



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Trogoderma granarium'da ISI ŞOK
PROTEİNLERİNİN GEN İFADE
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Fatma Nur ÇOBAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Aralık-2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Trogoderma granarium'da ISI ŞOK PROTEİNLERİNİN GEN İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Fatma Nur ÇOBAN

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

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ

2022, 44 Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ
Prof. Dr. Gökhan KARS
Doç. Dr. Hüseyin ÇETİN

Kapra böceği, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), dünya çapında karantina türleri arasında bulunan depolanmış tahıl ve tahıl ürünlerinin önemli bir zararlısıdır. Bu böcek beslediği tahıl ve tahıl ürünleri tercihinin geniş olması nedeniyle, ideal koşullarda hızlıca çoğalabilmektedir. *T. granarium* popülasyonlarının baskılanması, genellikle çeşitli kimyasallara dayanan kontrol yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir. Ancak, bu zararlı insektisitlere karşı direnç geliştirebilmektedir. Kapra böceği larvaları çeşitli stress koşullarına cevaben çok uzun süreli diyapoz girebildiklerinden, larva yayılımlarının kontrolü oldukça güçtür. Bu türün dünya çapında bilinen ekonomik önemine rağmen, *T. granarium*'la ilişkili kayıtlı gen ifade çalışması sayısı sınırlıdır. Bu çalışmada, daha önceden oluşturulan kapra böceği cDNA kütüphanesinde, üç adet Isı Şok Proteini (Heat Shock Protein= HSP) (*TgHSP60*, *TgHSP68* ve *TgHSP83*) genleri tespit edilmiştir. *TgHSP*'lerin gen ifade düzeyleri *T. granarium*'un soğuk ile indüklenmiş larval diyapoz fazlarında ve gelişimsel larval dönemlerinde incelenmiştir. *TgHSP60*, *TgHSP68* ve *TgHSP83*'ün ifade seviyelerinin pre-diyapoz, diyapoz ve post-diyapoz fazlarında yukarı yönde düzenlendiği bulunmuştur. *TgHSP*'lerin transkript seviyelerinin, kapra böceğinin gelişimsel dönemleri, ergin erkek ve dişilerinde çok düşük miktarda olduğu tespit edilmiştir. Ancak, *TgHSP83*'ün ergin dişideki ifade düzeyi, ergin erkek ve diğer gelişim dönemlerine kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgulara göre, *TgHSP*'ler, *T. granarium*'un soğuk stresi ile indüklenen diyapozunda hayatta kalması için kritik bir öneme sahip olabilir. *T. granarium*'un diyapoz fizyolojisinin gen mekanizmasının anlaşılması, bu zararlı ile mücadelede potansiyel araçların geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Kapra böceği, ısı şok proteini, diyapoz, stress uygulaması, gen ifadesi

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF GENE EXPRESSION PROFILES OF HEAT SHOCK PROTEINS IN *Trogoderma granarium*

Fatma Nur ÇOBAN

The Graduate School of Natural and Applied Science of Necmettin Erbakan
University

The Degree of Master of Science in Molecular Biology And Genetics

Advisor: Assist.Prof.Dr Aslı DAĞERİ

2022, 44 Pages

Jury

Assist.Prof. Aslı DAĞERİ

Prof. Dr. Gökhan KARS

Assoc. Prof. Hüseyin ÇETİN

The khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), is a voracious pest of stored grains and cereal products, and considered among the quarantine pests worldwide. Due to its wide range of grain and cereal products preferences, it can reproduce rapidly under ideal circumstances. Suppression of the *T. granarium* populations has been mostly carried out using various chemical-based control methods. However, this pest might develop resistance against insecticides. Because the larvae of khapra beetle enter very long diapause periods in response to different stress conditions, controlling their infestation is very difficult. Despite the economic significance of this species worldwide, there is limited numbers of registered gene expression data regarding *T. granarium*. In this study, three Heat Shock Proteins (HSPs) (*TgHSP60*, *TgHSP68*, and *TgHSP83*) genes from the constructed cDNA library of the khapra beetle were identified. Expression levels of HSPs were examined during larval diapause phases induced by cold, and in developmental stages. Expression levels of *TgHSP60*, *TgHSP68*, and *TgHSP83* were found to be upregulated during pre-diapause, diapause and post-diapause phases. Transcript levels of *TgHSPs* were found to be very low in developmental stages, male, and female adults of khapra beetle. However, expression level of *TgHSP83* in female adult was detected to be higher compared to male adult and other developmental stages. According to these findings, *TgHSPs* might be critical for cold-induced diapause survival of *T. granarium*. Understanding the gene mechanism underlying the diapause physiology of *T. granarium* might provide further insight for pest management of this insect pest.

Keywords: Khapra beetle, heat shock protein, diapause, stress treatment, gene expression

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca beni gayretlendiren, bana güç ve azim veren, bilimsel bilgi ve birikimlerini esirgemeyerek bana yol gösteren her türlü emek ve desteğini sonsuz hissettiğim çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ'ye minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının projesini destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BAP Proje No: 211315005), tez deney ve analizlerinin büyük bir kısmının gerçekleştiği Necmettin Erbakan Üniversitesi BİTAM (Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi)'a teşekkür ederim.

Bu süreçte bana destek olup, beni motive eden değerli arkadaşlarım Gizem YILMAZ ve Feyza KOSTAK'a katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, her konuda fikirlerime önem veren, maddi, manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili babam Yakup ÇOBAN ve annem Habibe ÇOBAN ve kardeşim Fatih Mehmet ÇOBAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fatma Nur ÇOBAN
KONYA-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	6
2.1. <i>Trogoderma granarium</i> 'un Biyolojisi ve Yaşam Döngüsü	6
2.2. <i>Trogoderma granarium</i> 'un Zararları	9
2.3. <i>Trogoderma granarium</i> ile Mücadele	11
2.4. Diyapoz	12
2.5. Isı Şok Proteinleri (Heat Shock Proteins=HSP's).....	15
2.5.1. HSP60	16
2.5.2. HSP68	16
2.5.3. HSP83	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. <i>Trogoderma granarium</i> 'un Yetiştirilmesi	18
3.2. Diyapoz İndükleme.....	18
3.3. RNA İzolasyonu	19
3.4. cDNA Sentezi	20
3.5. Primer Tasarımı	20
3.6. Kantitatif Eş Zamanlı PCR (RT – qPCR).....	21
3.7. İstatiksel Analiz	22
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	23
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	30
6. KAYNAKLAR	31

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin trifosfat
bç	Baz çifti
°C	Santigrad
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
dd ₂ O	Çift Distile Su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Nükleozit Trifosfat
g	Gram
g(rpm)	Dakikada Devir Sayısı
H ₂ O	Su
HSP	Heat Shock Protein
IPM	Integrated Pest Management
kDa	Kilodalton
µg	Mikro gram
µl	Mikro litre
ml	Mili litre
mm	Mili metre
mRNA	Mesenger RNA
nm	Nano metre
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonükleik asit
S	Saniye
<i>TgHSP60</i>	<i>Trogoderma granarium Heat Shock Protein 60</i> geni
<i>TgHSP68</i>	<i>Trogoderma granarium Heat Shock Protein 68</i> geni
<i>TgHSP83</i>	<i>Trogoderma granarium Heat Shock Protein 83</i> geni
UV	Ultraviyole
2 ^{-ΔΔCt}	Bağlı nicel yöntem

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kapra böceğinin yumurtaları.....	6
Şekil 2.2. Kapra böceğinin larvası.....	7
Şekil 2.3. Yumurta, larva, pupa ve ergin.....	7
Şekil 2.4. Kapra ergini.....	8
Şekil 2.5. Kapra böceğinin yaşam döngüsü.....	9
Şekil 2.6. Buğday tanelerinde beslenen kapra böceği.....	10
Şekil 2.7. Prinç tanelerinde beslenen kapra böceği.....	10
Şekil 3.1. Soğuk kaynaklı diyapoz sürecinin şematik gösterimi.....	19
Şekil 4.1. <i>TgHSP60</i> geninin pre-diyapoz, diyapoz ve post diyapoz fazında göreceli mRNA seviyeleri.....	23
Şekil 4.2. <i>TgHSP68</i> geninin pre-diyapoz, diyapoz ve post diyapoz fazında göreceli mRNA seviyeleri.....	24
Şekil 4.3. <i>TgHSP83</i> geninin pre-diyapoz, diyapoz ve post diyapoz fazında göreceli mRNA seviyeleri.....	25
Şekil 4.4. Kapra böceğinin gelişimsel dönemdeki larvaları ve erginlerinde <i>TgHSP60</i> geninin ifadesi.....	26
Şekil 4.5. Kapra böceğinin gelişimsel dönemdeki larvaları ve erginlerinde <i>TgHSP68</i> geninin ifadesi.....	26
Şekil 4.6. Kapra böceğinin gelişimsel dönemdeki larvaları ve erginlerinde <i>TgHSP83</i> geninin ifadesi.....	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerler	21
Çizelge 3.2. RT - qPCR çalışması için kullanılan bileşenler.....	21



1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artması ile nüfusun ihtiyaç duyduğu besin kaynaklarının karşılanması sorunu, günümüzde önde gelen problemlerden biri haline gelmiştir. Nüfus artış hızıyla beraber, tarım alanlarının da bu doğrultuda azalmaya başladığı bilinmektedir (Çolak ve ark., 2018; Ferizli ve Emekçi, 2013). Tahılların ilk çağlardan beri ekonomik ve stratejik değeri yüksek olup, günümüzde de insanların ve hayvanların en önemli besin maddesi olarak üretimi ve tüketimi devam etmektedir (Dörtok ve Aksoy 2018). Ülkemizde, özellikle ekonomik ve besinsel ihtiyaçların karşılanması açısından, en önemli kaynaklardan biridir.

Türkiye iklimi ve verimli toprak yapısı itibari ile buğday gibi tahıl ürünlerinin yetiştirilmesine imkân sağlayan bir coğrafyada yer almaktadır. Nüfusun beslenme ihtiyaçları ve alışkanlıkları neticesinde, tahıl ürünleri birçok gıdaya ham madde kaynağı olarak kullanılmaktadır. Tahıl ürünlerinin hasat edildikten sonra fazla miktarda olmaları, hasadı takiben hemen tüketilememeleri nedeniyle ve doğal afetler ve savaşlar gibi olumsuz koşullara tedbiren depo edilerek korunmalarına ihtiyaç vardır (Dizlek, 2012). Bu ürünler depo edildikleri süre boyunca bazı zararlı türler ve çeşitli etmenler sebebiyle böceklenme, küflenme, çürüme gibi tahıl tahribatına maruz kalabilmektedir (Kılıç ve Mutlu, 2020).

Depo edilen ürünlerde meydana gelen yıllık ortalama %10'luk zararın hayvansal kökenli olduğu rapor edilmiştir (Çolak ve ark., 2018; Ferizli ve Emekçi, 2013). Türkiye elverişli iklimsel koşulları aracılığı ile çeşitli ürün verebilen bir ülkedir ve dolayısı ile çok sayıda depo zararlısı organizmaya tahıllar yolu ile gelişim fırsatı sunmaktadır (Çolak ve ark., 2018). *Sitophilus* spp. (Coleoptera: Curculionidae), *Tribolium* spp. (Coleoptera: Tenebrionidae), *Rhizopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrychidae) ve *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) gibi ülkemizde görülen depo zararlısı böceklerin, depolanmış ürünlerde ağırlık, çimlenme, kalite ve besin değerlerinde kayıplara sebep olduğu bilinmektedir. Bu canlıların dışkıları, pupalarının kozaları, yumurtalarının kabukları gibi etmenlerle birlikte, salgıladıkları çeşitli kimyasallar tahıl, tahıl ürünlerinde ve bu tahıllarla beslenen canlılarda zarara sebep olmaktadır. (Keskin ve Özkaya, 2013; Ferizli ve Emekçi, 2013).

Kapra böceği olarak da bilinen *Trogoderma granarium*'un Hindistan kökenli olduğu, oradan Asya ülkelerine sonrasında ise Orta Doğu, Afrika ve Asya kıtalarına ürünlerin nakliyesi yoluyla yayıldığı bilinmektedir. Bu organizma Amerika ve Avustralya'da karantina türleri arasında bulunmakla birlikte, Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü (EPPO) tarafından A2 karantina listesine dâhil edilmiş bir depo zararlısıdır. Kapra böceği ılık ve kuru çevre koşullarında hem hayvansal, hem de bitkisel kökenli olan neredeyse 100 çeşit üründe tespit edilmiştir (Finkelman ve ark., 2006; Hosseinaveh ve ark., 2007; Burges, 2008; Kavallieratos ve ark., 2017). Böceğin beslendiği ürünlere verdiği zarar ürünlerin kalitesinde ve pazarlanmalarında sorunlar oluşturmaktadır. Larva tüyleri ve değiştirdikleri derilerinin solunması veya yutulması dermatit, mide ve bağırsak rahatsızlıklarına sebep olabilmektedir (Shivananjappa ve ark. 2020).

Kapra böceği erginleri beslenmeden 14-22 gün yaşayabilirken, son larval dönemde olanları yaklaşık olarak 4-5 yıl kadar diyapozda kalabilmektedir (Kavallieratos ve ark., 2017). Bu organizma, düşük ve yüksek sıcaklık dereceleri ile birlikte, bağıl nemin çok düşük olduğu çevresel koşullara bile direnç gösterebilme kabiliyetindedir (Banks, 1977).

Kapra böceği, besin tercihlerinin çok geniş olması, saklanmak için çatlak, yarıklar ve sığınaklardan kolay bir şekilde yararlanması sebebi ile ülkeler arasında kolay bir şekilde yayılabilmektedir. Böceğin bu denli yayılım göstermesine etki eden en önemli özelliği, son larval döneminde görülen, olumsuz çevre şartlarına karşı dayanmasına olanak tanıyan, uzun yıllar boyunca sürebilen fakültatif bir diyapoz girebilmesidir (Athassiou ve ark., 2016). Son dönem larvalar açlık, aşırı sıcak ve soğuk, insektisit uygulaması, popülasyon baskısı ve fekal kalıntının bulunması gibi elverişsiz koşullara karşı gelişmiş bir toleransı, diyapoz girecek gösterirler. (Shivananjappa ve ark., 2020). Bu diyapoz fazı, çevresel koşullar böceğin yaşamı için elverişli hâle gelinceye kadar devam eder (Mohammadzadeh ve Izadi 2018; Shivananjappa ve ark., 2020).

Böceğin diyapoz girmesi daha uzun yaşamasına ve depolanmış ürünler üzerinde daha başarılı yayılım gösterebilmesine katkı sağlamaktadır. Son dönem larvaları azami olarak, yaklaşık 8 yıl boyunca fakültatif diyapozda kalabildiği rapor edilmiştir (Burges, 1962). Kapra böceğinde soğuk kaynaklı diyapozun indüklenmesi, diyapoz öncesi fazın

(pre-diyapoz) başlaması için, sıcaklığın 30°C'nin altına düşmesi ile indüklenebilmektedir. Sıcaklık değeri yükseldiğinde diyapoz fazı sona ermekte ve diyapoz sonrası (post-diyapoz) gelişimi başlamaktadır. Bu süre, larva pupa hâlini alıncaya kadar devam etmektedir. Zararlının diyapoz fazında iken bulunduğu yerlerde hareketsiz kalışı, tespit edilmesini zorlaştırmakta; bu da dünya çapında yayılışını kolaylaştırmaktadır (Athanassiou ve ark., 2019).

Kapra böceği diyapoz sayesinde, diğer depo zararlısı böceklerin yaşamlarını devam ettiremedikleri yüksek sıcaklık ve abiyotik koşullar gibi zorlu şartlarda canlı kalabilmektedir. Bu böcek türünün özellikle diyapoz fazında olumsuz koşullara artan toleransı, depolanmış ürünlere zarar veren türlere etkili olan insektisit ve pestisitlere karşı direncini geliştirmiştir (Athanassiou ve ark., 2016; Lindgren ve Vincent, 1959).

Tahıl ürünlerinin ve besinlerin depolandıktan sonra korunabilmesi, bu ürünlerle alakalı işletmelerde ve ürünlerin ihracatı açısından çok büyük öneme sahiptir (Ferizli ve Emekçi, 2013). Dünyada birçok ülkede depo zararlısı böceklerle karşı yasal (karantina işlemleri), fiziksel, mekanik ya da kimyasal yöntemler gibi çok çeşitli mücadele yöntemleri uygulanmaktadır (Çolak ve ark., 2018). Bu mücadele yöntemlerinden, uygulama kolaylığı ve hızlı sonuç vermesi sebebi ile en çok kullanılan kimyasal yöntemler olmuştur (Matthews, 1993; Sathyan ve ark., 2016; Wojciechowska ve ark., 2016). Kimyasal yöntemler, gaz halinde (fumigatlar) ve rezidüel (kalıcı etkili) pestisit kullanımına dayalı uygulamalardır (Çolak ve ark., 2018). Dünyada böceklerle mücadelede en çok kullanılan yöntem, fumigasyon teknolojisidir ve en çok uygulanan fumigantlar arasında, metil bromit ve Alüminyum fosfit fumigantları bulunmaktadır. Fosfin gazı ise daha çok kullanılmakla birlikte, uygulama aşamasında gaz kaybının çok fazla olması sebebiyle çok dikkat edilmesi ve tedbir alınması gereken bir kimyasaldır. Ülkemizde test kabinlerinin tam korunaklı ve geçirimsiz olmamasından ötürü, fosfin gazının atmosfere salınımı olmaktadır (Andric ve ark. 2013; Ferizli ve Emekçi, 2010). Ayrıca uygulama süresinin gerekenden kısa olması, böceklerde ciddi boyutta direnç gelişimine sebep olmaktadır (Zettler ve ark., 2000; Çolak ve ark., 2018).

Fosfin gazına karşı gelişen böcek direnci sebebiyle, bu mücadele yönteminin uygulanmasında aksaklıklar yaşanmakta, aynı zamanda depo edilmiş ürünlere uygulanan kimyasallar, besinleri tüketenlerde akut ve kronik zehirlenmelere sebep olabilmektedir.

Fumigant ve insektisit kullanılmasıyla birlikte meydana gelen sorunlar neticesinde araştırmacılar diatom toprakları gibi farklı mücadele yöntemleri geliştirmeye başlamışlardır (Doğanay ve Işıkber, 2020). Ortak Tarım Politikası (Common Agricultural Policy) depo zararlısı böcekler ile mücadele için bilinen yöntemler dışında, hem çevre hem de besin güvenliği amacıyla farklı yöntemler kullanılmasını tavsiye etmiştir. Bu bağlamda, bitki kökenli sekonder metabolitlerin üretilerek, depo zararlılarında direnç gelişiminin engellenebileceği düşünölmüştür (Ntalli ve ark., 2021).

Birçok organizma gibi, böcekler de patojenler, parazitler, yüksek ya da düşük sıcaklık, UV radyasyonu, kimyasallar gibi biyotik ve abiyotik streslere maruz kalmaktadır (Farahani ve ark., 2020). Böceklerde bu olumsuz koşullar altında Isı şok Proteinleri (Heat Shock Proteins: HSP'ler) genlerinin ifadesi indüklenir ve HSP'ler sentezlenir (King ve MacRae, 2015). Yüksek oranda koruyucu olan bu protein ailesi moleküler şaperonlar olarak da bilinir ve birçok canlı organizmada bulunur. Fakat, ifade düzeylerinde farklılık gösterdikleri bilinmektedir (Walker ve ark., 2001). HSP'ler moleküler ağırlıklarına, amino asit dizisine ve işlevlerine göre sınıflandırılmışlardır (King ve MacRae, 2015). HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, küçük HSP'ler olmak üzere 5 farklı sınıfa ayrılmaktadır (Wang ve ark., 2019; Lindquist ve Craig, 1988; Feder ve Hofmann, 1999). Bu aileler arasında sHSP'ler, 80-100 amino asit ve 12 ila 42 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahip, karakteristik korunmuş α -kristalin domaini içerirler (Caspers ve ark., 1995).

HSP'ler organizmaların olağan büyüme dönemleri süresince ve strese maruz kaldıklarında, protein bütönlüğüne ve hücre içi dengenin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Genel olarak böceklerin çoğu gelişimsel gecikmenin gözlendiği, strese karşı toleransın arttığı fizyolojik olarak uyusukluk durumu olan diyapoz girerler. Böceklerde tıpkı stres koşullarında olduğu gibi diyapoz ile birlikte de *HSP* genlerinin ifade seviyeleri artabilmekte, azalabilmekte ya da stabil kalabilmektedir. Bu da böceklerin yaşamlarına devam edebilmelerine yardımcı olmaktadır. HSP'ler ile ilgili çok fazla çalışma yapılmıştır ve bunun yanı sıra böceklerde stres koşullarında sentezlenen çeşitli HSP'lerin olduğu bildirilmiştir (Zhao ve Jones, 2012). Bu tez kapsamında yeni nesil sekanslama teknolojisi kullanılarak soğuk ile indüklenmiş diyapozdaki *T. granarium* larvalarına ait cDNA kütöphanesinde tespit edilen üç adet *HSP*'nin

(*TgHSP60*, *TgHSP68* ve *TgHSP83*)diyapoz fazlarındaki ve gelişimsel dönemlerdeki ifade düzeylerinin analizleri yapılmıştır.

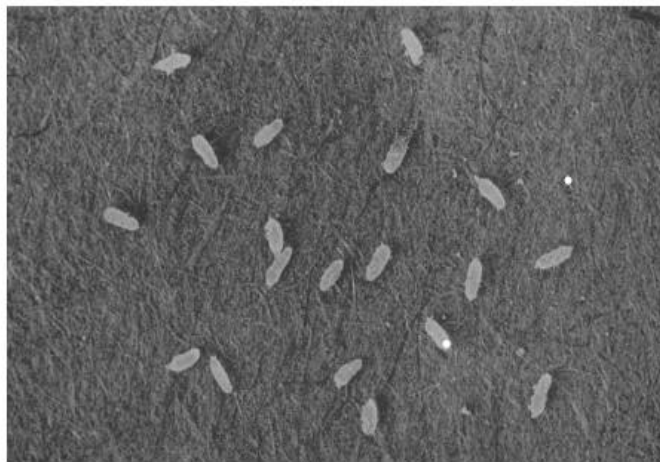


2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Trogoderma granarium*'un Biyolojisi ve Yaşam Döngüsü

Kapra böceği olarak bilinen *Trogoderma granarium* Everts, (Coleoptera: Dermestidae) yaklaşık 1,6 ila 3,0 mm uzunluğunda ve 0,9 ila 1,7 mm genişliğinde dikdörtgen-oval yapıda bir organizmadır. Hindistan yarımadasına özgü bir depolanmış ürün zararlısı olduğu 1984 yılında rapor edilmiştir (Paini ve Yemshanov, 2012; Athanassiou ve ark., 2019). Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de çok önemli depo zararlılarından olan kapra böceği, özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesinde tahıl ambarlarında ciddi derecelere varan zarar meydana getirmektedir (Ergül, 1972; Erakay, 1974; Işıkber ve ark., 2005; Mutlu ve ark., 2019). Bu canlı uluslararası ticaretler sebebiyle çeşitli Asya, Avrupa ve Afrika ülkelerine geniş bir yayılım göstererek, depolanmış ürünleri ekonomik anlamda zarara uğratan bir karantina zararlısıdır (Wilches ve ark., 2017).

Renkleri süt beyazından, yaşla birlikte soluk sarımsı renge değişen yumurtalar; silindirik şekilli, 0,7 x 0,25 mm boyutunda, bir ucu yuvarlak, diğer ucu sivri olan omurga benzeri çıkıntılara sahiptir.



Şekil 2.1. Kapra böceğinin yumurtaları

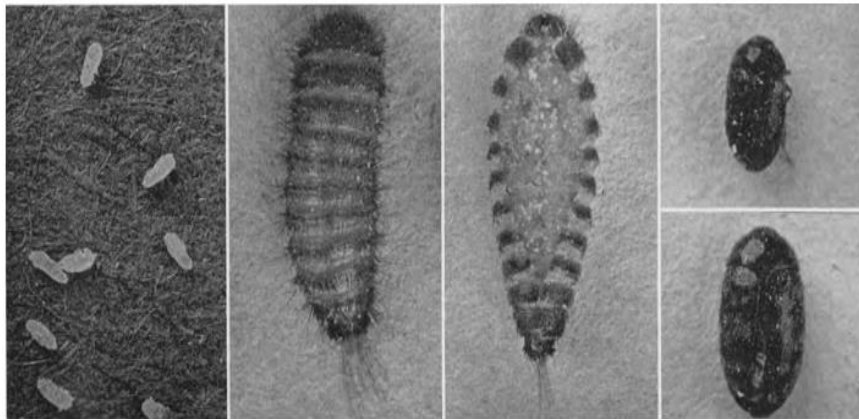
Yumurtadan çıkan larvalar yaklaşık 1,6 ila 1,8 mm uzunluğundadır ve bu uzunluğun büyük bir kısmı son karın bölgesindeki tüylerden oluşan bir kuyruktan meydana gelmektedir. Gövde genişlikleri ise 0,25 ile 0,3 mm'dir. Larvaların baş ve vücut

kılları kahverengi olmakla birlikte, renkleri genel itibariyle sarımsı bir beyazdır. Boyut olarak büyüdükçe vücut renkleri altın veya kırmızımsı kahverengiye döner, daha fazla vücut kılı oluşur ve kuyruk ise yaşa orantılı olarak kısalır.



Şekil 2.2. Kapra böceğinin larvası

Son dönem larvalar yaklaşık 6 mm uzunluğunda ve 1.5 mm genişliğindedir. Larva derisi baş kısmından dorsal olarak yırtılır, fakat dökülmez. Pupa evresindeki canlı, bu deri içinde yaşamına devam eder. Pupanın göğüs kafesi ve karın bölgesinin ön kısmı larvaninkine kıyasla daha geniştir (Hadaway, 1956).



Şekil 2.3. Yumurta, larva, pupa ve ergin

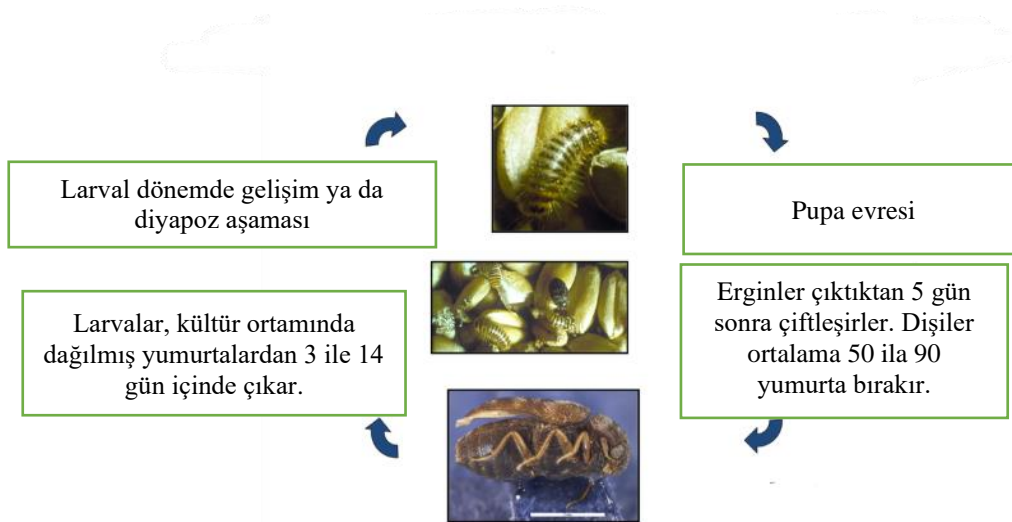
Ergin böcekler kıllarla kaplıdır; yaklaşık 1,6-3,0 mm arasında bir uzunluğa sahiptir. Şekil itibariyle dikdörtgen-oval ve yaklaşık olarak 0,9-1,7 mm genişliğindedirler. Antenleri 11 segmentten oluşur, kafa yapıları küçük ve genel olarak

bükülmüştür. Cinsiyetleri büyüklük ve antenlerin şekillerine göre belirlenmektedir. Dişiler erkeklere oranla daha büyüktür ve renkleri daha açıktır (Harris, 2006). Ayrıca, uzun ömürlü değildirler. Erkek olanların 7-12 gün, çiftleşmiş dişilerin 4-7 gün ve çiftleşmemiş dişilerin ise 20-30 gün civarında yaşayabildikleri bilinmektedir (Ahmedani ve ark., 2007).



Şekil 2.4. Kupra ergini

Kupra gelişimi için uygun sıcaklıklar 20°C-30°C'dir (Lindgren ve Vincent, 1959). Ergin döneme kadar geçen sürenin 30°C'de 39 ile 45 gün, 21°C'de ise 220 gün olduğu bildirilmiştir (Athassiou ve ark., 2019). Larva dönemi sayısı, 4 ile 8 arasında olup, sıcaklıkla birlikte değişkenlik göstermektedir (Burgess, 1962; Burgess, 1959).



Şekil 2.5. Kapra böceğinin yaşam döngüsü (Graham, 2006)

Sıcaklığın 25°C'nin altına düşmesiyle birlikte son dönem larvalar diyapoz geçebilirler ve diyapoz fazında iken -8°C'nin altındaki sıcaklıklarda bile yaşamaya devam edebilirler (Ahmedani ve ark., 2007).

Kapra böceği dişisinin ömrü boyunca 26 ile 66 yumurta bıraktığı görülmüştür (Hadaway, 1956; Karnavar, 1972). Bununla birlikte bu türün dişileri birden fazla çiftleşebilirken, uygun laboratuvar koşulları altında 130'dan fazla yumurta bırakabilme potansiyeline sahiptirler (Karnavar 1972).

2.2. *Trogoderma granarium*'un Zararları

Beal (1982) tarafından, dünyada *Trogoderma* cinsine ait yaklaşık olarak 115 türün var olduğu ve bunlardan 12 tanesinin depo zararlısı olduğu bildirilmiştir. Bu türler arasında en zararlı olanı kapra böceğidir (Ahmedani ve ark., 2007) ve bilinen en zararlı 100 istilacı tür arasında bulunmaktadır (Mutlu ve ark., 2019).

Bu organizmanın buğday, arpa, pirinç gibi temel tahıl ürünlerinin yanı sıra yulaf, çavdar, kuru kan, süt tozu, kuruyemiş gibi çok çeşitli gıdalarla da beslendiği bilinmektedir (Lindgren ve ark., 1955; Lindgren ve Vincent, 1959). Direkt olarak taneye zarar veren, primer bir zararlıdır. Tahılların tanelerinde gluten kalitesinin düşmesine sebep olmakta ve total karbonhidrat, protein ve nişastanın sindirilmesinde sorun oluşturmaktadır (Lindgren ve Vincent 1959; Jood ve ark., 1992; Jood ve ark., 1993).



Şekil 2. 6. Buğday tanelerinde beslenen kapra böceği (Ministry of Agriculture and Regional Development, Bugwood.org)



Şekil 2.7. Prinç tanelerinde beslenen kapra böceği

Kapra böceği buğday gibi tahıl ürünlerinde; ağırlık, çimlenme, kalite vb. konularda olumsuz etkileri bulunmaktadır (Işıkber ve ark., 2005; Mutlu ve ark., 2019). Yüksek sıcaklıklarda çok kolay bir şekilde popülasyon artışı sağlayarak, başarılı bir şekilde diğer depolanmış ürün zararlısı böcek türleri ile rekabete girerek, onların yerine geçebilmektedir (Athanassiou ve ark., 2016; Gourgouta ve ark., 2021; Kavallieratos ve ark., 2017).

Beslenmesinden kaynaklı verdiği zarar ile ürünlerde pazarlanabilirlik ve lezzet konusunda problem oluşturmaktadır. Larva tüylerinin ve gömleklerinin solunması veya yutulması, dermatit ve mide-bağırsak sendromları gibi çeşitli hastalıklara sebep olabilmektedir (Shivananjappa ve ark., 2020).

Kapra böceği, kuru yük konteynerlerinin karayolu ile taşımacılığının artması ile ithal edilen ürünler üzerinde taşınarak yayılım gösterme potansiyeli sebebiyle ciddi ölçüde ekonomik önem arz etmekte ve küresel gıda güvenliği için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Ahmedani ve ark., 2007).

2.3. *Trogoderma granarium* ile Mücadele

Kapra böceği tahıl depolarını çok hızlı bir şekilde istila edebilmektedir. Bu da özellikle gıda güvenliği açısından karantina koşullarının geliştirilmesini gerekli kılmaktadır (Eliopoulos, 2013). Bu zararlı ile mücadelede en çok kimyasal mücadele yöntemlerinin kullanılması ile birlikte kimyasal olmayan; mekanik ve fiziksel mücadele yöntemleri de kullanılmaktadır. Ancak *T. granarium* gibi depo zararlısı böcekler bu yöntemlere karşı direnç göstermekte, bu da zararlı ile savaşında en büyük sorunların başında gelmektedir. Bu uygulamaların istenmeyen olumsuz etkilere sebep olması nedeniyle kimyasal yöntemler dışında farklı alternatif uygulama yöntemleri düşünülmeye başlanmıştır (Coşkuncu, 2005).

Depolanmış ürün zararlılarıyla mücadelede kullanılan kimyasal yöntem fumigasyon teknolojisidir. Bu teknoloji hızlı ve ekonomik anlamda uygun olmakla birlikte, mücadelede çok etkili sonuçlar verebilmektedir (Banks, 1994). Dünyada ve ülkemizde sıklıkla kullanılan fumigantlar; Alüminyum fosfit ve metil bromiddir. Fakat metil bromid kullanımı yasaklanmıştır.

Kapra böceğine karşı mücadelede, canlının karantinaya tabi olduğu ülkelerde daha çok metil bromür fumigasyonu kullanılırken, Ozon Tabakasını İncelten Maddelere İlişkin Montreal Protokolü (Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer) metil bromür kullanımında kısıtlamalar getirmiştir. Bu sebeple, metil bromür kullanımının aşamalı bir şekilde kaldırılması hedeflenmiştir (Fields ve White, 2002). Türkiye’de ise, 2007’den beri birkaç uygulama (karantina ve yükleme öncesi uygulamalar) hariç kullanımı kaldırılmıştır (Ferizli ve ark., 2003).

Fumigasyondan önce tahıl zararlısı böceklerle mücadelede aşırı miktarda deltamethrin kullanıldığı ve kapra böceğinin bu kimyasala karşı da direnç geliştirmiş

olduğu kaydedilmiştir (Irshad ve Iqbal, 1994; Tarakanov ve ark., 1994; Saxena ve Sinha, 1995; Kumar ve ark., 2010; Hafiz ve ark., 2018). Ayrıca bir insektisit olan malathionun da depolanmış ürün zararlısı böceklerle savaşta kullanıldığı, fakat *Tribolium castaneum* (Herbst) ve *Sitophilus* spp. gibi canlılarda pestisit direncine sebep olduğu kayıtlara geçmiştir (Dyte ve Blackman, 1970; Mutlu ve ark., 2019). Bu bilgiler haricinde, Eddleston ve arkadaşları (2009), pestisitlerin insanlar üzerinde ölümcül etkisinin olduğunu ve 2009 yılına kadar dünya üzerinde neredeyse iki yüz bin insanın ölümüne sebep olduğunu bildirmiştir. Sadece insan üzerinde olmamakla birlikte, hayvanlarda ve çevre üzerinde de zararlı etkileri kaydedilmiştir (Koul ve diğerleri, 2008).

Kimyasal mücadele yöntemleri dışında en çok kullanılan yöntemler arasında uzun vadeli bir depolama stratejisi olan hermetik depolama yer almaktadır. Hermetik depolama ile depolanmış ürün zararlılarını yok etmek ya çok uzun zaman almakta, ya da bu zararlılar tamamı ile yok edilememektedir. Fakat bu mücadele yöntemi ile kimyasallara alternatif olarak, canlılara ve çevreye en az seviyede zararlı depolanmış ürün zararlısı böcekler ile mücadele amaçlanmaktadır (Donahaye, 2000). Alternatif mücadele yöntemlerinden birisi de radyasyon tekniğidir. Bu teknik ile ilgili çeşitli araştırmalar ve çalışmalar mevcuttur. Yöntemde kullanılan ışınlar zararlı üzerinde kısırlık, gelişimi engellenme gibi etkilere sebep olmakta, aynı zamanda ürünlerin içinde ve dışında bulunan böcekler üzerinde de ölümcül bir etkisi olduğu bilinmektedir (Karadağ ve Kayahan, 2021). Abdel-Kawy ve Mansour da radyasyon uygulamalarının bu zararlılarla savaşmada etkili olacağını savunmuştur (Abdel-Kawy, 1999; Mansour, 2016).

Çolak ve arkadaşları (2018), zararlıların etkilerini önlemek amacıyla; tül ve tel gibi fiziksel bariyerlerin kullanılabileceğini öne sürmüşler, yüksek ve düşük sıcaklıklar ile diatom toprağı gibi yöntemlerin de kimyasal olmayan savaşımında yer aldıklarını bildirmişlerdir.

2.4. Diyapoz

Diyapoz canlılarda, düşük ve yüksek sıcaklıklar, kuraklık ve açlık gibi elverişsiz koşullarda gelişimin neredeyse durduğu, genetik olarak da kontrol edilen bir uyum süreci olarak bilinmektedir (Hodek, 1996). Çeşitli organizmalar ve böcekler, mevsimsel süreçlerde yaşamsal aktivitelerini düzenlemek amacıyla diyapozdan yararlanmaktadır.

Ragland ve ark. (2019) göre, diyapoz böceklerin olumsuz çevre şartlarında hayatta kalmasına yardımcı olabilen, hormonal olarak kontrol edilerek, fizyolojik olarak dinamik, fakat morfolojik olarak yavaş veya durmuş bir gelişme sürecidir.

Böcekler düşük sıcaklıklarda gelişimsel açıdan olumsuz etkilendikleri ve böcek miktarında artışın azaldığı bir sürece girebilirler. Bu süreç türler arasında da farklılık gösteren diyapoz öncesi (pre-diyapoz) faz, diyapoz fazı ve diyapoz sonrası (post-diyapoz) fazı oluşturan diyapoz dönemine girmelerine neden olabilmektedir (Kostal, 2006; Hahn ve Denlinger, 2007). Pek çok böcek buldukları; yumurta, larva, pupa ya da ergin dönemlerinde diyapoza girebilmektedir (Denlinger, 1986).

Böcekler diyapoza girdiklerinde ya hiç beslenmezler ya da neredeyse yok denilecek kadar az beslenmektedirler. Öyleki diyapoza girebilme yeteneğine sahip böcekler, pre-diyapoz fazda vücutlarında, diyapoz döneminde metabolik aktivitelerini devam ettirebilecekleri kadar besin depo etmektedirler (Hahn ve Denlinger, 2007). Organizmalar, pre-diyapoz fazda çevresel koşulların değerlendirilmesi, enerji kaynaklarının düzenlenmesi (artan beslenme, azalan insülin sinyali/PI3K ve yağ miktarının artması vb.) gibi metabolik bir süreçten geçmektedir. Diyapoz sürecinde ise çevresel uyarılara tepki göstermemektedirler. Genel olarak hücre döngüsünün durduğu, transkripsiyon, hücre solunumu ve metabolik işlevlerin azaldığı bir süreç olarak bilinmektedir (Bradshaw ve ark., 1977). Post-diyapoz fazında ise çevresel koşulların normale dönmesi ile birlikte, canlının büyüme ve gelişmesi normal seviyede devam etmekte, metabolik aktiviteleri artarak normal haline dönmektedir. Diyapoz sürecinde azalan, hücre solunumu ve metabolik fonksiyonlarda transkripsiyon seviyesi artışı gerçekleşmektedir.

Ergin dönemdeki böcekler diyapoz durumunda vücutlarındaki yağ dokusunu besin deposu olarak kullanırlar. Aynı zamanda yağ dokusu post-diyapoz fazında üreme ve çoğalma gibi fonksiyonlar için enerji kaynağıdır (Hahn ve Denlinger, 2007). Böcek, pre-diyapoz fazındaki beslenmesine bağlı olarak vücudundaki depoladıkları yağ dokusunda bulunan besin rezervlerini arttırabilmektedir (Fliszkiewicz ve Wilkaniec, 2007).

Bugüne kadar test edilen tüm depolanmış ürün zararlıları donmaya karşı dirençli değildir ve donduklarında ölürlür (Wilches ve ark., 2016). Genel olarak, donmaya karşı

dirençli böcekler, aşırı soğuma noktalarını (SCP, supercooling point) kış boyunca hayatta kalma oranlarını artırmak için düşürürler (Lee, 1991; Fields, 1992). Böceklerin SCP'leri -4°C ile -22°C aralığındaki sıcaklıklardır; bu değerlerin üstündeki sıcaklıklarda yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri, buldukları sıcaklık koşullarında kaldıkları zamana bağlıdır. Daha yüksek sıcaklıklarda, daha kısa süre kalmaları yaşayabilmelerine olanak tanımaktadır (Evans, 1987; Fields, 1992). Çalışmalar arasında soğuğa en dayanıklı depo zararlısı böceklerin *Sitophilus granarius* L. ve *T. granarium* olduğu kanıtlanmıştır (Fields, 1992).

Diyapoz genel olarak çevresel fotoperiyot ya da sıcaklık gibi uyarıcılarla indüklenmekte ya da sonlanmaktadır. Fakat, bazı organizmalarda zorunlu bir diyapoz süreci görülmektedir. Kapranın çok düşük derecedeki sıcaklıklara bile dirençli olması, ekstrem koşullara uyum sağlayabilmesine yardımcı olan fakültatif bir diyapoza girmesinden kaynaklanmaktadır (Tauber ve ark., 1986). Bu süreçte böceğin son dönem larvaları nadiren beslenmekte ve deri değiştirmektedir (Burges, 1962a; Nair ve Desai, 1972). Ayrıca çeşitli stres koşullarında kapra böceğinin neredeyse 8 yıl kadar uzun bir süre boyunca diyapozda kalması, bu depo zararlısı ile mücadeleyi zorlaştırmaktadır (Burges, 1962).

Diyapoz, yaşam döngüsü ve indükleyen uyarıcılara bağlı olarak zorunlu (obligat) ya da zorunlu olmayan (fakültatif) diyapoz olarak kategorize edilmektedir. Zorunlu diyapoza giren böcekler, çevre koşulları haricinde, yaşam evrelerinde daha önce belirlenmiş bir zamana kadar sabitlenmiş gelişme dönemlerinde kalmaktadır. Bu diyapoz süreci her nesil için geçerlidir ve genellikle yılda bir nesil olan (univoltine) böcekler zorunlu diyapoza giren türlerdâhildir. Fakültatif diyapozda ise, böcekler çevresel uyarıların etkisiyle hayatta kalabilmeleri adına geçici olarak duraklamış bir gelişim sürecine girmektedir. Bu diyapoz türü böceklerin çoğunda görülmektedir. Yılda iki nesil (bivoltine) ve ikinin üstünde nesil veren böceklerde fakültatif diyapoz görülmektedir. Örneğin, bazı türlerin yer değiştirme sürecinde güneyden kuzey bölgelere geçişleri sırasında, hayatta kalanların sayısı azalma göstermiş, bu duruma paralel olarak bu türlerin zorunlu diyapoza girmeleri gerekmiştir. Kuzeyden daha sıcak bölgelere geçiş sürecinde ise, diyapoz isteğe bağlı olarak görülebilmekte, daha da sıcak bölgeler de ise diyapoza ihtiyaç duyulmamaktadır (Lees, 1955).

2.5. Isı Şok Prtoteinleri (Heat Shock Proteins=HSP's)

Böcekler, farklı koşullara uyum sağlamak için bağışıklık ve savunma sistemlerini başarıyla kullanma kabiliyetine sahip, muhteşem canlılardır (Rosales ve Vonnice, 2017). Protein ifadelerinin düzenlenmesi, böceklerin farklı stres sinyallerine karşı kullandıkları savunma mekanizmalarından birisidir (Guz ve ark., 2021).

HSP'ler ilk olarak 1962 yılında Ferruccio Ritossa ve arkadaşlarının *Drosophila melenogaster* larvasına uyguladıkları sıcaklık şoku sonucunda, sineğin tükürük bezlerindeki politen kromozomlarında anormal bir şişkinliği fark etmeleriyle birlikte keşfedilmiştir (Ritossa, 1962; Pockley, 2003). Bu gen ürünlerinin 1974 yılına kadar tanımlanamaması sonucunda, Isı Şok Proteinleri (Heat Shock Proteinleri = HSP'ler) ismi verilmiştir (Tissières ve ark. 1974; Pockley, 2003). Yapılan araştırmalar sonucunda HSP'lerin çeşitli organizmalarda büyük ölçüde korunduğu bildirilmiştir (Schlesinger, 1990). HSP'ler, yüksek sıcaklıklara verdikleri yüksek ifade tepkileri dolayısı ile mevcut ismini edinmiş bir süpergen ailesidir (Ritossa, 1996). Ayrıca, şaperon olan HSP'ler, hücresel düzeyde stres altında iken, doğru protein katlanmasının korunmasına yardımcı olmada bu özelliklerinden faydalanarak, çoğunlukla yüksek derecede ifadelenecek görev alırlar (Nollen ve Morimoto, 2002). HSP'ler homolojilerine ve moleküler ağırlıklarına göre kategorize edilmektedir. Genel olarak HSP'ler; HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 ve küçük HSP'ler (small Heat Shock Proteinleri= Küçük HSP'ler) olarak sınıflandırılmıştır (Tutar ve Tutar, 2010). Bu aileler arasında sHSP'ler, 80-100 amino asit ve 12 ila 42 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahip, karakteristik korunmuş α -kristalin domaini içermektedir (Caspers ve ark., 1995). Bu durumda diğer büyük HSP'ler 60 kDa olan HSP60 ailesi, 70 kDa HSP70 ailesi ve daha yüksek moleküler ağırlıkta bulunan HSP90 ailesi olarak adlandırılmıştır (Shen ve ark., 2015).

HSP'ler böceklerde proteinleri ısı (Wang ve ark., 2019), soğuk (Joplin vd., 1990), yüksek popülasyon yoğunluğu (Wang ve ark., 2007), ağır metaller (Martínez-Paz ve ark., 2014) ve UV ışınması (Sang ve ark., 2012) gibi abiyotik streslere, virüs (Lyupina ve ark., 2010), bakteri (Iryani ve ark., 2017), mantar (Richards ve ark., 2017) gibi biyotik streslere maruziyette dönüşü olmayan kümelenme ve yanlış katlanmadan korur (Hartl ve Hayer-Hartl, 2002; Sørensen ve ark., 2003). Hatta HSP'ler böcekte diyapoz (Yocum ve ark., 1998), hücresel stres direncinde (Landry ve ark., 1989); oksidatif stres, apoptoz,

farklılaşma (Arrigo, 1998) ve yaşam süresi (Morrow ve ark., 2004) gibi önemli biyolojik olaylarda görev alırlar.

HSP'lerin diyapozda artan strese karşı direnç sağladığı ve gelişimsel döngüyü durdurduğu düşünülmektedir (Denlinger ve ark., 2001; MacRae, 2010; Rinehart ve ark., 2007). Ayrıca protein döngüsü, hücre döngüsü, steroid sinyalizasyonu gibi temel hücresel aşamalarda düzenleyici rol üstlenmektedir (Beato ve Klug, 2000; Helmbrecht ve ark., 2000; Pratt, 1997; Taipale ve ark., 2010).

HSP'ler canlılarda ısı, bakteriyel enfeksiyonlar, ateş, inflamasyon gibi hemen hemen neredeyse tüm hastalıklarda faaliyet göstererek immün yanıt oluşturabilmekte ve hastalıkların tedavi süreçlerinde hedef gösterilmektedir (Wu ve Tanguay, 2006; Weibezahn ve ark., 2005; Jones ve Masison, 2003; Tutar ve Tutar, 2010).

2.5.1. HSP60

HSP60 molekülü, yaklaşık olarak 60 kDa büyüklüğünde bir protein ailesidir. İlk keşfi elektron mikroskopunda sıradışı moleküler yapısının fark edilmesiyle gerçekleşmiştir. Spesifik bir çift toroid şeklinde 14 alt birime sahip bir oligomerdur.

HSP60, hem prokaryotik hem de ökaryotik türler arasında dizi benzerliği gösteren, yeterince korunmuş bir protein sınıfıdır (Gupta, 1995). Bakterilerde, mitokondilerde ve kloroplastlarda yeterince bulunmaktadır. Organellerin nükleer DNA'sı tarafından kodlanıp, sitoplazmada sentezlendikten sonra mitokondriye transfer edilir (Neupert, 1997; Stanley ve Fenton, 2000). Normal koşullar altında, enerji veren enzimlerin metabolizmasında ve diğer proteinlerin katlanması ve bir araya getirilmesinde görev almaktadır. Olumsuz koşullarda HSP60 proteininin sentezi artar ve hasarlı proteinleri doğal formlarına döndürerek biyolojik aktivitelerini tekrar düzenlerler (Cheng ve ark., 1989; Ostermann ve ark., 1989; Buchner ve ark., 1991; Martin ve ark., 1991).

2.5.2. HSP68

HSP68 mitokondride lokalizedir ve immünolojik olarak HSP70 proteinlerinin prokaryotik tipiyle (DnaK benzeri) bağlantılı olan, bir proteindir (Nover ve Scharf, 1984;

Neumann ve ark., 1993). HSP68'in proteinlerin korunmasında ya da renatürasyonunda bir işleve sahip olduğu düşünülmektedir (Palter ve ark., 1986). Soğuk ortam koşullarında *HSP68* geninin canlıların hayatta kalmasında önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Colinet ve ark., 2009). Ayrıca *HSP68* geninin, zararlı olduğu kabul edilen UV-A radyasyonuna karşı savunmada rol alabileceği bildirilmiştir (Sang ve ark., 2012).

2.5.3. HSP83

HSP83, şaperon HSP90'nın homoloğu olarak bilinmektedir. *D. melanogaster*'de yaşam süresinin uzunluğu ve verimliliğin kontrolünde görev aldığı bilinmektedir. Ayrıca zararlı popüslasyonların sebep olduğu mutasyonları engelleyerek morfolojik gelişime yardımcı olduğu rapor edilmiştir (Chen ve Wagner, 2012). Will ve arkadaşları (2017) RNA interferans (RNAi) aracılığı ile *HSP83* dsRNA'nın, *HSP83*'ün ifadesini zayıflatarak *Acyrtosiphon pisum*'de yaşam süresi, verimlilik ve canlı yavru sayısında azalmaya sebep olduğunu ifade etmiştir. HSP83 geninin HSP70 ve HSP23 gibi genlere kıyasla daha kolay bir şekilde indüklenbildiği bilinmektedir (Xiao ve Lis, 1989).

Sesamia nonagrioides'te yapılan genomik analiz sonucunda *HSP83* geninden elde edilmiş cDNA'nın yaklaşık olarak 2.6 kb boyutta, 82.6 kDa kütleyle sahip olduğu saptanmıştır. *HSP83*'ün diyapozaya giren ve girmeyen larvalarda yapısal olarak ifadelendiği ve ısı muamelesi sonucunda 15 kat indüklenbildiği görülmüştür. Ayrıca *HSP83* geninin diyapozun gelişimsel bir bileşeni olduğu bildirilmiştir (Gkouvitsas ve ark., 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan ana materyal *Trogoderma granarium*'dur ve böcekler Diyarbakır Zirai Mücadele Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Böcek yetiştirilmesi ve yapılan deneyler Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi ve Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİTAM)'nde gerçekleştirilmiştir.

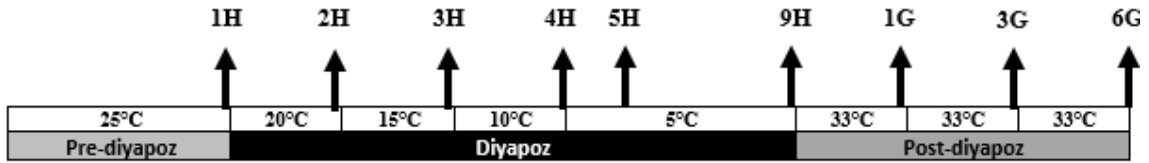
3.1. *Trogoderma granarium*'un Yetiştirilmesi

Böcek kültür ortamını oluşturan buğday taneleri, 55°C ayarlanmış etüvde 6 saat tutularak, olası bir kontaminasyona karşı steril edilmiştir. Kültür ortamının bulunduğu üç adet plastik kabın kapaklarına, kabın içerisine hava girişi sağlamak amacıyla delikler açılmış; böceklerin dışarı çıkmaması için ise, ince bir tül yardımıyla açılan deliklerin üstü kapatılmıştır. Üç ayrı kaba 500 g buğday ve 50 adet son dönem böcek larvası konularak, kaplar 33±1°C sıcaklık %65±5 neme ayarlı inkübatörde karanlıkta tutulmuştur. Larvalardan ergin çıkışı gözlenmiş ve yumurta bırakmaları için erginler 7 gün süreyle kültür ortamında bırakılmıştır. Daha sonra erginler uzaklaştırılarak kültür oluşturulmuştur. Gelişimsel dönemlere özgü gen ifade analizlerini gerçekleştirmek için, birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci dönem larvalar ile bir haftalık erkek ve dişi erginler RNA izolasyonu için toplanmıştır. Toplanan örnek sayısı, NucleoZOL (Machery122 Nagel GmbH, Düren, Almanya) RNA izolasyon kitinde belirtilen, prosedüre uygun miktarlarda tartılarak, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve RNA izolasyonuna kadar -80°C buzdolabında tutulmuştur.

3.2. Diyapoz İndükleme

Bu aşamada beşinci dönem larvalar yarı saydam plastik bir kaba alınmış ve hava giriş çıkışı olması amacıyla kapak deliği ince bir tül yardımıyla kapatılmıştır. Kabın içerisine diyapoza giren böcekleri tespit edebilmek amacıyla, siyah bir karton katlanarak koyulduktan sonra, kaplar 33±1°C inkübatörde tutulmuştur. Böceklerin diyapoza girebilmeleri için sıcaklık her hafta yaklaşık ±5°C düşürülerek, 33±1°C'den 5±1°C'ye kadar soğutulmuştur. Diyapoza giren larvalar katlanmış kartonun ara kısımlarına girmiş, böylelikle diyapoza girmeyen larvalardan kolayca ayrıştırılabilişlerdir. Diyapoz

larvalarında, daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi hareketsiz kalma, beslenmeyi bırakma, pupalaşmanın gecikmesi gibi diyapoz belirtileri 20°C ve altına düşüş itibari ile gözlenmiştir (Burges, 1959; Wilches ve ark., 2019). 20°C'ye kadar toplanan örnekler pre-diyapoz grubunu oluşturmuştur. 20°C ve 5°C arası sıcaklıklarda toplanan örnekler diyapoz grubunu oluşturmuştur. Sıcaklık dört hafta kadar 5°C'de tutulduktan sonra, inkübatör 33°C'ye ayarlanarak diyapoz sonlandırılmıştır. 33°C'de 1, 3 ve 6 gün süre ile bekletilen örnekler post-diyapoz grubunu meydana getirmiştir.



Şekil 3.1. Soğuk kaynaklı diyapoz sürecinin şematik gösterimi. 1H pre-diyapozu, 2H, 3H, 4H, 5H ve 9H diyapozu (hafta olarak) ve 1G, 3G ve 6G, diyapoz sonrası gelişimin örnekleme sürelerini (gün olarak) göstermektedir.

Farklı sıcaklıklarda toplanan 16 adet diyapoz larvaları ile eş zamanlı olarak 16 adet kontrol örnekleri toplanmış ve hızlıca NucleoZOL reaktifi içeren 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere hızlıca aktarılmıştır. Diyapozu girmedikleri düşünülen larvalar deneylere dâhil edilmemiştir (Burges, 1963). Kontrol grubunu oluşturan larvalar, yukarıda verilen yetiştirme koşullarında (33±1°C'de) tutulmuş ve diyapoz örnekleri ile aynı sürelerde RNA izolasyonu için toplanmıştır.

3.3. RNA İzolasyonu

Diyapoz ve diyapozda olmayan son dönem *T. granarium* larvalarında *TgHSP60*, *TgHSP68* ve *TgHSP83* genlerinin ifade analizi için, her iki gruptan toplanan örneklerden RNA izolasyonu yapılmıştır. NucleoZOL Reaktifi (Machery-Nagel GmbH, Düren, Almanya) prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilen bu işlemde, aşağıda belirtilen adımlar izlenmiştir:

1) Mikrosantrifüj tüplerine konulmuş 16 adet son dönem larva üzerine 500 µl NucleoZOL reaktifi eklenmiş ve mikrosantrifüj tüpüne uyumlu steril böcek ezici çubuk yardımıyla bu sıvı içerisinde homojenize edilmiştir.

2) Ardından, 15 s çalkalama işleminden sonra 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

3) Bekleme işlemi biten tüpler, 12.000 x g devirde 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir.

4) Tüpte santrifüj sonrası RNA'nın bulunduğu sıvı kısım olan süpernatantlar, yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.

5) Sonrasında çöktürme işlemi için izopropanol eklenmiştir.

6) Ardından oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.

7) İnkübasyon işleminden sonra 12.000 x g devirde 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir.

8) Gözle görünür halde olan dibe çökmüş RNA pelleti, 500 µL %75 oranında hazırlanmış etanol ile iki kez yıkama işleminden geçirilmiştir.

9) En son aşamada ise RNA pelletleri, içinde RNaz bulunmayan su ile sulandırılmış, ardından RNA'ların miktar ve 260 nm ile 280 nm absorpsiyon oranları Multiskan GO Mikroplaka Spektrofotometresi (Termo Fisher Scientific, MA, ABD) yardımıyla elde edilmiştir.

3.4. cDNA Sentezi

RNA izolasyonu sonrasında elde edilen örneklerden OneScript® Plus cDNA Sentez Kiti (ABM Good, Kanada) protokolüne uygun olarak cDNA sentezi yapılmıştır. İlk aşamada 1 µg RNA üzerine 1 µl oligo-dT primer, 1 µl dNTP, OneScript® Plus RTase ve 4 µl 5X RT tamponu eklenmiş ve ardından hacim ddH₂O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Denatüre örnek üzerine eklenen reaktifler kitle sunulan miktarlarda hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyonlar 55°C'de 15 dakika, 85°C'de 5 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi tamamlanmış ve sentezlenen cDNA ürünleri -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5. Primer Tasarımı

Trogoderma granarium'un diyapoz fizyolojisinde görev alan genleri tanımlamak üzere oluşturulan cDNA kütüphanesinde, *TgHSP60*, *TgHSP68* ve *TgHSP83* isimli üç adet *HSP* geni bulunmuştur (Dağeri ve ark., 2022). Kantitatif Eş Zamanlı Ters Transkriptaz PCR (RT-qPCR) çalışmasında kullanılan bu genlere özgü primerler Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) isimli siteden yararlanılarak tasarlanmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerler

Gen kısaltması	Gen adı	Primerlerin Dizisi (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı	Ürün uzunluğu (bp)
<i>TgHSP60</i>	<i>Heat Shock Protein 60</i> geni	F: CTTCTGGTGTGCGCTCATTAT R: CATACCACCCATGCCAGTT	51°C	112
<i>TgHSP68</i>	<i>Heat Shock Protein 68</i> geni	F: ACTCCTCTGTCTCTGGGAATAG R: GGTGAAGGTCTGTGTCTGTTT	52°C	101
<i>TgHSP83</i>	<i>Heat Shock Protein 83</i> geni	F: GCCAAACCAGAAACACATCTAC R: CCTACTTCGAATCCACGCTTCT	52°C	111
<i>TgACT</i>	β -actin geni	F: ATGGCGTGTGGCAAAGCGTAA R: CCTCAACACACCAGCTATGT	53°C	120

3.6. Kantitatif Eş Zamanlı PCR (RT – qPCR)

Hedef gen bölgelerinin Kantitatif Eş Zamanlı Ters Transkriptaz PCR (RT-qPCR) amplifikasyonunu (QuantStudio 3 Real-Time PCR System, Applied Biosystems) gerçekleştirmek için biyolojik ve tekniksel üçlü tekrarlar halinde reaksiyonlar hazırlanmıştır. Reaksiyonlara negatif kontrol eklenerek, normalizasyon hesaplamalarında kullanılmak üzere cDNA kütüphanelerinden belirlenen β -actin housekeeping geni çalışılmıştır. Primerlerin dimer yapısı oluşturup oluşturmadığı, reaksiyon sonunda erime eğrisi analizi çalışılarak kontrol edilmiştir. Bu aşamada FastStart Essential DNA Green Master (Roche) kullanılmıştır. Reaksiyon için kullanılan bileşenler aşağıdaki gibidir:

Çizelge 3.2. RT - qPCR çalışması için kullanılan bileşenler

Reaktifler	Hacim
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	10 μ l
Forward Primer (10 μ M)	1 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l
cDNA	50 ng
H ₂ O	X
Toplam hacim	20 μ l

Eş Zamanlı PCR platelerine eklenmiş olan yukarıdaki bileşenlerin üzeri, ısıya dayanıklı, cihaza uyumlu plate sealleri ile kapatılmış ve ardından cihaz uygun programda çalıştırılmıştır.

RT-qPCR cihaz koşulları, ön inkübasyon için 95°C sıcaklıkta 10 dk sonrasında 95°C'de 10 s, primerlere özgü bağlanma sıcaklığında 10 s, uzama aşaması için 72°C 'de 10 s şeklinde 40 döngü takibinde soğutma basamağı için 40°C'de 10 s sürecek basamaklar olarak ayarlanmıştır. RT-qPCR analizi sonucunda elde edilen CT değerleri, β -actin housekeeping genine ait CT değerleri ile karşılaştırılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile normalize edilmiştir. Tüm primer setleri için her reaksiyonun etkinliği, standart eğri ölçülerek belirlenmiş ve her bir amplikonun doğruluğu, bir erime eğrisi analizi yapılarak doğrulanmıştır. *TgHSP60*, *TgHSP68* ve *TgHSP83*'ün göreceli ifade seviyeleri, göreceli kantitatif yöntem olan $2^{-\Delta\Delta CT}$ kullanılarak hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001). Gelişimsel ifade analizi hesaplanmasında, ilgili genlerin göreceli ifade düzeylerini ölçmek amacıyla değiştirilmiş bir karşılaştırmalı CT yaklaşımı olan $2^{-\Delta CT}$ kullanılmıştır (Pfaffl, 2001).

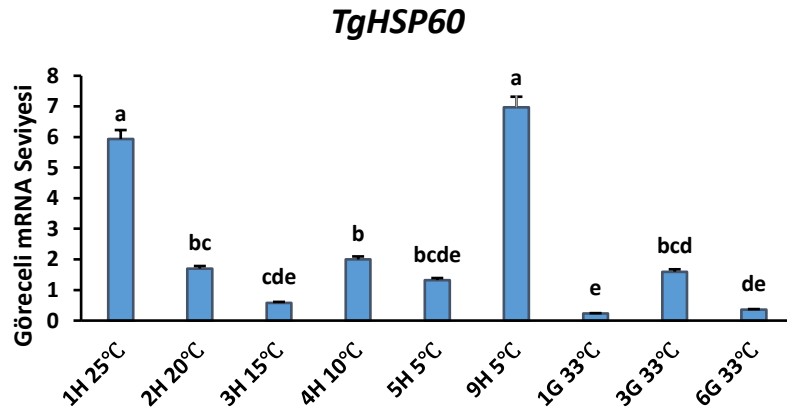
3.7. İstatiksel Analiz

Normalizasyon sonrası elde edilen verilerden istatistiksel değerlendirme için Minitab 19.0 (Minitab Ltd, Brandon Court, Birleşik Krallık) yazılımı kullanılmıştır. Numuneler arasındaki istatistiksel anlamlılık düzeyinin belirlenmesi amacıyla, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile hemen sonrasında Tukey HSD (Honestly Significant Difference) testi kullanılmıştır. İstatiksel olarak kabul edilen anlamlılık değeri $P < 0.05$ 'tir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bu tez çalışması ile *TgHSP60*, *TgHSP68* ve *TgHSP83*'ün ifade seviyelerinin, *T. granarium*'un soğuk ile indüklenmiş pre-diyapoz, diyapoz ve post-diyapoz fazlarındaki ifade seviyeleri ayrıntılı olarak ortaya koyulmuştur.

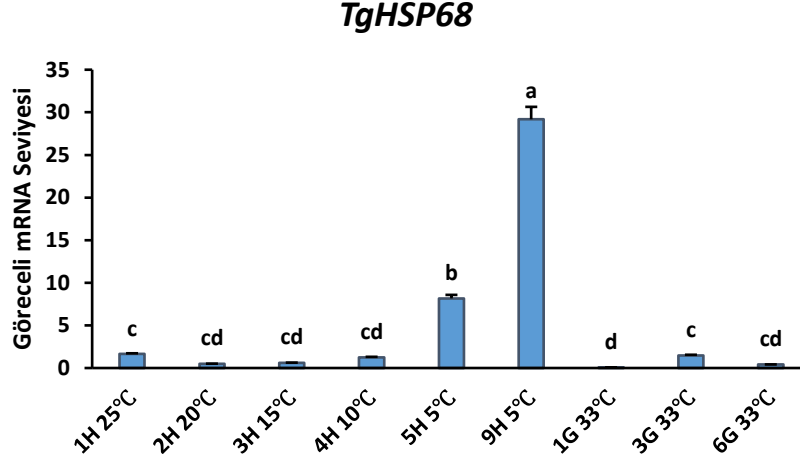
Pre-diyapoz fazında *TgHSP60* geninin önemli ölçüde yukarı yönde regüle olduğu tespit edilmiştir. Diyapoz fazında *TgHSP60* geninin yukarı doğru regüle olduğu diğer sıcaklıklar, sırası ile larvanın dört hafta süre ile tutulduğu 5°C, 10°C, 20°C ve sıcaklığın 10°C'den 5°C'ye düşürüldüğü beşinci hafta örneklerinde görülmüştür. Post-diyapoz fazında, *TgHSP60* ifadesinin larvalarda sıcaklığın 33°C'ye yükseltildiği ilk ve altıncı günde aşağı yönde, üçüncü günde ise yukarı yönde regüle edildiği tespit edilmiştir. Bu doğrultuda bu genin *T. granarium*'un soğuk kaynaklı diyapoz ve post-diyapoz gelişimine katkı sağlayabileceği düşünülebilir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. *TgHSP60* geninin pre-diyapoz, diyapoz ve post diyapoz fazında göreceli mRNA seviyeleri (Pre-diyapoz (1H), diyapoz (2, 3, 4, 5, 9H), post-diyapoz (1, 3, 6G)). (Göreceli mRNA seviyeleri için $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılmıştır.)

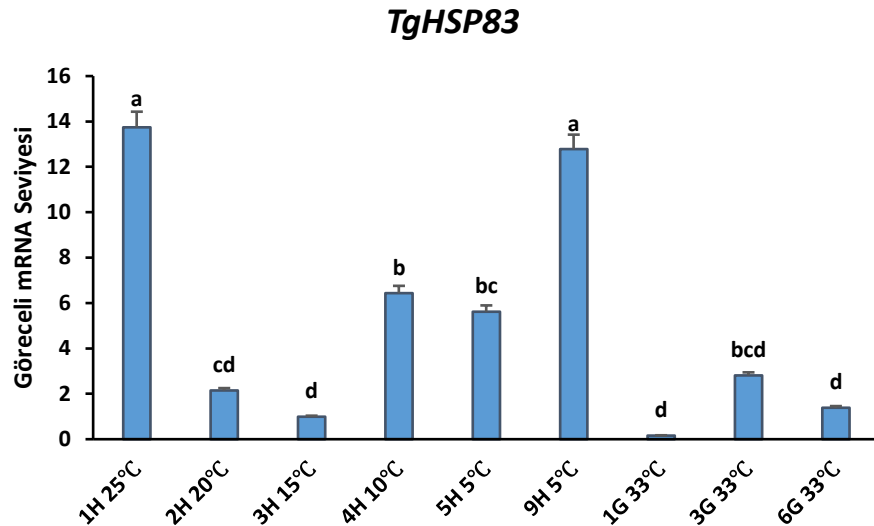
TgHSP68 gen ifadesinin, pre-diyapoz fazında yukarı yönde regüle olduğu tespit edilmiştir. Diyapoz fazındaki son dönem larvalarda en yüksek *TgHSP68* ifadesi, larvanın dört hafta süre ile tutulduğu 5°C'de gözlenmiştir. Bunu sırası ile larvanın maruz kaldığı sıcaklığın 10°C'den 5°C'ye düşürüldüğü beşinci hafta ve 10°C'deki dördüncü hafta örnekleri izlemiştir. 20°C ve 15°C'de tutulan örneklerde *TgHSP68* gen ifadesinin aşağı yönde regüle olduğu görülmüştür. Post-diyapoz örneklerinde ise, larvaların ilk ve altıncı gününde *TgHSP68* ifadesinin aşağı yönde, üçüncü gününde ise yukarı yönde regüle edildiği tespit edilmiştir. Grafikten anlaşılacağı üzere, *TgHSP68*'in kapra böceğinin

çalışılan diyapoz aşamalarının birçoğunda dikkat çekici şekilde ifade edildiği görülmektedir (Şekil 4.2.).



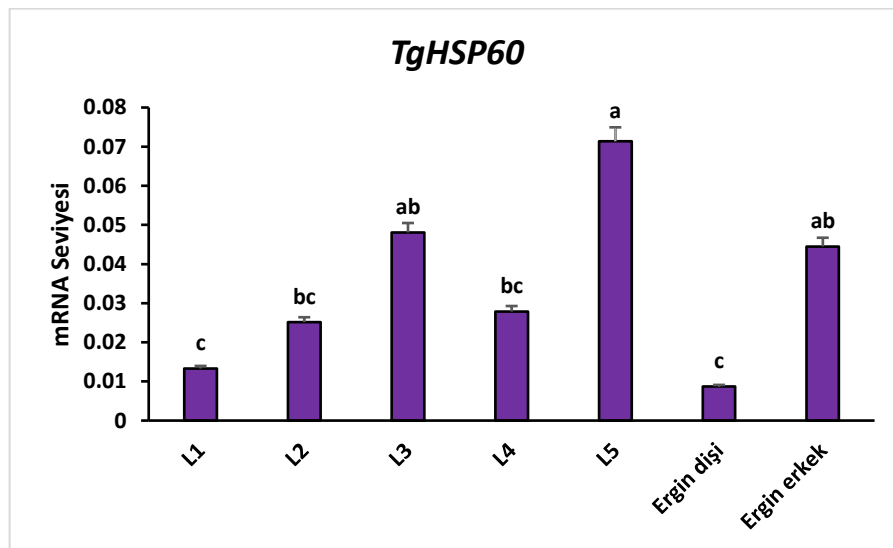
Şekil 4.2. *TgHSP68* geninin pre-diyapoz, diyapoz ve post diyapoz fazında göreceli mRNA seviyeleri (Pre-diyapoz (1H), diyapoz (2, 3, 4, 5, 9H), post-diyapoz (1, 3, 6G)). (Göreceli mRNA seviyeleri için $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılmıştır.)

Sıcaklığın 33°C'den 25°C'ye düşürüldüğü son dönem larvaların pre-diyapoz fazında, *TgHSP83* ifadesinin önemli ölçüde artış gösterdiği gözlenmiştir. Diyapoz fazında en yüksek *TgHSP83* ifadesi larvanın dört hafta süre ile tutulduğu 5°C örneklerinde tespit edilmiş ve sırası ile 10°C, 5°C ve 20°C soğuğa maruz bırakılan örneklerce takip edilmiştir. Diyapoz fazında 15°C sıcaklıkta tutulmuş larvalarda *TgHSP83* ifadesinde, neredeyse herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Post-diyapoz örneklerinde ise, fazın ilk günündeki larvalarda *TgHSP83* ifadesinin aşağı yönde, üçüncü ve altıncı gününde ise yukarı yönde regüle edildiği tespit edilmiştir. Derin diyapoz fazında aşırı ifadelenmesi *TgHSP83*'ün, kapra böceğinin soğuk kaynaklı diyapoz düzenlemesinde rol oynayabileceğini göstermektedir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. *TgHSP83* geninin pre-diyapoz, diyapoz ve post diyapoz fazında göreceli mRNA seviyeleri (Pre-diyapoz (1H), diyapoz (2, 3, 4, 5, 9H), post-diyapoz (1, 3, 6G)). (Göreceli mRNA seviyeleri için $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılmıştır.)

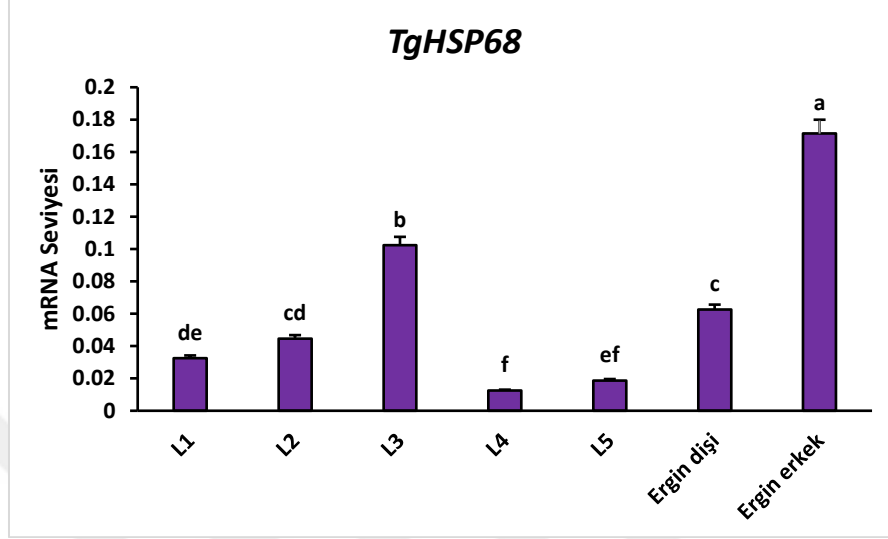
Kapra böceğinin gelişimsel dönemlerindeki larvalarında ve erginlerinde *TgHSP60* geninin ifade seviyesi oldukça düşük bulunmuştur. *TgHSP60* en yüksekten en aşağıya doğru sırası ile beşinci dönem, üçüncü dönem, dördüncü dönem, ikinci dönem ve birinci dönem örneklerinde tespit edilmiştir. Ergin erkek böceklerdeki gen ifade seviyesi, dişi ergin böceklere göre daha fazla bulunmuştur (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Kapra böceğinin gelişimsel dönemdeki larvaları ve erginlerinde *TgHSP60* geninin ifadesi

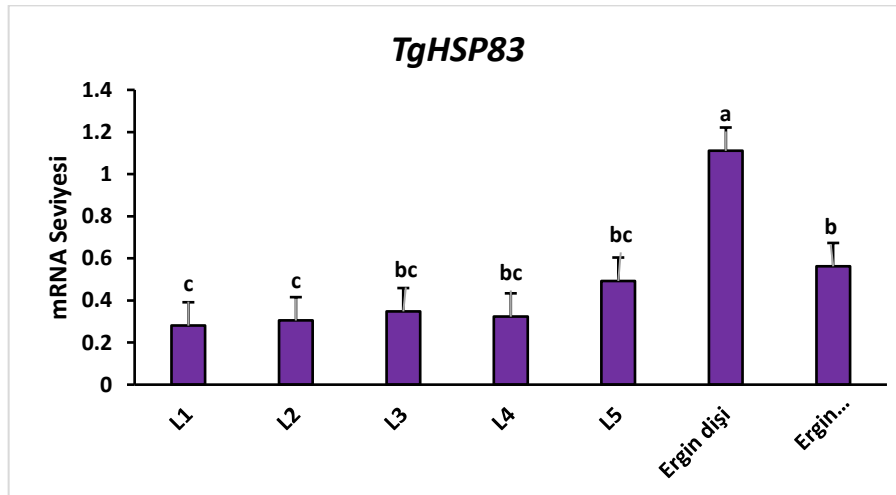
TgHSP68 gen ifadesi hem gelişimsel larval dönemler, hem de ergin böceklerde oldukça düşük miktarda tespit edilmiştir. Larval dönemdeki en yüksek ifadeler sırası ile

üçüncü dönem, ikinci dönem, birinci dönem, beşinci dönem ve dördüncü dönemlerde gözlenmiştir. Ergin erkek böceklerde *TgHSP68* ifade seviyesi ise, ergin dişilere kıyasla daha fazla bulunmuştur (Şekil 4.5.).



Şekil 4.4. Kapra böceğinin gelişimsel dönemdeki larvaları ve erginlerinde *TgHSP68* geninin ifadesi

TgHSP83'ün gelişimsel dönemlerine ait larvalarındaki ifade seviyesi, larvalarda birbirine yakın ve düşük miktarda tespit edilmiştir. Ergin dişideki gen ifade seviyesi dikkat çekici miktarda yüksek ve erkeklere oranla daha fazla bulunmuştur (Şekil 4.6.).



Şekil 4.5. Kapra böceğinin dönemdeki larvaları ve erginlerinde *TgHSP83* geninin ifadesi

HSP'lerin, ısı şokundan sonra gelişen yüksek gen ifadesi cevabı haricinde, birçok stres koşuluna yanıt olarak indüklenebilir olduğu bilinmektedir. Kapra böceği de dâhil olmak üzere pek çok böcek, çevresel koşullar uygun olmadığında diyapozu bir hayatta

kalma stratejisi olarak kullanarak, kendilerini koruyabildikleri bir fakültatif diyapoz girme eğilimindedir. Diyapozun HSP'ler üzerindeki etkileri *Drosophila triauraria* (Goto ve ark., 1998; Goto ve Kimura, 2004) *Sarcophaga crassipalpis* (Rinehart ve Denlinger, 2000), *Eurosta solidaginis* (Zhang ve ark., 2011), *Nasonia vitripennis* (Wolschin ve Gadau, 2009), *Sesamia nonagrioides* (Gkouvtzas ve ark., 2008), *Omphisa fuscidentalis* (Tungjitwitayakul ve ark., 2008), *Calliphora vicina* (Fremdt ve ark., 2014), *Pieris melete* (Miano ve ark., 2002) ve *Sitodiplosis mosellana* (Zhao ve ark., 2021) gibi birçok böcekte araştırılmıştır. Diyapozda yukarı yönde regüle edilmiş HSP'ler ve küçük HSP'lerin soğuğa dayanıklılık, protein sekestrasyonunu, gelişimin baskılanması ve hücre iskeleti stabilizasyonunun iyileştirilmesi ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Rinehart ve ark., 2010; King ve MacRae 2015; Quan ve ark., 2018). Bu çalışmada, *T. granarium*'un soğuk ile indüklenmiş diyapoz larvalarından oluşturulan cDNA kütüphanesinde (Dağeri ve ark., 2022) *Chaperonin* olarak da anılan *HSP60*, *HSP68* ve *HSP83* tespit edilmiştir.

Diyapozdaki böceklerde *HSP60*, *HSP68* ve *HSP83*'ün ifade seviyeleri ile ilgili gerçekleştirilen çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. *Sarcophaga crassipalpis*'te *HSP60*'ın α -alt birimini kodlayan *TCP-1*'in mRNA seviyesinin, böceğin diyapoz fazına girmesiyle birlikte aşırı miktarda ifade edildiği tespit edilmiştir (Rinehart ve ark., 2007). *Delia antiqua*'nın diyapoz sırasında metabolik aktivitesinin azalmasına, önemli ölçüde ifade edilmiş *HSP60* geninin eşlik ettiği öne sürülmüştür (Kayukawa ve Ishikawa, 2009). *Chilo suppressalis*'te *HSP60*, *HSP70* ve *HSP90*'ın ifade seviyelerinin diyapoz sırasında arttığı, diyapoz sonrası fazda ise azaldığı tespit edilmiştir (Lu ve ark., 2013). Ayrıca, *HSP60*'ın -38°C 'ye kadar soğuyabilen *Epiblema scudderiana* larvalarının (Storey, 1990) kış boyunca hayatta kalmasına yardımcı olduğu, genin yukarı yönde regülasyonu ile rapor edilmiştir (Storey ve Storey, 2008). Benzer şekilde, *T. granarium*'da *TgHSP60*'ın pre-diyapoz, diyapoz ve post-diyapoz fazlarında yukarı yönde regüle edilmesi, bu genin soğuk kaynaklı diyapozda sağkalıma ve diyapoz sonrası gelişime katkı sağladığını düşündürmektedir.

Böceklerde *HSP68* ve *HSP83* üzerinde sınırlı sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, her iki genin de soğuğa duyarlı olduğu bildirilmiştir (Colinet ve ark., 2010; Colinet ve Hoffmann, 2012). *HSP68*'in, proteinlerin renatürasyonu ve korunmasında *HSP70*'e benzer bir role sahip olduğu düşünülmektedir (Palter ve ark., 1986; Colinet ve ark., 2010). Diyapoz organizmalar için yaşamı uzatan bir mekanizma olarak

düşünülebilir. Ancak, bu süreçte organizmanın hayatta kalmak için oksidatif stresi uygun bir şekilde temizlemesi büyük önem taşımaktadır (Zhao ve Shi, 2010). Wang ve ark. (2003) *HSP68*'in aşırı ifadesinin, *D. melanogaster*'ı oksidatif strese karşı koruduğunu ve ömrünü uzattığını bildirmiştir. *T. granarium*'da pre-diyapoz, diyapoz ve post-diyapoz fazlarında ortaya çıkan yüksek *TgHSP68* gen seviyeleri, bu genin organizmada soğuğa yanıt oluşturmada, oksidatif stresin giderilmesi ve yaşam süresinin uzatılmasında muhtemelen rol aldığına işaret etmektedir. Ayrıca, *HSP68*'in *D. melanogaster*'da soğuk stresini takip eden iyileşme aşamasına katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (Colinet ve ark., 2010). Benzer şekilde, bu çalışmada *TgHSP68*'in post-diyapoz fazının üçüncü gününde artan ifadesi, genin larvanın soğuk kaynaklı diyapoz sonrası gelişimine olası katkı sağladığı anlamına gelebilir.

Drosophila triauraria'da, *HSP83*'ün ifadesinin diyapoz regülasyonu ile ilişkili bulunmadığı belirtilmiştir (Goto ve Kimura, 2004). Bu durumun aksine, *Sesamia nonagrioides*'in pre-diyapoz ve post-diyapoz fazlarındaki az miktarda ifadesine kıyasla, derin diyapoz fazında *HSP83* geninde, yüksek miktarda ifade artışı olduğu tespit edilmiştir (Gkouvtis ve ark., 2009). Bu çalışmada, *TgHSP83*'ün kapra böceğinin pre-diyapoz, diyapoz ve post-diyapoz fazlarında yukarı yönde regüle olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, *TgHSP83*'ün, khapra böceğinin soğuk kaynaklı diyapoz düzenlemesinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca, *HSP*'lerin böcek diyapozu ile ilgili ifade paterninin *HSP*'ler için farklılık gösterebileceği sonucuna varılabilir.

Böceklerin gelişimsel dönemlerindeki *HSP60*, *HSP68* ve *HSP83*'ün gen ifade paternleri üzerine sınırlı sayıda araştırma mevcuttur. Hücre büyümesi, gelişimi ve bölünmesi için hazırlığa yardımcı olan aktin, tübülün ve düzenleyici moleküllerin de dâhil olduğu, oluşan yeni proteinler *HSP60* tarafından katlanır (King ve MacRae, 2015). Bulgularımıza benzer şekilde, *Liriomyza sativa*, *Heortia vitessoides* ve *Trichogramma chilonis* 'teki *HSP60*, bu böceklerin gelişimsel dönemleri boyunca rol aldığına ilişkin ifade kalıpları göstermiştir (Huang ve ark., 2009; Cheng ve ark., 2018; Yi ve ark., 2018). *Spodoptera litura* ve *Chilo suppressalis*'in dişi erginleri, erkek erginlerine kıyasla, yüksek miktarda *HSP60* ifadesi göstermiştir (Shu et al. 2011; Lu et al. 2014). Bunun aksine, bu çalışmada ergin dişilerdeki *TgHSP60* transkriptlerinin ergin erkeklerinkinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. *HSP*'lerin farklı ifade kalıpları, farklı böceklerde *HSP*'lerin farklı gelişim süreçlerinden kaynaklanıyor olabilir.

D. melanogaster'ın birçok gelişimsel döneminde, *HSP68*'in mRNA seviyesi oldukça düşük seviyededir (Mason ve ark., 1984; Graveley ve ark., 2011). Böcek türlerine bağlı olarak, HSP'lerin gen ifadeleri farklı gelişim aşamalarında farklılık gösterebilir (Guz ve ark. 2021). *Harmonia axyridis*'in tüm larval gelişim dönemlerinde *HSP68*'in ifade edildiği, en yüksek ifade miktarının ise erginlerde olduğu tespit edilmiştir (Shen ve ark., 2015). Bu sonuç, kapra böceğinde gelişimsel dönemler boyunca çok düşük miktarlarda bulunmasının yanı sıra, ergin erkeklerde en yüksek seviyede tespit edilen *TgHSP68* ifadesine ilişkin bulgularımızla uyumludur.

Ceratitis capitata'nın gelişimsel dönemlerinde, *HSP83*'ün konstitütif ifadesi görülmüştür (Theodoraki ve Mintzas, 2006). *HSP83*'ün bağıl bazal mRNA seviyesinin ise, *Lucilia cuprina*'nın tüm gelişimsel dönemlerinde yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir (Concha ve ark., 2012). *Acyrtosiphon pisum*'da gerçekleştirilen fonksiyonel bir çalışmada, RNA interferans kullanılarak *HSP83* geninin susturulması, böceğin yaşam süresi, verimlilik ve canlı yavru sayısında azalmaya neden olmuştur (Will ve ark., 2017). *T. granarium*'un tüm gelişimsel dönemlerinde *TgHSP83*'ün konstitütif ifadesi, bu genin böceğin gelişimindeki muhtemel rolünü gösterebilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Son yıllarda, kontrolü zor böcek popülasyonlarını baskılayabilmek için kimyasal kontrol yöntemlerine sıklıkla başvurulmaktadır. Ancak, çok sayıda insektisit kullanımı organizmada bu tür kimyasallara karşı direnç oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca, insektisitlerin aşırı kullanımı hedef olmayan organizmaların elimine edilmesi, çevre, doğa ve insana zarar verme gibi çeşitli olumsuz yan etkiler içermektedir. Moleküler tabanlı genetik çalışmalar aracılığı ile böceklerin farklı stres koşulları ve kimyasallara direnci moleküler yönden incelenerek, bu mekanizmaların aydınlatılması sağlanabilmektedir.

Bugüne kadar, moleküler düzeyde *T. granarium*'da diyapozun *HSP*'ler üzerindeki etkisini araştıran hiçbir çalışma yapılmamıştır (Aralık, 2022). Gerçekleştirilen bu çalışma kapsamında zararlı larvasının soğuk stresine maruz bırakılmış diyapozda bulunan dönemlerine ait üç adet *HSP* geni ve bu genlerin diyapozun farklı fazlarındaki gen ifade düzeyleri analiz edilmiştir. Böylece *HSP*'lerin *T. granarium* diyapozu ile ilişkisi belirlenmiş ve zararlıın diyapoz fizyolojisi ile alakalı yeni bilgiler elde edilmiştir. Ayrıca bu genler organizmanın soğukta hayatta kalma işlevine ek olarak, zararlı ile mücadelede RNA interferans gibi yöntemler için kritik bir hedef görevi görmek üzere, dünya literatürüne katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Kawy, F. K., 1999, Effect of gamma-irradiation on some biological activities of the larval stage of the khapra beetle, *Trogoderma granarium Everts* (Col., Dermestidae), *Journal of Applied Entomology*, 123(4), 201-204.
- Ahmedani, M. S., Haque, M. I., Afzal, S. N., Aslam, M., and Naz, S., 2009. Varietal changes in nutritional composition of wheat kernel (*Triticum aestivum L.*) caused by Khapra beetle infestation, *Pakistan Journal of Botany*, 41(3), 1511-1519.
- Ahmedani, M. S., Khaliq, A., Tariq, M., Anwar, M., and Naz, S., 2007, Khapra beetle (*Trogoderma granarium Everts*): A serious threat to food security and safety, *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 44(3), 481-493.
- Andric. G., Kljajic. P., and Prazic-Golic. M., 2013, Efficacy of spinosad and abamectin against different populations of red flour beetle (*Tribolium castaneum* Herbst) in treated wheat grain, *Pesticidi i Fitomedicina*, 28(2): 103-110
- Anonim, 2008, Depolanmış Ürün Zararlıları. Zirai Mücadele Teknik Talimatları, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayınları Cilt 1, Ankara.
- Arrigo, A. P., 1998, Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death, *Biological chemistry*, 379(1), 19-26.
- AS, F., and Azher, M. A., 2020, Use Of Silica And Boric Acid Mixture to Control The Khapra Beetle (*Trogoderma granarium*, Dermestidae: Coleoptera) on Stored Wheat Seeds, *Plant Archives*, 20(1), 3015-3020.
- Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G., and Boukouvala, M. C., 2016, Population growth of the khapra beetle, *Trogoderma granarium Everts* (Coleoptera: Dermestidae) on different commodities, *Journal of Stored Products Research*, 69, 72-77.
- 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.
- 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.
- Banks, H. J., 1977, Distribution and establishment of *Trogoderma granarium Everts* (Coleoptera: Dermestidae): climatic and other influences, *Journal of Stored Products Research*, 13(4), 183-202.
- Barış, Tuna., ve Gösterit, A., 2017, Diyapoz öncesi beslemenin *Bombus terrestris* ana arılarının diyapoz sonrası koloni oluşturma başarısı üzerine etkisi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 12(1), 49-55.

- Beal Jr, R. S., 1982, A new stored product species of *Trogoderma* (Coleoptera: Dermestidae) from Bolivia., *The Coleopterists' Bulletin*, 211-215.
- Beato, M., and Klug, J., 2000, Steroid hormone receptors: an update, *Human reproduction update*, 6(3), 225-236.
- Bell, C. H., and Wilson, S. M., 1995, Phosphine tolerance and resistance in *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), *Journal of Stored Products Research*, 31(3), 199-205.
- Bradshaw, W. E., and Lounibos, L. P., 1977, Evolution of dormancy and its photoperiodic control in pitcher-plant mosquitoes, *Evolution*, 546-567.
- Buchner, J., Schmidt, M., Fuchs, M., Jaenicke, R., Rudolph, R., Schmid, F. X., and Kiefhaber, T., 1991, GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation, *Biochemistry*, 30(6), 1586-1591.
- Burges, H. D., 1959, Studies on the dermestid beetle *Trogoderma granarium* Everts: ecology in malt stores, *Annals of Applied Biology*, 47(3), 445-462.
- Burges, H. D., 1962, Studies on the Dermestid beetle *Trogoderma granarium* Everts. V. Reactions of diapause larvae to temperature, *Bulletin of Entomological Research*, 53(1), 193-213.
- Burges, H. D., 1963, Studies on the dermestid beetle *Trogoderma granarium* Everts. VI. Factors inducing diapause, *Bulletin of Entomological Research*, 54(3), 571-587.
- Burges, H. D., 2008, Development of the khapra beetle, *Trogoderma granarium*, in the lower part of its temperature range, *Journal of Stored Products Research*, 44(1), 32-35.
- Caspers, G. J., Leunissen, J. A., and De Jong, W. W., 1995, The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "α-crystallin domain", *Journal of molecular evolution*, 40(3), 238-248.
- Chen, B. and Wagner, A., 2012, Hsp90 is important for fecundity, longevity, and buffering of cryptic deleterious variation in wild fly populations, *BMC Evolutionary Biology* 12:25
- Cheng, M. Y., Hartl, F., Martin, J., Pollock, R. A., Kalousek, F., Neuper, W., ... and Horwich, A. L., 1989, Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria, *Nature*, 337(6208), 620-625.
- Cheng, J., Wang, C. Y., Lyu, Z. H., and Lin, T., 2018, Induced expression of three heat shock proteins mediated by thermal stress in *Heortia vitessoides* (Lepidoptera: Crambidae), *Entomological Research*, 48(5), 416-426.

- Colinet, H.; Lee, S.F., Hoffmann, A., 2009, Temporal Expression of Heat Shock Genes During Cold Stress and Recovery from Chill Coma in Adult *Drosophila melanogaster*, *FEBS Journal*, 277, 174–185.
- Colinet, H., and Hoffmann, A.A., 2012, Comparing phenotypic effects and molecular correlates of developmental, gradual and rapid cold acclimation responses in *Drosophila melanogaster*, *Functional Ecology*, 26:84–93
- Colinet, H., Lee, S.F., Hoffmann, A., 2010, Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*, *FEBS J.* 277:174–185
- Concha, C., Edman, R. M., Belikoff, E. J., Schiemann, A. H., Carey, B., and Scott, M. J., 2012, Organization and expression of the Australian sheep blowfly (*Lucilia cuprina*) hsp23, hsp24, hsp70 and hsp83 genes, *Insect molecular biology*, 21(2), 169-180.
- Coşkuncu, K., 2005, Depolanmış Ürünlerde Zararlı Böceklerle Mücadelede Feromon Tuzakların Kullanım Olanakları, *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 20(2), 92-97.
- Çolak, E. Ş., Canhilal, R., ve Yüksel, E., 2018, Depolanmış Ürün Zararlılarıyla Mücadelede Rezidüyel Pestisit Uygulamaları, *Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 1(1), 8-18.
- Çolak, E. Ş., Canhilal, R., ve Yüksel, E., 2018, Depolanmış Ürün Zararlılarıyla Mücadelede Rezidüyel Pestisit Uygulamaları, *Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 1(1), 8-18.
- Dağeri, A., Öğreten, A. ve Güz, N., 2022, Depo Zararlısı *Trogoderma granarium*'da Karşılaştırmalı Transkriptom Analizi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü.
- Denlinger, D. L., 1986, Dormancy in tropical insects, *Annual Review of Entomology*, 31(1), 239-264.
- Denlinger, D. L., Rinehart, J. P., and Yocum, G. D., 2001, Stress proteins: a role in insect diapause?, *Insect timing: circadian rhythmicity to seasonality*, 155-171.
- Dizlek, H., 2012, Tahılların Depolanmasında Etkili Olan Başlıca Etmenler, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(2) 48-59
- Dodanlı, A., ve Mutlu, Ç., 2020, Yerli Bazı Diatom Topraklarının Laboratuvar Koşullarında Khapra, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), Larvalarına Karşı Biyolojik Etkinliği, *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 6(1), 44-54.
- Doğanay, İ. Ş., ve Isıkber, A. A., 2020, Yerel Diatom Toprağının Farklı Tahıl Çeşitleri Üzerinde Buğday Biti'ne (*Sitophilus granarius* L.)(Coleoptera: Curculionidae) Karşı İnsektisidal Etkinliğ, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(4), 885-892.

- Donahaye, E. J., 2000, Current status of non-residual control methods against stored product pests, *Crop Protection*, 19(8-10), 571-576.
- Dörtok, A., ve Aksoy, A., 2018, Türkiye Buğday Sektörünün Eşanlı Model Yöntemiyle Tahmini, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 21(4), 580-586.
- Dyte, C. E., and Blackman, D. G., 1970, The spread of insecticide resistance in *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera, Tenebrionidae), *Journal of Stored Products Research*, 6(3), 255-261.
- Eliopoulos, P. A., 2013, New approaches for tackling the khapra beetle, *CABI Reviews*, (2013), 1-13.
- Erakay, S., 1974, Ege Bölgesi'nde un ve undan mamul maddelerde bulunan zararlı böcekler üzerinde araştırmalar, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü, İstiklal Matbaası, İzmir, 60.
- Ergül, C., Dörtbudak, N., ve Akülke, A., 1972. Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesindeki Hububat ve Mamulleri ile Bakliyat Anbar Zararlılarının Yayılışı ve Zararı Üzerinde Araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 12(2), 129-143.
- Evans, D. E., 1987, The survival of immature grain beetles at low temperature., *Journal of Stored Products Research*, 23(2), 79-83.
- Farahani, S., Bandani, A. R., Alizadeh, H., Goldansaz, S. H., and Whyard, S., 2020, Differential expression of heat shock proteins and antioxidant enzymes in response to temperature, starvation, and parasitism in the Carob moth larvae, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae), *PloS One*, 15(1), e0228104.
- Feder, M. E., and Hofmann, G. E., 1999, Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology, *Annual Review of Physiology*, 61(1), 243-282.
- Ferizli, A.G., Emekci, M., Tutuncu, S., and Navarro, S., 2004, The efficacy of phosphine fumigation against dried fruit pests in Turkey. *IOBC WPRS (OILB SROP) Integrated Protection of Stored Products*, 27(9),
- Ferizli, A. G., ve Emekci, M., 2013, Depolanmış Ürün Zararlılarının Kimyasal Ve Kimyasal Olmayan Yöntemlerle Savaşımı. 1. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi, 17, 20.
- Fields, P. G., 1992, The control of stored-product insects and mites with extreme temperatures, *Journal of Stored Products Research*, 28(2), 89-118.
- Fields, P. G., and White, N. D., 2002, Alternatives to methyl bromide treatments for stored-product and quarantine insects, *Annual Review of Entomology*, 47, 331.

- Finkelman, S., Navarro, S., Rindner, M., and Dias, R., 2006, Effect of low pressure on the survival of *Trogoderma granarium* Everts, *Lasioderma serricorne* (F.) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) at 30°C, *Journal of Stored Products Research*, 42(1), 23-30.
- Fliszkiewicz, M., and Wilkaniec, Z., 2007, Fatty acids and amino acids in the fat body of bumblebee *Bombus terrestris* (L.) in diapausing and non-diapausing queens, *Journal of Apicultural Science*, 51, 55-63.
- Fremdt H, Amendt J, and Zehner R., 2014, Diapause-specific gene expression in *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) a useful diagnostic tool for forensic entomology, *International Journal of Legal Medicine*, 128:1001–11.
- Gkouvitass T, Kontogiannatos D, Kourti A., 2008, Differential expression of two small Hsps during diapause in the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* (Lef.), *Journal of Insect Physiology*, 54:1503–10.
- Gkouvitass, T., Kontogiannatos, D., and Kourti, A., 2009, Expression of the Hsp83 gene in response to diapause and thermal stress in the moth *Sesamia nonagrioides*, *Insect molecular biology*, 18(6), 759-768.
- Goto, S. G., and Kimura, M. T., 2004, Heat-shock-responsive genes are not involved in the adult diapause of *Drosophila triauraria*, *Gene*, 326, 117-122.
- Goto, S. G., Yoshida, K. M., and Kimura, M. T., 1998, Accumulation of Hsp70 mRNA under environmental stresses in diapausing and nondiapausing adults of *Drosophila triauraria*, *Journal of Insect Physiology*, 44(10), 1009-1015.
- Gourgouta, M., Agrafioti, P., and Athanassiou, C. G., 2021, Insecticidal effect of phosphine for the control of different life stages of the khapra beetle, *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), *Crop Protection*, 140, 105409.
- Graham, R., 2006, <http://www.padil.gov.au/> [Ziyaret Tarihi: 10 Aralık 2022].
- Graveley, B. R., Brooks, A. N., Carlson, J. W., Duff, M. O., Landolin, J. M., Yang, L., ... and Celniker, S. E., 2011, The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*, *Nature*, 471(7339), 473-479.
- Gupta, R.S., 1995, Evolution of the chaperonin families (HSP60, HSP10 and TCP-1) of proteins and the origin of Eukaryotic cell., *Molecular Microbiology*, 15 (1): 1–11
- Guz, N., Dageri, A., Altincicek, B., ve Aksoy, S., 2021, Molecular characterization and expression patterns of heat shock proteins in *Spodoptera littoralis*, heat shock or immune response?. *Cell Stress and Chaperones*, 26(1), 29-40.
- Hadaway, A. B., 1956, The biology of the dermestid beetles, *Trogoderma granarium* Everts and *Trogoderma versicolor* (Creutz.), *Bulletin of Entomological Research*, 46(4), 781-796.

- Hafiz, A., Riaz, T., and Shakoori, F. R., 2018, Deltamethrin induced changes in the activities of various esterases in deltamethrin-resistant populations of *Trogoderma granarium*, *Pakistan Journal of Zoology*, 50(4).
- Hahn, D. A., and Denlinger, D. L., 2007, Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization, *Journal of Insect Physiology*, 53(8), 760-773.
- Hartl, F., Hayer-Hartl, M., 2002, Molecular chaperones in the cytosol from nascent chains to folded protein, *Science*, 295, 1852–1858.
- Hungary, 2011, <https://www.forestryimages.org/browse/orgthumb.cfm?aut=20778> [Ziyaret Tarihi: 10 Aralık 2022].
- Harris, D. L., 2006, Khapra Beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Insecta: Coleoptera: Dermestidae), EENY-372/IN667, 5/2006 *EDIS*, 2006(10).
- Helmbrecht, K., Zeise, E., and Rensing, L., 2000, Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review, *Cell proliferation*, 33(6), 341-365.
- Hendrick, J. P., and Hartl, F. U., 1993, Molecular chaperone functions of heat-shock proteins, *Annual Review of Biochemistry*, 62(1), 349-384.
- Hinkley, S. and Walker, K., 2005, Khapra beetle (*Trogoderma granarium*), PaDIL - <http://www.padil.gov.au> [Ziyaret Tarihi: 10 Aralık 2022].
- Hodek, I., 1996, Diapause development, diapause termination and the end of diapause, *European Journal of Entomology*, 93, 475-487.
- Hosseiniaveh, V., Bandani, A., Azmayeshfard, P., Hosseinkhani, S., and Kazzazi, M., 2007, Digestive proteolytic and amylolytic activities in *Trogoderma granarium* Everts (Dermestidae: Coleoptera), *Journal of Stored Products Research*, 43(4), 515-522.
- Huang, L. H., and Kang, L., 2007. Cloning and interspecific altered expression of heat shock protein genes in two leafminer species in response to thermal stress. *Insect Molecular Biology*, 16(4), 491-500.
- Jones, G. W., and Masison, D. C., 2003, *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 mutations affect [PSI⁺] prion propagation and cell growth differently and implicate Hsp40 and tetratricopeptide repeat cochaperones in impairment of [PSI⁺], *Genetics*, 163(2), 495-506.
- Iryani, M. T. M., MacRae, T. H., Panchakshari, S., Tan, J., Bossier, P., Wahid, M. E. A., and Sung, Y. Y., 2017, Knockdown of heat shock protein 70 (Hsp70) by RNAi reduces the tolerance of *Artemia franciscana* nauplii to heat and bacterial infection. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 487, 106-112.

- Irshad, Mohammad., and Iqbal, Javed., 1994. Phosphine resistance in important stored grain insect pests in Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 26, 347-347.
- Işıkber, A. A., Özdamar, H. Ü., ve Karcı, A., 2005. Kahramanmaraş ve Adıyaman illerinde depolanmış buğdaylar üzerinde rastlanan böcek türleri ve bulaşma oranları, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8(1), 107-113.
- Jood, S., Kapoor, A. C., and Singh, R., 1992. Mineral contents of cereal grains as affected by storage and insect infestation. *Journal of Stored Products Research*, 28(3), 147-151.
- Jood, S., Kapoor, A. C., and Singh, R., 1993. Evaluation of some plant products against *Trogoderma granarium Everts* in stored wheat and their effects on nutritional composition and organoleptic characteristics of treated grains. *International Journal of Pest Management*, 39(1), 93-98.
- Joplin, K. H., Yocum, G. D., and Denlinger, D. L., 1990, Cold shock elicits expression of heat shock proteins in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, *Journal of Insect Physiology*, 36(11), 825-834.
- Karadağ, E., ve Kayahan, A., 2021. Mikrodalga Radyasyonun Un biti, *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae)'a Etkisi. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 186-192.
- Karnavar, G. K., 1972. Mating behaviour and fecundity in *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Stored Products Research*, 8(1), 65-69.
- Kavallieratos, N. G., Athanassiou, C. G., Guedes, R. N., Drempele, J. D., and Boukouvala, M. C., 2017. Invader competition with local competitors: displacement or coexistence among the invasive khapra beetle, *Trogoderma granarium Everts* (Coleoptera: Dermestidae), and two other major stored-grain beetles? *Frontiers in plant science*, 8.
- Kayukawa, T., and Ishikawa, Y., 2009. Chaperonin contributes to cold hardiness of the onion maggot *Delia antiqua* through repression of depolymerization of actin at low temperatures. *PLOS ONE*, 4(12):e8277
- Keskin, Ş., ve Özkaya, H., 2013. Tahılların Depolanması Sırasında Böcek Üremesi ve Etkileri, *Akademik Gıda*, 11(3-4), 101-105.
- Kılıç, A., ve Mutlu, Ç., 2020. Biological activity of some native diatomaceous earth against Khapra, *Trogoderma granarium Everts* (Coleoptera: Dermestidae), larvae under laboratory conditions. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 6(1), 44-54.
- King, A. M., and MacRae, T. H., 2015, Insect heat shock proteins during stress and diapause, *Annual Review of Entomology*, 60, 59-75.

- Košťál, V., 2006, Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of insect physiology*, 52(2), 113-127.
- Koul, O., Walia S., and Dhaliwal G.S., 2008, Essential oils as green pesticides: potential and constraints, *Biopesticides International*, 4: 63-84.
- Kumar, M. K., Srivastava, C., and Garg, A. K., 2010, In vitro selection of deltamethrin resistant strain of *Trogoderma granarium* and its susceptibility to insecticides, *Annals of Plant Protection Sciences*, 18, 26-30.
- Huang, L. H., Wang, C. Z., and Kang, L., 2009, Cloning and expression of five heat shock protein genes in relation to cold hardening and development in the leafminer, *Liriomyza sativa*, *Journal of insect physiology*, 55(3), 279-285.
- Landry, J., Chrétien, P., Lambert, H., Hickey, E., and Weber, L. A., 1989, Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells, *The Journal of cell biology*, 109(1), 7-15.
- Lee, R. E., 1991, Principles of insect low temperature tolerance, *In Insects at low temperature*, (pp. 17-46). Springer, Boston, MA.
- Lees, A. D., 1956, The physiology and biochemistry of diapause, *Annual Review of Entomology*, 1(1), 1-16.
- Lindgren, D., Vincent, L., and Krohne, H., 1954, Khapra beetle in California: Eastern hemisphere insect destructive to stored grain, cereal products and foodstuffs established in state, *California Agriculture*, 8(9), 7-15.
- Lindgren, D., Vincent, L., and Krohne, H., 1955, The khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts, *Hilgardia*, 24(1), 1-36.
- Lindgren, D. L., and Vincent, L. E., 1959, Biology and control of *Trogoderma granarium* Everts. *Journal of Economic Entomology*, 52(2), 312-319.
- Lindquist, S., and Craig, E. A., 1988, The heat-shock proteins. Annual review of genetics, 22(1), 631-677.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method, *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lu, M. X., Cao, S. S., Du, Y. Z., Liu, Z. X., Liu, P., and Li, J., 2013, Diapause, signal and molecular characteristics of overwintering *Chilo suppressalis* (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Scientific reports*, 3(1), 1-9.
- Lu, M. X., Liu, Z. X., Cui, Y. D., and Du, Y. Z., 2014, Expression patterns of three heat shock proteins in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae), *Annals of the Entomological Society of America*, 107(3), 667-673.
- Lyupina, Y. V., Dmitrieva, S. B., Timokhova, A. V., Beljelarskaya, S. N., Zatsepina, O. G., Evgen'ev, M. B., and Mikhailov, V. S., 2010, An important role of the heat

- shock response in infected cells for replication of baculoviruses, *Virology*, 406(2), 336-341.
- MacRae, T. H., 2010, Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(14), 2405-2424.
- Mansour, M., 2016, Irradiation as a phytosanitary treatment against *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). *Florida Entomologist*, 138-142.
- Martin, J., Langer, T., Boteva, R., Schramel, A., Horwich, A. L., and Hartl, F., 1991, Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate, *Nature*, 352(6330), 36-42.
- Martínez-Paz, P., Morales, M., Martín, R., Martínez-Guitarte, J. L., and Morcillo, G., 2014, Characterization of the small heat shock protein *Hsp27* gene in *Chironomus riparius* (Diptera) and its expression profile in response to temperature changes and xenobiotic exposures, *Cell Stress and Chaperones*, 19(4), 529-540.
- Masaki, S., 1961, Geographic variation of diapause in insects, *Laboratory of Entomology*
- Mason, P. J., Hall, L. M. C., and Gausz, J., 1984, The expression of heat shock genes during normal development in *Drosophila melanogaster* (heat shock/abundant transcripts/developmental regulation), *Molecular and General Genetics MGG*, 194(1), 73-78.
- Matthews, G. A., 1993, Developments in the Application of Pesticides, 305-31. Modern Crop Protection: Developments and Perspectives (Ed. JC Zadoks). Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, 320.
- Miano, F. N., Jiang, T., Zhang, J., Zhang, W. N., Peng, Y., and Xiao, H. J., 2022, Identification and up-regulation of three small heat shock proteins in summer and winter diapause in response to temperature stress in *Pieris melete*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 1144-1154.
- Eddleston, M., Eyer, P., Worek, F., Juszczak, E., Alder, N., Mohamed, F., ... and Buckley, N. A., 2009, Pralidoxime in acute organophosphorus insecticide poisoning a randomised controlled trial, *PLoS Medicine*, 6(6), e1000104.
- Mohammadzadeh, M., and Izadi, H., 2018, Cooling rate and starvation affect supercooling point and cold tolerance of the Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts fourth instar larvae (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Thermal Biology*, 71, 24-31.
- Morrow, G., Battistini, S., Zhang, P., and Tanguay, R. M., 2004, Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in *Drosophila*, *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43382-43385.
- Mutlu, C., Öğreten, A., Cahit, Kaya., and Mamay, M., 2019, Influence of different grain storage types on Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts, 1898 (Coleoptera:

- Dermestidae), infestation in southeastern Anatolia (Turkey) and its resistance to malathion and deltamethrin. *Turkish Journal of Entomology*, 43(2), 131-142.
- Nair, K. S. S., and 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.
- Neal, S. J., Karunanithi, S., Best, A., So, A. K. C., Tanguay, R. M., Atwood, H. L., and Westwood, J. T., 2006, Thermoprotection of synaptic transmission in a *Drosophila* heat shock factor mutant is accompanied by increased expression of Hsp83 and DnaJ-1, *Physiological genomics*, 25(3), 493-501.
- Neumann, D., Emmermann, M., Thierfelder, J. M., Zur Nieden, U., Clericus, M., Braun, H. P., ... and Schmitz, U. K., 1993, HSP68 a DnaK-like heat-stress protein of plant mitochondria, *Planta*, 190(1), 32-43.
- Neupert, W., 1997, Protein import into mitochondria, *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), 863-917.
- Nollen, E. A., and Morimoto, R. I., 2002, Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing heat shock proteins, *Journal of cell science*, 115(14), 2809-2816.
- Nover, L., and Scharf, K. D., 1984, Synthesis, modification and structural binding of heat-shock proteins in tomato cell cultures, *European Journal of Biochemistry*, 139(2), 303-313.
- Ntalli, N., Skourti, A., Nika, E. P., Boukouvala, M. C., and Kavallieratos, N. G., 2021, Five natural compounds of botanical origin as wheat protectants against adults and larvae of *Tenebrio molitor* L. and *Trogoderma granarium* Everts. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(31), 42763-42775.
- Ostermann, J., Horwich, A. L., Neupert, W., & Hartl, F., 1989, Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis, *Nature*, 341(6238), 125-130.
- Paini D. R., and Yemshanov, D., 2012, Modelling the arrival of invasive organisms via the international marine shipping network: a khapra beetle study, *PLOS ONE*, 7(9), e44589.
- Palter, K. B., Watanabe, M., Stinson, L., Mahowald, A. P., and Craig, E. A., 1986, Expression and localization of *Drosophila melanogaster* hsp70 cognate proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 6, 1187– 1203.
- Richards, E. H., Dani, M. P., Lu, Y., Butt, T., and Weaver, R. J., 2017, Effect of stress on heat shock protein levels, immune response and survival to fungal infection of *Mamestra brassicae* larvae, *Journal of insect physiology*, 96, 53-63.
- Quan, G., Duan, J., Fick, W., Kyei-Poku, G., and Candau, J. N., 2018, Expression profiles of 14 small heat shock protein (sHSP) transcripts during larval diapause and under

- thermal stress in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (L.). *Cell Stress and Chaperones*, 23(6), 1247-1256.
- Pfaffl, M. W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pockley, A. G., 2003, Heat shock proteins as regulators of the immune response, *The lancet*, 362(9382), 469-476.
- Ragland, G. J., Armbruster, P. A., and Meuti, M. E. 2019, Evolutionary and functional genetics of insect diapause: a call for greater integration. *Current Opinion in Insect Science*, 36, 74-81.
- Rinehart J. P., Denlinger D., L., 2000, Heat-shock protein 90 is down-regulated during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but remains responsive to thermal stress, *Insect Molecular Biology*, 9:641-45
- Rinehart J. P., Robich R. M, and Denlinger D. L., 2010, Isolation of diapause-regulated genes from the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis* by suppressive subtractive hybridization, *Journal of Insect Physiology*, 56:603-609.
- Rinehart, J. P., Li, A., Yocum, G. D., Robich, R. M., Hayward, S. A., and Denlinger, D. L. 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11130-11137.
- Ritossa, F., 1962, A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*, *Experientia*, 18(12), 571-573.
- Ritossa, F., 1996, Discovery of the heat shock response, *Cell stress & chaperones*, 1(2), 97.
- Rosales, C., and Vonnice, S., 2017, Cellular and molecular mechanisms of insect immunity, *Insect Physiology and Ecology*, 179-212.
- Sang, W., Ma, W. H., Qiu, L., Zhu, Z. H., and Lei, C. L., 2012, The involvement of heat shock protein and cytochrome P450 genes in response to UV-A exposure in the beetle *Tribolium castaneum*, *Journal of Insect Physiology*, 58(6), 830-836.
- Sathyan, T., Murugesan, N., Elanchezhyan, K., Raj, A. S., and Ravi, G., 2016, Efficacy of Synthetic Insecticides against sucking insect pests in cotton, *Gossypium hirsutum* L., *International Journal of Entomological Research*, 1, 16-21.
- Saxena, J. D., and Sinha, S. R., 1995, Evaluation of some insecticides against malathion resistant strains of red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). *Indian Journal of Entomology*, 75, 401-405.
- Schlesinger, M. J., 1990), Heat shock proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 265(21), 12111-12114.

- Shen, Q., Zhao, L., Xie, G., Wei, P., Yang, M., Wang, S., Tang, B., , et al., 2015, Cloning three *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) heat shock protein 70 family genes: regulatory function related to heat and starvation stress. *Journal of Entomological Science*, 50(3), 168-185.
- Shivananjappa, S., Fields, P., Laird, R. A., and 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.
- Shivananjappa, S., Fields, P., Laird, R. A., and 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.
- Shu, Y., Du, Y., and Wang, J., 2011, Molecular characterization and expression patterns of *Spodoptera litura* heat shock protein 70/90, and their response to zinc stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158(1), 102-110.
- Stanley, K., and Fenton, B., 2000, A member of the *Hsp60* gene family from the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer.), *Insect Molecular Biology*, 9(2), 211-215.
- Storey, K. B., 1990, Biochemical adaptation for cold hardiness in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 326(1237), 635-654.
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N., and Loeschcke, V., 2003, The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*; 6, 1025–1037.
- Taipale, M., Jarosz, D. F., and Lindquist, S., 2010, HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(7), 515-528.
- T granarium*, (TROGGA) World distribution| EPPO Global Database., 2021, <https://gd.eppo.int/taxon/TROGGA/distribution> [Ziyaret Tarihi: 10 Aralık 2022].
- Tarakanov, I. A., Kurambaev, Y. K., Khusinov, A. A., and Safonov, V. A., 1994, Respiratory and circulatory disorders in experimental poisoning with an organophosphorus pesticide. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 117(5), 466-471.
- Theodoraki, M. A., and Mintzas, A. C., 2006, cDNA cloning, heat shock regulation and developmental expression of the hsp83 gene in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*, *Insect molecular biology*, 15(6), 839-852.
- Tungjitwitayakul, J., Tatun, N., Singtripop, T., and Sakurai, S., 2008, Characteristic expression of three heat shock-responsive genes during larval diapause in the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis*. *Zoological Science*, 25(3), 321-333.

- Tutar, L., and Tutar, Y., 2010, Heat shock proteins; an overview. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(2), 216-222.
- Walker, G. A., White, T. M., McColl, G., Jenkins, N. L., Babich, S., Candido, E. P. M., Johnson, T.E. and Lithgow, G. J., 2001, Heat shock protein accumulation is upregulated in a long-lived mutant of *Caenorhabditis elegans*, *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 56(7), B281-B287.
- Wang, H. S., Wang, X. H., Zhou, C. S., Huang, L. H., Zhang, S. F., Guo, W., and Kang, L., 2007, cDNA cloning of heat shock proteins and their expression in the two phases of the migratory locust, *Insect molecular biology*, 16(2), 207-219.
- Wang, X. R., Wang, C., Ban, F. X., Zhu, D. T., Liu, S. S., and Wang, X. W., 2019, Genome-wide identification and characterization of HSP gene superfamily in whitefly (*Bemisia tabaci*) and expression profiling analysis under temperature stress, *Insect Science*, 26(1), 44-57.
- Weibezahn, J., Schlieker, C., Tessarz, P., Mogk, A., and Bukau, B., 2005, Novel insights into the mechanism of chaperone-assisted protein disaggregation, *Biological Chemistry*, 386, 739-744
- Wilches, D. M., Laird, R. A., Floate, K. D., and Fields, P. G., 2019, Control of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) using high temperatures, *Journal of Economic Entomology*, 112(2), 963-968.
- Wilches, D. M., Laird, R. A., Floate, K. D., and Fields, P. G., 2016, A review of diapause and tolerance to extreme temperatures in dermestids (Coleoptera), *Journal of Stored Products Research*, 68, 50-62.
- Wilches, D. M., Laird, R. A., Floate, K. D., and Fields, P. G., 2017, Effects of acclimation and diapause on the cold tolerance of *Trogoderma granarium*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 165(2-3), 169-178.
- Will, T., Schmidtberg, H., Skaljac, M., and Vilcinskas, A., 2017, Heat shock protein 83 plays pleiotropic roles in embryogenesis, longevity, and fecundity of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*, *Development genes and evolution*, 227(1), 1-9.
- Wojciechowska, M., Stepnowski, P., and Gołębiowski, M., 2016, The use of insecticides to control insect pests. *Invertebrate Survival Journal*, 13(1), 210-220.
- Wolschin, F., Gadau, J., 2009, Deciphering proteomic signatures of early diapause in *Nasonia*, *PLOS ONE* 4(7):e6394
- Wu, T., and Tanguay, R. M., 2006, Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe?. *Cell Stress and Chaperones*, 11(1), 1.

- Xiao, H. and Lis, J.T., 1989, Heat shock and developmental regulation of the *Drosophila melanogaster* Hsp83 gene, *Molecular and Cellular Biology*, 9, 1746–1753
- Yi, J., Wu, H., Liu, J., Lai, X., Guo, J., Li, D., and Zhang, G., 2018, Molecular characterization and expression of six heat shock protein genes in relation to development and temperature in *Trichogramma chilonis*, *PLoS One*, 13(9), e0203904.
- Yocum, G. D., Joplin, K. H., and Denlinger, D. L., 1998, Upregulation of a 23 kDa small heat shock protein transcript during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(9), 677-682.
- Zettler, J. L., and Arthur, F. H., 2000, Chemical control of stored product insects with fumigants and residual treatments. *Crop Protection*, 19(8-10), 577-582.
- Zhang, G., Storey J. M, and Storey K. B., 2011, Chaperone proteins and winter survival by a freeze tolerant insect, *Journal of Insect Physiology*, 57:1115–22.
- Zhao, L. C., and Shi, L. G., 2010, Metabolism of hydrogen peroxide between diapause and non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx Mori* during chilling at 5° C, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 74(2), 127-134.
- Zhao, J., Huang, Q., Zhang, G., Zhu-Salzman, K., and Cheng, W., 2021, Characterization of two small heat shock protein genes (Hsp17. 4 and Hs20. 3) from *Sitodiplosis mosellana*, and their expression regulation during diapause. *Insects*, 12(2), 119.
- Zhao, L., and Jones, W. A., 2012, Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *Invertebrate Survival Journal*, 9(1), 93-101.