300 ppm konsantrasyonda g - Cu NP'ler ile muamele edilmiş buğday taneleri ile beslemenin 144. ve 72. saatlerinden sonra tespit edilmiştir. Gen ifade düzeyi 300 ppm uygulamanın 48. ve 96. saatlerinden sonra hemen hemen duyarsız miktarda bulunmuştur. Ayrıca, 300 ppm konsantrasyon uygulamasının 12., 24. ve 120. saatlerinden sonra *TgSOD*'un mRNA seviyesi aşağı yönde regüle edilmiştir (Şekil 4. 20).



Şekil 4.18. g - Cu NP muamelesi sonrası *TgSOD* geni ifade seviyeleri

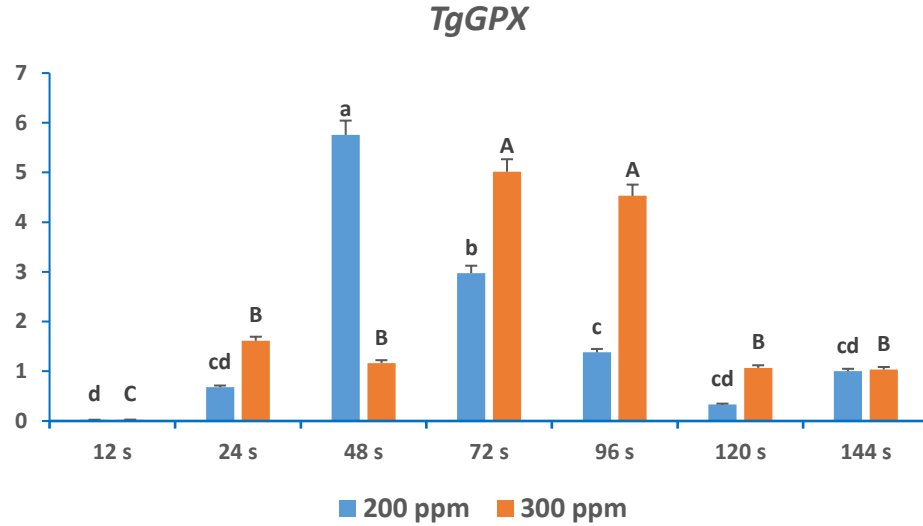
TgCAT ifade seviyesi, 200 ve 300 ppm g - Cu NP ile muamele edilmiş buğday taneleri ile beslenen pupadan yeni çıkmış *T. granarium* erginleri üzerinde farklı zaman noktalarında (12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat) incelenmiştir. Sonuçlar, en fazla (8.4 kat) *TgCAT* ifadesinin, 200 ppm konsantrasyondaki g - Cu NP ile muamele edilmiş buğday taneleri ile beslenmenin 48. saatinden sonra tespit edildiğini göstermiştir. *TgCAT* ifadesi ayrıca, 200 ve 300 ppm konsantrasyonlarda 96 saat besleme işleminden sonra yukarı doğru regüle olmuştur. Her iki konsantrasyon için muamelenin 144. saatinden sonra hafif yukarı doğru *TgCAT* ifade seviyeleri gözlenmiştir. Her iki uygulamanın 24.

ve 120. saatini, 200 ppm'in 72. saatini ve 300 ppm konsantrasyonunun 48. saatini takiben izlenen gen seviyeleri hemen hemen duyarsız bulunmuştur. Diğer taraftan, 200 ve 300 ppm konsantrasyon uygulamalarının 12. saatinden sonra ve 300 ppm uygulamasının 72. saatinden sonra *TgCAT* aşağı yönde regüle edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.19. g - Cu NP muamelesi sonrası *TgCAT* geni ifade seviyeleri

En yüksek *TgGPX* transkript miktarı, 200 ppm konsantrasyondaki g - Cu NP ile muamele edilmiş buğday taneleri ile besleme işleminin sırasıyla 48., 72. ve 96. saatlerinden sonra gözlenmiştir. *TgGPX* ifadesi, 200 ppm konsantrasyon muamelesinin 144. saatinden sonra neredeyse duyarsız olarak tespit edilmiştir. *TgGPX*'in ifade seviyesi, 200 ppm uygulamanın 12., 24., 120. saatinden sonra aşağı yönde regüle edilmiştir. *TgGPX*, 300 ppm konsantrasyonda g - Cu NP'ler ile muamele edilmiş buğday taneleri ile beslemenin sırasıyla 72., 96. ve 24. saatlerinden sonra en yüksek seviyede ifade edilmiştir. *TgGPX*'in ifade seviyesinin 300 ppm uygulamasının 48., 120. ve 144. saatlerinden sonra neredeyse duyarsız olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, 300 ppm konsantrasyon uygulamasının 12. saatinden sonra aşağı yönde regüle edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.20. g - Cu NP muamelesi sonrası *TgGPX* geni ifade seviyeleri

Antioksidan genlerinin, ROS maddelerini ortadan kaldırılması dolayısı ile böcekler arasında direnç gelişiminde çok önemli roller vardır. Sezer Tuncsoy ve ark., (2019) oksidatif stresin nano ölçekli parçacıkların toksisitesinde yer alan ana mekanizmalardan biri olduğunu öne sürmüşlerdir. Organizmalar toksisitenin üstesinden gelmek için, toksik maddelerden kaynaklanan ROS'u detoksifiye etmek ve ortadan kaldırmak için serbest radikal süpürücüler ve antioksidan enzimlerden oluşan bir antioksidan koruma sistemi ile donatılmıştır (Zeng ve ark., 2020). SOD, CAT, GPX, GST ve AChE oksidatif biyobelirteçleri, model organizma *G. mellonella*'nın orta bağırsak ve yağ gövdesindeki Cu birikimine yanıt olarak incelenmiştir. Sonuçta, antioksidan enzimlerin böceklerin ağır metallerle zehirlenmesinden güçlü bir şekilde etkilendiği gösterilmiştir (Sezer Tuncsoy ve ark, 2019). Başka bir çalışma, *Bombyx mori*'nin CuO ve ZnO NP'lerine maruz kalmasının CAT, SOD, GST, ataksin ve alfa-amilaz genlerinin ifadelerinde değişmeye yol açtığını göstermiştir (Muhammad ve ark., 2022). Ramadan ve ark. ise (2020), *Musca domestica* larvalarının SOD, CAT, GPX ve GST enzimlerinin aktiviteleri üzerinde gümüş ve kitosan NP'lerinin önemli etkilerini bildirmiştir.

CAT genini bol miktarda eksprese eden sirke sineği (*Drosophila melanogaster*), H₂O₂'ye karşı geliştirilmiş bir dirence sahiptir. Buna karşılık, CAT aktivitesi olmayan sirke sinekleri yüksek seviyelerde H₂O₂ oranına, daha kısa süreli canlılığa ve yaşam sürelerine sahiptir. Benzer sonuçlara, sivrisinek *Culex pipiens* için de rastlanmıştır; CAT ifadesi RNA interferans yolu ile inhibe edildiğinde ergin sivrisineğin hayatta kalma

oranının önemli ölçüde düştüğü rapor edilmiştir (Li ve ark., 2021). Cüce chichlid balıkları CuO NP'lere maruz kaldığında ise, yükselen CAT aktivitesi göstermiştir (Rashdan, 2021).

Böceğin g - Cu NP'lere maruz kalmasının farklı saatlerinde *TgGPX*'in yukarı regüle edilmiş ifadesi, bu genin g - Cu NP'lerinden yüksek oranda etkilendiğini göstermektedir. Ayrıca, metal NP'lerinin farklı organizmalarda GPX ifadesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, *Chironomus riparius*'un kadmiyuma maruz kalması fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (CrPHGPx1) ifadesini arttırmıştır. Bu sonuç, CrPHGPx1'in redoks dengesinde diferansiyel olarak düzenlendiğini öne sürmüştür (Nair ve ark., 2012). Bu tez çalışmasında elde edilen yüksek *TgGPX* ifade seviyeleri, g - Cu NP'lerin *T. granarium* üzerindeki toksik etkisini açıkça göstermektedir.

Oksidatif strese karşı artan biyolojik reaksiyonlar, DNA hasarı ve parçalanmasını, hücre ölümünü, lipid peroksidasyonunu ve lizozomal membran kararsızlığını içerebilir. Bu biyolojik reaksiyonlar, NP'lerin zararlı etkilerini araştırmak için kullanılabilir (Rashdan, 2021). Bu enzim kodlayan genlerin değişen ifadeleri, NP'lerin neden olduğu stresin göstergeleridir ve bunların neden olabileceği potansiyel toksisiteyi işaret etmektedir (Cheng ve ark., 2018).

g - Cu NP'ler ile muamele edilmiş buğday taneleri ile beslenen *T. granarium* erginlerinde artan *TgCAT*, *TgGPX* ve *TgSOD* gen ifade seviyeleri, bu erginlerin oksidatif strese maruz kaldıklarını ve bir antioksidan tepki geliştirdiklerini göstermektedir. Örneğin, geçmişte yapılan bir çalışmada CuO NP'lerin hücre içi ROS oluşumunu artırarak öldürücü özellik gösterdiklerini ortaya koymuştur (Ruiz ve ark., 2015). Bu çalışmada, g - Cu NP'lerin *TgSOD*, *TgCAT* ve *TgGPX* antioksidan genlerini önemli ölçüde yukarı yönde regüle etmesinin, g - Cu NP'lerin potansiyel insektisidal etkinlikleri ile ilişkili olabileceği sonucuna varılabilir. Ayrıca, genleri kodlayan antioksidan enzimlerin yüksek miktarda ifadesinin, NP'lerin neden olduğu ROS ürünleri ile doğrudan ilişkili olduğu önerilebilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Depolanan ürün zararlıları, depolanan ürünlerin miktarını ve kalitesini yok etmektedir. Bu sorun, zararlılar tarafından geliştirilen insektisitlere karşı direnç ve bu kimyasal pestisitlerin istenmeyen ekonomik, çevresel ve sağlık tehlikeleri ile daha da kötüleşmektedir. Son yıllarda, NP'lerin zararlıları kontrol etmek için umut verici bir alternatif sağlayabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, NP'lerin yaygın bir şekilde kullanılmakta olan geleneksel pestisitlerin yetersizliğini gidereceği varsayılmaktadır. Bu çalışmada, *Origanum* sp. bitki yaprağı ekstraktı kullanılarak g - Cu NP'ler başarılı bir şekilde sentezlenmiştir.

Sentezlenen NP'ler UV-Görüntüleme, TEM, FESEM, EDX, XRD ve FTIR analitik teknikleri ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen NP'lerin boyutunun, TEM analizi ile 6.59 ± 0.59 nm olduğu görülmüştür. UV-Görüntüleme absorpsiyon zirvelerinin 385 nm'de olduğu tespit edilmiştir. FTIR analizi, g - Cu NP'lerin kaplanmasından sorumlu olan birçok bitki biyoaktif molekülü var olduğunu göstermiştir. Ayrıca, XRD ve EDX analizi ile sentezlenen g - Cu NP'lerin kristal yapıda olduğu ve Cu ve diğer içerikler gösterilmiştir. Bu çalışma, *Origanum* sp. ekstraktının g - Cu NP'lerin sentezlenmesinde verimli bir biyo-kaplama ajanı olarak kullanımını bildirmektedir. Geçmişte *Origanum* sp.'den Cu NP sentezinin gerçekleştirildiği üç farklı araştırmaya kıyasla (Sankar ve ark., 2014; Aguilar ve Rosas, 2019; Alshehri ve Malik, 2020), bu çalışma küçük boyutlu (<10), homojen boyut dağılımlı ve kararlı g - Cu NP'lerin elde edilmesi açısından ilktir. Ayrıca, *Origanum* sp. ekstraktından sentezlenmiş Cu NP'lerin, bir böcek zararlısına karşı insektisit etkisini araştırmak üzere gerçekleştirilmiş ilk çalışmadır.

Sentezlenen NP'lerin Kapra böceğine karşı insektisit etkinliği üzerine yapılan bu çalışma, g - Cu NP'lerin zararlıda sırasıyla 72 ve 144 saatlik uygulamalardan sonra 200 ve 300 ppm konsantrasyonlarda %50 ve %90 ölüme neden olduğunu, dolayısı ile bu NP'lerin Kapra böceği için potansiyel ve alternatif bir böcek kontrol ajanı olarak kullanabileceği fikrini ortaya atmaktadır. g - Cu NP'lerin uygulanmasından sonra *TgCAT*, *TgGPX* ve *TgSOD* genlerinin çeşitli zamanlarda bol miktardaki ifadesi, NP'lerin böcekte

ROS stresinden sorumlu olduğunu ve g - Cu NP'lerin Kapra böceği üzerindeki toksik etkisini göstermiştir.

5.2 Öneriler

Bu bulgulara dayanarak, g - Cu NP'lerin zararlı üzerinde neden olduğu önemli ölüm oranlarına bakarak, bu NP'lerin zararlının yönetiminde etkili olabileceği ve entegre zararlı yönetiminin (IPM) potansiyel temel bir bileşeni hâline gelmesi önerilebilir. Bununla birlikte, g – Cu NP ve diğer NP türlerinin Kapra ve diğer depo zararlıları üzerindeki etkilerine ilişkin sınırlı çalışmaların varlığı nedeniyle, bu konuda daha fazla araştırma yapılması ve fonksiyonel çalışmaların gerçekleştirilmesi önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Abd El Hafiz Hassanain, N., Shaapan, M., Abd El Hafiz Hassanain, M., ve Zaky, S., 2019, Comparison Between Insecticidal Activity of *Lantana camara* Extract and its Synthesized Nanoparticles Against Anopheline mosquitoes, *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 22(7), 327-334.
- Abdelfattah, N. A., ve Zein, D. M., 2019, Biological studies and toxicity experiments of AEROSIL 200 nanoparticles on adults and larvae of some stored grain insects, *International Journal of Entomology Research*, 4(1), 103-108.
- Abdel-latif, H. M. R., Dawood, M. A. O., Mahmoud, S. F., Shukry, M., Noreldin, A. E., Ghetas, H. A., ve Khallaf, M. A., 2021, Copper Oxide Nanoparticles Alter Serum Biochemical Indices, Induce Histopathological Alterations, and Modulate Transcription of Cytokines, HSP70, and Oxidative Stress Genes in *Oreochromis niloticus*, *Animals* 2021, 11(3), 652.
- Abd-Elsalam, K. A., 2022, Copper-based nanomaterials: Next-generation agrochemicals: A note from the editor, *Copper Nanostructures: Next-Generation of Agrochemicals for Sustainable Agroecosystems*, Elsevier, 1–14.
- Adhikari, T., Sarkar, D., Mashayekhi, H., ve Xing, B., 2016, Growth and enzymatic activity of maize (*Zea mays* L.) plant: solution culture test for copper dioxide nano particles, *Journal of Plant Nutrition*, 39(1), 99–115.
- Agnita Sharon, E., Velayutham, K., ve Ramanibai, R., 2018, Biosynthesis of Copper Nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* against Dengue Vector *Aedes aegypti*, *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 2455(1716).
- Agrawal, S., ve Rathore, P., 2014, Nanotechnology pros and cons to agriculture: a review, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(3), 43–55.
- Aguilar, M. S., ve Rosas, G., 2019, A new synthesis of Cu₂O spherical particles for the degradation of methylene blue dye. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 11, 100195.
- Ahmed, S., Saifullah, Ahmad, M., Swami, B. L., ve Ikram, S., 2016, Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(1), 1–7.
- Akintelu, S. A., Folorunso, A. S., Folorunso, F. A., ve Oyebamiji, A. K., 2020, Green synthesis of copper oxide nanoparticles for biomedical application and environmental remediation, *Heliyon*, 6(7), e04508.
- Alavi, M., Karimi, N., ve Valadbeigi, T., 2019, Antibacterial, Antibiofilm, Antiquorum Sensing, Antimotility, and Antioxidant Activities of Green Fabricated Ag, Cu, TiO₂, ZnO, and Fe₃O₄ NPs via *Protoparmeliopsis muralis* Lichen Aqueous Extract against Multi-Drug-Resistant Bacteria, *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 5(9), 4228–4243.

- Al-Esawy, M. T., Alshukri, B. M., ve Kadhim, B. J., 2021, Carbon nanotubes as control agents against the Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), *Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences*, 16(4), 1–9.
- Almadiy, A. A., Nenaah, G. E., ve Shower, D. M., 2018, Facile synthesis of silver nanoparticles using harmala alkaloids and their insecticidal and growth inhibitory activities against the khapra beetle, *Journal of Pest Science*, 91(2), 727-737.
- Alshehri, A. A., ve Malik, M. A., 2020, Facile one-pot biogenic synthesis of Cu-Co-Ni trimetallic nanoparticles for enhanced photocatalytic dye degradation, *Catalysts*, 10(10), 1138.
- Amaliyah, S., Pangesti, D. P., Masruri, M., Sabarudin, A., ve Sumitro, S. B., 2020, Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using *Piper retrofractum* Vahl extract as bioreductor and capping agent, *Heliyon*, 6(8), e04636.
- Amezian, D., Nauen, R., ve Le Goff, G., 2021, Comparative analysis of the detoxification gene inventory of four major *Spodoptera* pest species in response to xenobiotics, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 138, 103646.
- Ashraf, H., Anjum, T., Riaz, S., Ahmad, I. S., Irudayaraj, J., Javed, S., Qaiser, U., ve Naseem, S., 2021, Inhibition mechanism of green-synthesized copper oxide nanoparticles from *Cassia fistula* towards *Fusarium oxysporum* by boosting growth and defense response in tomatoes, *Environmental Science: Nano*, 8(6), 1729–1748.
- Atar, H., ve Hatice Ç., Bioactive compounds of oregano seeds, *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, Academic Press, 2020. 73-77.
- Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G., Benelli, G., Losic, D., Usha Rani, P., ve Desneux, N., 2018, Nanoparticles for pest control: current status and future perspectives, *Journal of Pest Science*, 91(1), 1–15.
- Athanassiou, C.G., Phillips, T.W. and Wakil, W., 2019. Biology and control of the khapra beetle, *Trogoderma granarium*, a major quarantine threat to global food security. *Annual Review of Entomology*, 64, 131-148.
- Badawy, A. A., Abdelfattah, N. A. H., Salem, S. S., Awad, M. F., ve Fouda, A., 2021, Efficacy assessment of biosynthesized copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) on stored grain insects and their impacts on morphological and physiological traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) plant, *Biology*, 10(3), 1–20.
- Bahmani, M., 2019, A New Method for Promoting Biologic Synthesis and Reducing the Size of Titanium Dioxide Nanoparticles (TiO₂ NPs) Synthesized by *Origanum vulgare*, *Plant Biotechnology Persa*, 1(1), 10–12.
- Bakshi, M., ve Kumar, A., 2021, Copper-based nanoparticles in the soil-plant environment: Assessing their applications, interactions, fate and toxicity, *Chemosphere*, 281, 130940.
- Bala, N., Saha, S., Chakraborty, M., Maiti, M., Das, S., Basu, R. and Nandy, P., 2015. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Hibiscus subdariffa* leaf extract:

- effect of temperature on synthesis, anti-bacterial activity and anti-diabetic activity, *RSC Advances*, 5(7), 4993-5003.
- Bandeira, M., Giovanela, M., Roesch-Ely, M., Devine, D.M. and da Silva Crespo, J., 2020. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 15, 100223.
- Bedini, S., Farina, P., Napoli, E., Flamini, G., Ascrizzi, R., Verzera, A., Conti, B., ve Zappalà, L., 2021, Bioactivity of different chemotypes of oregano essential oil against the blowfly *Calliphora vomitoria* vector of foodborne pathogens, *Insects*, 12(1), 1–13.
- Bell, C. H., Wilson, S. M., ve Banks, H. J., 1984, Studies on the toxicity of phosphine to tolerant stages of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), *Journal of Stored Products Research*, 20(2), 111-117.
- Benedec, D., Oniga, I., Cuibus, F., Sevastre, B., Stiufiuc, G., Duma, M., Hanganu, D., Iacovita, C., Stiufiuc, R., ve Lucaciu, C. M., 2018, *Origanum vulgare* mediated green synthesis of biocompatible gold nanoparticles simultaneously possessing plasmonic, antioxidant and antimicrobial properties, *International Journal of Nanomedicine*, 13, 1041.
- Berwal, M. ve Ram, C., 2018, Superoxide dismutase: A stable biochemical marker for abiotic stress tolerance in higher plants, *Abiotic and biotic stress in plants*, 1-10.
- Boyer, S., Zhang, H., ve Lempérière, G., 2012, A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects, *Bulletin of Entomological Research*, 102(2), 213– 229.
- Burges, H. D., 1963, Studies on the dermestid beetle *Trogoderma granarium* Everts. VI.- Factors inducing diapause, *Bulletin of Entomological Research*, 54(3), 571-587.
- Chandrasekaran, R., Yadav, S. A., ve Sivaperumal, S., 2020, Phytosynthesis and Characterization of Copper Oxide Nanoparticles using the Aqueous Extract of *Beta vulgaris* L. and Evaluation of their Antibacterial and Anticancer Activities, *Journal of Cluster Science*, 31(1), 221–230.
- Chaudhry, M. Q., 1997, A Review of the Mechanisms Involved in the Action of Phosphine as an Insecticide and Phosphine Resistance in Stored-Product Insects, *Pesticide Science*, 49, 213–228.
- Cheng, J., Wang, C. Y., Lyu, Z. H., Chen, J. X., ve Lin, T., 2018, Identification and characterization of the catalase gene involved in resistance to thermal stress in *Hortivitea* using RNA interference. *Journal of Thermal Biology*, 78, 114–121.
- Chhipa, H., 2017, Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture, *Environmental Chemistry Letters*, 15(1), 15–22.
- Clogston, J. D., ve Patri, A. K, 2011., Zeta potential measurement in characterization of nanoparticles intended for drug delivery, *Humana Press*, 63-70.

- Dağeri, A., Öğreten, A. ve Güz, N., 2022, Depo Zararlısı *Trogoderma granarium*'da Karşılaştırmalı Transkriptom Analizi, *Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü*.
- Debnath, N., Das, S., Patra, P., Mitra, S., ve Goswami, A., 2012, Toxicological evaluation of entomotoxic silica nanoparticle, *Toxicological and Environmental Chemistry*, 94(5), 944 – 951.
- Debnath, N., Das, S., Seth, D., Chandra, R., Bhattacharya, S. C., ve Goswami, A., 2011, Entomotoxic effect of silica nanoparticles against *Sitophilus oryzae* L., *Journal of Pest Science*, 84(1), 99–105.
- Din, M. I., ve Rehan, R., 2017, Synthesis, Characterization, and Applications of Copper Nanoparticles, *Analytical Letters*, 50(1), 50–62.
- Ding, J.N., Zhang, H.H. and Chi, D.F., 2015, Effects of a pathogenic *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) strain on detoxifying and protective enzyme activities in *Xylotrechus rusticus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae, *Florida Entomologist*, 98(4), 1148-1156.
- Dobrucka, R., 2018, Antioxidant and Catalytic Activity of Biosynthesized CuO Nanoparticles Using Extract of *Galeopsidis herba*, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 28(3), 812–819.
- Dorri, H. R., Khaghani, S., Moghadam, A., Ghanbari, D., ve Bihamta, M. R., 2018, The Effect of Copper Nano-capsules on the Control of Two Spotted Spider Mite (Tetranychusurticae), *Journal of Nanostructures*, 8(3), 316-324.
- Dziewiecka, M., Karpeta-Kaczmarek, J., Augustyniak, M., Majchrzycki, Ł., ve Augustyniak- Jabłokow, M. A., 2016, Evaluation of in vivo graphene oxide toxicity for *Acheta domesticus* in relation to nanomaterial purity and time passed from the exposure, *Journal of Hazardous Materials*, 305, 30–40.
- Ealia, S. A. M., ve Saravanakumar, M. P., 2017, A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application, In *IOP conference series: materials science and engineering*, IOP Publishing, 263(3), p. 032019.
- El-Saadony, M. T., Abd El-Hack, M. E., Taha, A. E., Fouda, M. M. G., Ajarem, J. S., Maodaa, S. N., Allam, A. A., ve Elshaer, N., 2020, Ecofriendly synthesis and insecticidal application of copper nanoparticles against the storage pest *Tribolium castaneum*, *Nanomaterials*, 10(3), 587.
- Enayati, A. A., Ranson, H., ve Hemingway, J., 2005, Insect glutathione transferases and insecticide resistance, *Insect Molecular Biology*, 14(1), 3–8.
- Felton, G. W., ve Summers, C. B., 1995, Antioxidant systems in insects, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29(2), 187–197.
- Forsyth, J.B. ve Hull, S., 1991, The effect of hydrostatic pressure on the ambient temperature structure of CuO, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 3(28), p.5257.

- Gahlawat, G., ve Choudhury, A. R., 2019, A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes, *RSC Advances*, 9(23), 12944–12967.
- Gao, Z., Song, N., Zhang, Y., Schwab, Y., He, J., ve Li, X., 2018, Carbon Nanotubes Derived from Yeast-Fermented Wheat Flour and Their Energy Storage Application, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(9), 11386–11396.
- Gnanasangeetha, D., ve Suresh, M., 2020, A review on green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles, *Nature Environment and Pollution Technology*, 19(5), 1789–1800.
- Gond, R.K., Gupta, M.K. and Jawaaid, M., 2021. Extraction of nanocellulose from sugarcane bagasse and its characterization for potential applications. *Polymer Composites*, 42(10), 5400-5412.
- Gupta, S., ve Kataria, R., 2014, Morphometric analysis and Reproductive system studies of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), *International Journal of Scientific and Research Publications*, 5(1), 2250–3153.
- Guz, N., Toprak, U., Dageri, A., Oktay Gurkan, M., ve Denlinger, D. L., 2014, Identification of a putative antifreeze protein gene that is highly expressed during preparation for winter in the sunn pest, *Eurygaster maura*, *Journal of Insect Physiology*, 68, 30–35.
- Hahn, D. A., ve Denlinger, D. L., 2007, Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization, *Journal of Insect Physiology*, 53(8), 760-773.
- Hamel, D., Rozman, V., ve Liška, A., 2020, Storage of cereals in warehouses with or without pesticides, *Insects*, 11(12), 1–21.
- Haroun, S. A., Elnaggar, M. E., Zein, D. M., ve Gad, R. I., 2020, Insecticidal efficiency and safety of zinc oxide and hydrophilic silica nanoparticles against some stored seed insects, *Journal of Plant Protection Research*, 60(1), 77–85.
- Honary, S., ve Zahir, H., 2013, Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 265-273.
- Hopkin, S. P., 1989, Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. *Elsevier Applied Science Publishers*.
- Horie, M., ve Tabei, Y., 2021, Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity, *Free Radical Research*, 55(4), 331–342.
- Ibrahim, A. M., ve Ali, A. M., 2018, Silver and zinc oxide nanoparticles induce developmental and physiological changes in the larval and pupal stages of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(4), 1373-1378.
- Ismail, M. I. M., 2020, Green synthesis and characterizations of copper Nanoparticles, *Materials Chemistry and Physics*, 240, 122283.

- Jasrotia, P., Nagpal, M., Mishra, C. N., Sharma, A. K., Kumar, S., Kamble, U., Bhardwaj, A. K., Kashyap, P. L., Kumar, S., ve Singh, G. P., 2022, Nanomaterials for Postharvest Management of Insect Pests: Current State and Future Perspectives, *Frontiers in Nanotechnology*, 3, p.100.
- Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., ve Koocheki, A., 2014, Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties, *Food Hydrocolloids*, 36, 9–19.
- Kalaimurugan, D., Sivasankar, P., Lavanya, K., Shivakumar, M. S., ve Venkatesan, S., 2019, Antibacterial and Larvicidal Activity of *Fusarium proliferatum* (YNS2) Whole Cell Biomass Mediated Copper Nanoparticles, *Journal of Cluster Science*, 30(4), 1071–1080.
- Kamli, M. R., Malik, M. A., Srivastava, V., Sabir, J. S. M., Mattar, E. H., ve Ahmad, A., 2021, Biogenic ZnO Nanoparticles Synthesized from *Origanum vulgare* Abrogates Quorum Sensing and Biofilm Formation in Opportunistic Pathogen *Chromobacterium violaceum*, *Pharmaceutics*, 13(11), 1743.
- Kathad, U., ve Gajera, H., 2014, Synthesis of copper nanoparticles by two different methods and size comparison. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5(3), 533–540.
- Kavallieratos, N. G., Karagianni, E. S., ve Papanikolaou, N. E., 2019, Life history of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) on peeled barley, peeled oats and triticale, *Journal of Stored Products Research*, 84, 101–115.
- Khan, I., Saeed, K. and Khan, I., 2019, Nanoparticles: Properties, applications and toxicities, *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931.
- Khan, M., Khan, A. U., Rafatullah, M., Alam, M., Bogdanchikova, N., ve Garibo, D., 2022, Search for Effective Approaches to Fight Microorganisms Causing High Losses in Agriculture: Application of *P. lilacinum* Metabolites and Mycosynthesised Silver Nanoparticles, *Biomolecules*, 12(2), 174.
- Khan, M.R., Hoque, S.M., Hossain, K.F.B., Siddique, M.A.B., Uddin, M.K., ve Rahman, M.M., 2020, Green synthesis of silver nanoparticles using *Ipomoea aquatica* leaf extract and its cytotoxicity and antibacterial activity assay, *Green Chemistry Letters and Reviews*, 13(4), 303-315.
- Kim, B.Y., Kim, H.J., Lee, K.S., Seo, S.J. ve Jin, B.R., 2008, Catalase from the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis*: cDNA sequence, expression, and functional characterization, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(1), 183-190.
- Kobayashi, Y., Nojima, Y., Sakamoto, T., Iwabuchi, K., Nakazato, T., Bono, H., Toyoda, A., Fujiyama, A., Kanost, M.R. ve Tabunoki, H., 2019, Comparative analysis of seven types of superoxide dismutases for their ability to respond to oxidative stress in *Bombyx mori*, *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- Koul, O., 2019, Nanobiopesticides: An introduction, *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives*, 1–15.

- Kourimská, L., Ešlerová, K., ve Khatri, Y., 2016, The effect of storage on quality of herbs genus *Origanum*, *Potravinarstvo*, 10(1), 207–214.
- Lalitha, K., Kalaimurgan, D., Nithya, K., Venkatesan, S., ve Shivakumar, M. S., 2020, Antibacterial, Antifungal and Mosquitocidal Efficacy of Copper Nanoparticles Synthesized from Entomopathogenic Nematode: Insect–Host Relationship of Bacteria in Secondary Metabolites of *Morganella morganii* sp. (PMA1), *Arabian Journal for Science and Engineering*, 45(6), 4489–4501.
- Lee, H. J., Lee, G., Jang, N. R., Yun, J. H., Song, J. Y., ve Kim, B. S., 2011, Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract, *Nanotechnology*, 1(1), 371–374.
- Letchumanan, D., Sok, S. P. M., Ibrahim, S., Nagoor, N. H., ve Arshad, N. M., 2021, Plant- based biosynthesis of copper/copper oxide nanoparticles: An update on their applications in biomedicine, mechanisms, and toxicity, *Biomolecules*, 11(4), 564.
- Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., ve Heredia, J. B., 2017, Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties, *Molecules*, 22(6), 989.
- Li, M. Y., Wang, Y., Lei, X., Xu, C. T., Wang, D. D., Liu, S., ve Li, S. G., 2021, Molecular characterization of a catalase gene from the green peach aphid (*Myzus persicae*), *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 108(2), e21835.
- Li, W., Lu, Z., Li, L., Yu, Y., Dong, S., Men, X., ve Ye, B., 2018, Sublethal effects of imidacloprid on the performance of the bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi*, *PLoS One*, 13(9), e0204097.
- Lindgren, D. L., ve Vincent, L. E., 1959, Biology and control of *Trogoderma granarium* Everts. *Journal of Economic Entomology*, 52(2), 312–319.
- Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method, *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lu, K., Li, W., Cheng, Y., Ni, H., Chen, X., Li, Y., ve Song, Y., 2019, Copper exposure enhances *Spodoptera litura* larval tolerance to β -cypermethrin, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 160, 127–135.
- Lu, Y., Bai, Q., Zheng, X., ve Lu, Z., 2017, Expression and enzyme activity of catalase in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) is responsive to environmental stresses, *Journal of Economic Entomology*, 110(4), 1803–1812.
- Luque, P. A., Garrafa-Gálvez, H. E., García-Maró, C. A., ve Soto-Robles, C. A., 2022, Study of the optical properties of ZnO semiconductor nanoparticles using *Origanum vulgare* and its effect in Rhodamine B degradation, *Optik*, 258, 168937.
- Manjari, G., Saran, S., Arun, T., Rao, A.V.B. and Devipriya, S.P., 2017, Catalytic and recyclability properties of phytogenic copper oxide nanoparticles derived from *Aglaia elaeagnoidea* flower extract, *Journal of Saudi Chemical Society*, 21(5), 610–618.

- Manjari, G., Saran, S., Arun, T., Vijaya Bhaskara Rao, A., ve Devipriya, S. P., 2017, Catalytic and recyclability properties of phytogenic copper oxide nanoparticles derived from *Aglaia elaeagnoidea* flower extract, *Journal of Saudi Chemical Society*, 21(5), 610–618.
- Marrelli, M., Statti, G. A., ve Conforti, F., 2018, *Origanum spp.*: an update of their chemical and biological profiles, *Phytochemistry Reviews*, 17(4), 873–888.
- Mauricio, M. D., Guerra-Ojeda, S., Marchio, P., Valles, S. L., Aldasoro, M., Escribano-Lopez, I., Herance, J. R., Rocha, M., Vila, J. M., ve Victor, V. M., 2018, Nanoparticles in medicine: A focus on vascular oxidative stress, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.
- Mejias, J.H., Salazar, F., Pérez Amaro, L., Hube, S., Rodriguez, M. and Alfaro, M., 2021, Nanofertilizers: a cutting-edge approach to increase nitrogen use efficiency in grasslands, *Frontiers in Environmental Science*, 52.
- Mittal, A. K., Chisti, Y., ve Banerjee, U. C., 2013, Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts, *Biotechnology Advances*, 31(2), 346–356.
- Mohamed, H. I., Sajyan, T. K., Shaalan, R., Bejjani, R., Sassine, Y. N., ve Basit, A., 2022, Plant-mediated copper nanoparticles for agri-ecosystem applications, *Nanobiotechnology for Plant Protection*, 79-120.
- Morrison, W. R., Grosdidier, R. F., Arthur, F. H., Myers, S. W., ve Domingue, M. J., 2020, Attraction, arrestment, and preference by immature *Trogoderma variabile* and *Trogoderma granarium* to food and pheromonal stimuli, *Journal of Pest Science*, 93(1), 135–147.
- Mott, D., Galkowski, J., Wang, L., Luo, J. and Zhong, C.J., 2007, Synthesis of size-controlled and shaped copper Nanoparticles, *Langmuir*, 23(10), 5740-5745.
- Muhammad, A., He, J., Yu, T., Sun, C., Shi, D., Jiang, Y., Xianyu, Y., ve Shao, Y., 2022, Dietary exposure of copper and zinc oxides nanoparticles affect the fitness, enzyme activity, and microbial community of the model insect, silkworm *Bombyx mori*, *Science of the Total Environment*, 813, 152608.
- Muthamil Selvan, S., Vijai Anand, K., Govindaraju, K., Tamilselvan, S., Kumar, V.G., Subramanian, K.S., Kannan, M. ve Raja, K., 2018, Green synthesis of copper oxide nanoparticles and mosquito larvicidal activity against dengue, zika and chikungunya causing vector *Aedes aegypti*, *IET Nanobiotechnology*, 12(8), 1042-1046.
- Nagar, N., ve Devra, V., 2018, Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using *Azadirachta indica* leaves, *Materials Chemistry and Physics*, 213, 44–51.
- Nair, K. S. S., ve Desai, A. K., 1972, Some new findings on factors inducing diapause in *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera, Dermestidae), *Journal of Stored Products Research*, 8(1), 27–54.

- Nair, P. M. G., Park., S. Y., ve Choi, J., 2012, Characterization and expression analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase cDNA from *Chironomus riparius* on exposure to cadmium, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 163(1), 37–42.
- Nair, P. M. G., Park., S. Y., ve Choi, J., 2013, Evaluation of the effect of silver nanoparticles and silver ions using stress responsive gene expression in *Chironomus riparius*, *Chemosphere*, 92(5), 592–599.
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Rostami-Vartooni, A., ve Hussin, S. M., 2016, Green synthesis of CuO nanoparticles using aqueous extract of *Thymus vulgaris* L. leaves and their catalytic performance for N-arylation of indoles and amines, *Journal of Colloid and Interface Science*, 466, 113–119.
- Nayak, M.K., Daglish, G.J., Phillips, T.W. ve Ebert, P.R., 2020, Resistance to the fumigant phosphine and its management in insect pests of stored products: a global perspective, *Annual Review of Entomology*, 65, 333-350.
- New South Wales Department of Primary Industries, Khapra beetle., Erişim tarihi Ağustos - 2022, <https://www.dpi.nsw.gov.au/biosecurity/plant/insect-pests-and-plant-diseases/khapra>.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., ve Li, N., 2006, Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761), 622-627.
- Paragas, D. S., Cruz, K. D. C., ve Fiegalan, E. R., 2021, Fermented Neem (*Azadirachta indica*) leaves-metal nanoparticles and their insecticidal properties against *Bactrocera dorsalis* (Hendel), *Indian Journal of Science and Technology*, 14(17), 1338–1346.
- Pariona, N., Mtz-Enriquez, A. I., Sánchez-Rangel, D., Carrión, G., Paraguay-Delgado, F., ve Rosas-Saito, G., 2019, Green-synthesized copper nanoparticles as a potential antifungal against plant pathogens, *RSC Advances*, 9(33), 18835–18843.
- Patra, J. K., ve Baek, K. H., 2014, Green Nanobiotechnology: Factors Affecting Synthesis and Characterization Techniques, *Journal of Nanomaterials*, 2014.
- Phillips, T. W., ve Throne, J. E., 2010, Biorational approaches to managing stored-product insects, *Annual Review of Entomology*, 55, 375–397.
- Prasad, H., Bhatia, P., ve Sethi, G. R., 1997, Estimation of feeding losses by *Trogoderma granarium* Everts in wheat, *Indian Journal of Entomology*, 39(4), 377–378.
- Qin, J., Lu, M.X., Zheng, Y.T., ve Du, Y.Z., 2017, Molecular cloning, characterization, and functional analysis of catalase in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), *Annals of the Entomological Society of America*, 110(2), 212-220.
- Raduw, G. G., ve Mohammed, A. A., 2020, Insecticidal efficacy of three nanoparticles for the control of Khapra beetle (*Trogoderma granarium*) on different grains, *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 36(1), 90-100.

- Rafi Shaik, M., Ali, Z. J. Q., Khan, M., Kuniyil, M., Assal, M. E., Alkhathlan, H. Z., Al-Warthan, A., Siddiqui, M. R. H., Khan, M., ve Adil, S. F., 2017, Green Synthesis and Characterization of Palladium Nanoparticles Using *Origanum vulgare* L. Extract and their Catalytic Activity, *Molecules*, 22(1), 165.
- Rahaiee, S., Ranjbar, M., Azizi, H., Govahi, M., ve Zare, M., 2020, Green synthesis, characterization, and biological activities of saffron leaf extract-mediated zinc oxide nanoparticles: A sustainable approach to reuse an agricultural waste, *Applied Organometallic Chemistry*, 34(8), e5705.
- Ramadan, R.H., Abdel-Meguid, A. and Emara, M., 2020, Effects of synthesized silver and chitosan nanoparticles using *Nerium oleander* and *Aloe vera* on antioxidant enzymes in *Musca domestica*, *Catrina: The International Journal of Environmental Sciences*, 21(1), 9-14.
- Rai, M., Ingle, A. P., Pandit, R., Paralikar, P., Shende, S., Gupta, I., Biswas, J. K., ve Da Silva, S., 2018, Copper and copper nanoparticles: Role in management of insect-pests and pathogenic microbes, *Nanotechnology Reviews*, 7(4), 303–315.
- Rajendran, K., ve Sen, S., 2016, Optimization of process parameters for the rapid biosynthesis of hematite Nanoparticles, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 159, 82-87.
- Rajesh, K. M., Ajitha, B., Ashok Kumar Reddy, Y., Suneetha, Y., ve Sreedhara Reddy, P., 2016, Synthesis of copper nanoparticles and role of pH on particle size control, *Materials Today: Proceedings*, 3(6), 1985–1991.
- Rashdan, S. A., 2021, Chemical Detection of the Toxicity of Nanoparticles of Metals and Metal Oxides, *Nano Biomedicine and Engineering*, 13(4), 401–413.
- Renu, Karthik, A., Prabu, A., Karthik, S., Shivashangari, K. S., ve Ravikumar, V., 2013, *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 80-84.
- Ribeiro, M. J., Maria, V. L., Scott-Fordsmand, J. J., ve Amorim, M. J. B., 2015, Oxidative Stress Mechanisms Caused by Ag Nanoparticles (NM300K) are Different from Those of AgNO₃: Effects in the Soil Invertebrate *Enchytraeus Crypticus*, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8), 9589-9602.
- Rizwan, M., Aslam, A., Majeed, D., ve Malik, M. K., 2018, Effects of temperature and relative humidity on the development of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), *International Journal of Entomology Research*, 3(4), 09–12.
- Ruiz, P., Katsumiti, A., Nieto, J. A., Bori, J., Jimeno-Romero, A., Reip, P., Arostegui, I., Orbea, A., ve Cajaraville, M. P., 2015, Short-term effects on antioxidant enzymes and long-term genotoxic and carcinogenic potential of CuO nanoparticles compared to bulk CuO and ionic copper in mussels *Mytilus galloprovincialis*, *Marine Environmental Research*, 111, 107– 120.
- Sankar, R., Karthik, A., Prabu, A., Karthik, S., Shivashangari, K.S. and Ravikumar, V., 2013. *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its

- antibacterial and anticancer activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 80-84.
- Sankar, R., Prasath, B.B., Nandakumar, R., Santhanam, P., Shivashangari, K.S. ve Ravikumar, V., 2014, Growth inhibition of bloom forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by green route fabricated copper oxide nanoparticles, *Environmental Science and Pollution Research*, 21(24), 14232-14240.
- Sarwar, N., Humayoun, U. Bin, Kumar, M., Zaidi, S. F. A., Yoo, J. H., Ali, N., Jeong, D. I., Lee, J. H., ve Yoon, D. H., 2021, Citric acid mediated green synthesis of copper nanoparticles using cinnamon bark extract and its multifaceted applications, *Journal of Cleaner Production*, 292, 125974.
- Sezer Tuncsoy, B., Tuncsoy, M., Gomes, T., Sousa, V., Teixeira, M. R., Bebianno, M. J., ve Ozalp, P., 2019, Effects of Copper Oxide Nanoparticles on Tissue Accumulation and Antioxidant Enzymes of *Galleria mellonella* L., *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 102(3), 341–346.
- Shahzad, K. and Manzoor, F., 2021, Nanoformulations and their mode of action in insects: a review of biological interactions, *Drug and chemical toxicology*, 44(1), 1-11.
- Shaik, M.R., Khan, M., Kuniyil, M., Al-Warthan, A., Alkhathlan, H.Z., Siddiqui, M.R.H., Shaik, J.P., Ahamed, A., Mahmood, A., Khan, M. and Adil, S.F., 2018, Plant-extract-assisted green synthesis of silver nanoparticles using *Origanum vulgare* L. extract and their microbicidal activities, *Sustainability*, 10(4), 913.
- Shende, S., Ingle, A. P., Gade, A., ve Rai, M., 2015, Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus medica* Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(6), 865–873.
- Shivananjappa, S., Fields, P., Laird, R. A., ve Floate, K. D., 2020, Contributions of diet quality and diapause duration to the termination of larval diapause in khapra beetle, *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), *Journal of Stored Products Research*, 85, 101535.
- Stanic, V., Shaaya, E., vr Shulov, A., 1963, The effect of larval excrements on the growth of *Trogoderma granarium*, *Rivista Parassitologia*, 24, 13-17.
- Strambeanu, N., Demetrovici, L., Dragos, D., ve Lungu, M., 2015, Nanoparticles: Definition, Classification and General Physical Properties, *Nanoparticles' Promises and Risks: Characterization, Manipulation, and Potential Hazards to Humanity and the Environment*, 3–8.
- Sukumar, S., Rudrasenan, A., ve Padmanabhan Nambiar, D., 2020, Green-Synthesized Rice- Shaped Copper Oxide Nanoparticles Using *Caesalpinia bonducella* Seed Extract and Their Applications, *ACS Omega*, 5(2), 1040–1051.
- T granarium* (TROGGA) World distribution| EPPO Global Database., Erişim tarihi Nisan- 2021, <https://gd.eppo.int/taxon/TROGGA/distribution>

- Toto, N. A., Elhenawy, H. I., Eltaweil, A. S., El-Ashram, S., El-Samad, L. M., Moussian, B., ve El Wakil, A., 2022, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) as a biological model for the assessment of magnetite nanoparticles toxicity, *Science of the Total Environment*, 806, 151483.
- Tuncsoy, B., ve Mese, Y., 2021, Influence of titanium dioxide nanoparticles on bioaccumulation, antioxidant defense and immune system of *Galleria mellonella* L., *Environmental Science and Pollution Research*, 28(28), 38007–38015.
- Umer, A., Naveed, S., Ramzan, N., ve Rafique, M. S., 2012, Selection of a suitable method for the synthesis of copper nanoparticles, *Nano*, 7(5), 1230005.
- Varshneyet, R., Varshney, R., Bhadauria, S., ve Gaur, M. S., 2012, Review: Biological Synthesis of Silver and Copper Nanoparticles, *Nano Biomedicine and Engineering*, 4(2), 99–106.
- Veerakumar, K., Govindarajan, M., ve Hoti, S. L., 2014, Evaluation of plant-mediated synthesized silver nanoparticles against vector mosquitoes, *Parasitology Research*, 113(12), 4567–4577.
- Velsankar, K., Parvathy, G., Mohandoss, S., Kumar, R. M., ve Sudhahar, S., 2022, Green synthesis and characterization of CuO nanoparticles using *Panicum sumatrense* grains extract for biological applications, *Applied Nanoscience*, 12(6), 1993–2021.
- Verma, N., ve Kumar, N., 2019, Synthesis and Biomedical Applications of Copper Oxide Nanoparticles: An Expanding Horizon, *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 5(3), 1170–1188.
- Vinothkanna, A., Mathivanan, K., Ananth, S., Ma, Y., ve Sekar, S., 2022, Biosynthesis of copper oxide nanoparticles using *Rubia cordifolia* bark extract: characterization, antibacterial, antioxidant, larvicidal and photocatalytic activities, *Environmental Science and Pollution Research*, 1, 1–12.
- Vivekanandhan, P., Swathy, K., Thomas, A., Krutmuang, P., ve J Kweka, E., 2021a, Green Copper Nano-Pesticide Synthesized by Using *Annona Squamosa* L., Seed and their Efficacy on Insect Pest as well as Non-Target Species, *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 11(03), 456–473.
- Vivekanandhan, P., Swathy, K., Thomas, A., Kweka, E. J., Rahman, A., Pittarate, S., ve Krutmuang, P., 2021b, Insecticidal efficacy of microbial-mediated synthesized copper nano- pesticide against insect pests and non-target organisms, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(19), 10536.
- Wakil, W., Kavallieratos, N. G., Usman, M., Gulzar, S., ve El-Shafie, H. A. F., 2021, Detection of phosphine resistance in field populations of four key stored-grain insect pests in Pakistan, *Insects*, 12(4), 1–12.
- Wang, K., Huang, Y., Li, X., ve Chen, M., 2018, Functional analysis of a carboxylesterase gene associated with isoprocarb and cyhalothrin resistance in *Rhopalosiphum padi* (L.), *Frontiers in Physiology*, 9(JUL), 992.

- Wang, Y., Wang, L.J., Zhu, Z.H., Ma, W.H., Lei, C.L., 2012, The molecular characterization of antioxidant enzyme genes in *Helicoverpa armigera* adults and their involvement in response to ultraviolet-A stress, *Journal of Insect Physiology*, 58, 1250–1258.
- Wilches, D. M., Laird, R. A., Floate, K. D., ve Fields, P. G., 2016, A review of diapause and tolerance to extreme temperatures in dermestids (Coleoptera), *Journal of Stored Products Research*, 68, 50-62.
- Wu, S., Rajeshkumar, S., Madasamy, M., ve Mahendran, V., 2020, Green synthesis of copper nanoparticles using *Cissus vitifolia* and its antioxidant and antibacterial activity against urinary tract infection pathogens, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 48(1), 1153–1158.
- Xu, J., Lu, M.X., Huang, D.L., Du, Y.Z., 2017, Molecular cloning, characterization, genomic structure and functional analysis of catalase in *Chilo suppressalis*, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20, 331–336.
- Yadav, S. K., Bhowmik, S., Yadav, P. C., ve Sharma, K. C., 2022, Identification and control of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), a potential threat to stored products and international trade, *International Journal of Tropical Insect Science*, 42(2), 999–1017.
- Yadav, S., Srivastava, C., Kumar Yadav, S., ve Sunil Kumar Yadav, C., 2017, Effect of temperature and food on the biology of khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts, *Journal of Entomology and Zoology*, 5(3), 1015-1019.
- Yamamoto, K., Banno, Y., Fujii, H., Miake, F., Kashige, N., Aso, Y., 2005, Catalase from the silkworm, *Bombyx mori*: gene sequence, distribution, and overexpression, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 277–283.
- Yasur, J., ve Rani, P. U., 2015, Lepidopteran insect susceptibility to silver nanoparticles and measurement of changes in their growth, development and physiology, *Chemosphere*, 124, 92-102.
- Yates E.L ve Owen, E.A., 1933, Precision measurements of crystal parameters, *Philosophical Magazine*, Serie 6 (1901-1925), 15, 472 - 487
- Yusefi, M., Shameli, K., Hedayatnasab, Z., Teow, S. Y., Ismail, U. N., Azlan, C. A., Rasit Ali, R., 2021, Green synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles for hyperthermia, magnetic resonance imaging and 5-fluorouracil carrier in potential colorectal cancer treatment, *Research on Chemical Intermediates*, 47(5), 1789–1808.
- Zeng, J., Zhang, B., Vuong, T. M. D., Zhang, T., Yang, J., ve Zhang, G., 2020, Molecular cloning, characterization, and antioxidant function of catalase in *Lymantria disparasiatic* (Lepidoptera: Lymantriidae) under avermectin stress, *Journal of Forestry Research*, 31(6), 2563–2570.
- Zhang, D., Ma, X. L., Gu, Y., Huang, H., ve Zhang, G. W., 2020, Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Potential Applications to Treat Cancer, *Frontiers in Chemistry*, 8, 799.

- Zhang, Z., Guo, R. ve Li, M., 2017, Identification, characterization and expression analysis of superoxide dismutase genes in *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrideridae), *Gene*, 606, 25-34.
- Ziaee, M., ve Babamir-Satehi, A., 2020, Insecticidal Efficacy of Silica Nanoparticles Loaded with Several Insecticides in Controlling Khapra Beetle Larvae, *Trogoderma granarium* on Mosaic and Galvanized Steel Surfaces, *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 43(2), 35-47.
- Ziaee, M., ve Ganji, Z., 2016, Insecticidal efficacy of silica nanoparticles against *Rhyzopertha dominica* F. and *Tribolium confusum* Jacquelin du Val, *Journal of Plant Protection Research*, 56(3), 250–256.
- Zulfiqar, F., Navarro, M., Ashraf, M., Akram, N. A., ve Munné-Bosch, S., 2019, Nanofertilizer use for sustainable agriculture: Advantages and limitations, *Plant Science*, 289, 110270.