



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KAPRA BÖCEĞİ *Trogoderma granarium*
(COLEOPTERA: DERMATIDAE)'DA ÇİNKO
OKSİT NANOPARÇACIKLARININ İNSEKTİSİT
ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Hasan SİVRİKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Şubat-2023
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Hasan SİVRİKAYA tarafından hazırlanan “Kapa Böceği *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermastidae)’da Çinko Oksit nanoparçacıklarının insektisit etkinliğinin belirlenmesi” adlı tez çalışması 02/02/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Levent ÜNLÜ

.....

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ

.....

Üye

Prof. Dr. Levent ÜNLÜ

.....

Üye

Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim KALAYCI
FBE Müdürü

Bu tez çalışması NEÜ BAP tarafından 221315002 no’lu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Hasan SİVRİKAYA

02.02.2023

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KAPRA BÖCEĞİ *Trogoderma granarium* (COLEOPTERA: DERMESTIDAE)'DA ÇİNKO OKSİT NANOPARÇACIKLARININ İNSEKTİSİT ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Hasan SİVRİKAYA

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

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

2023, 63 Sayfa

Jüri

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

Kapra böceği *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) dünya çapında önemli bir depolanmış ürün zararlısıdır. Bu zararlı, tahıllarda oluşturduğu zararlar nedeniyle tarımsal ekonomiyi ve ülkeler arası ticareti olumsuz etkilemektedir. Son yıllarda kapra ile mücadelede uygulanan yöntemlerin birçoğu kimyasal pestisit içermesi sebebiyle doğaya ve insan sağlığına zararlıdır. Nanoteknoloji, çeşitli bilimsel alanlara yenilik getirebilecek bir alandır. Yeşil sentez yöntemi ile nanoparçacık (NP) sentezi, özellikle bitkilerin kullanıldığı çevre dostu yeni bir yöntemdir. Sahip olduğu insektisit özelliği nedeni ile sap kereviz (*Apium graveolens* L. var. *dulce*) bitkisinin birçok zararlı böcek ile mücadeledeki etkinliği araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında, insan sağlığı ve çevre için düşük toksisiteye sahip Çinko Oksit (ZnO) NP'lerinin kapra böceğine karşı potansiyel bir mücadele aracı olarak kullanılması amaçlanmıştır. ZnO NP'lerin sentezi herhangi bir toksik çözücü ya da kimyasal indirgeme reaktifi kullanmadan, kereviz bitkisinin ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen ZnO NP'lerin karakterizasyonu Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM), UV-Vis Spektrofotometresi (UV-Vis), X-ışını Kırınım Difraktometresi (XRD), Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometresi (FTIR) ve Zeta Potansiyeli Analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen ZnO NP'lerin kapra larvaları ve erginleri üzerindeki etkileri besleme deneyleri sonucunda incelenmiştir. Erginlerde, LC₅₀ değeri 500 ppm derişim uygulamasını takiben 48. saat sonunda, LC₉₀ değeri ise 96. saat sonunda tespit edilmiştir. ZnO NP'lerin Katalaz (*TgCAT*), Isı Şok Proteini 60 (*TgHSP60*) ve Isı Şok Proteini 68 (*TgHSP68*) genleri üzerindeki etkisi, larva ve erginlerde Kantitatif Eş Zamanlı PCR (RT-qPCR) kullanılarak moleküler düzeyde incelenmiştir. Kapra larvalarında, ZnO NP maruziyetine bağlı olarak en yüksek *TgCAT*, *TgHSP60* ve *TgHSP68* ifadesi, 12. saat uygulamasından sonra görülmüştür. Kapra erginlerinde ise, üç gen için en yüksek ifade miktarı sırası ile 144, 96 ve 72. saatleri takiben tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, ZnO NP'lerin kapra böceğinin kontrolünde insektisidal bir ajan olarak kullanılabileceği önerilebilir. Ayrıca, araştırılan *TgCAT*, *TgHSP60* ve *TgHSP68* genlerinin ZnO NP'lerin meydana getirdiği oksidatif strese yanıt geliştirebilen potansiyel biyomarker olma özellikleri vardır.

Anahtar Kelimeler: *Apium graveolens* L. var. *dulce*, Çinko Oksit nanoparçacıkları, Kapra böceği, Nanopestisit, Yeşil Sentez

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF INSECTICIDAL ACTIVITY OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES IN KHAPRA BEETLE *Trogoderma granarium*

Hasan SİVRİKAYA

Necmettin Erbakan University
Institute of Science and Technology
Department of Molecular Biology and Genetics

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

2023, 63 Pages

Jury
Assist. Prof. Dr. Aşlı DAĞERİ
Prof. Dr. Levent ÜNLÜ
Assoc. Prof. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

Khapra beetle *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) is a major stored product pest worldwide. This pest negatively impacts the agricultural economy and inter-country trade due to the damages it causes on grains. Many of the methods used to control khapra beetle in recent years are harmful to nature and human health, because they contain chemical pesticides. Nanotechnology is an area that can bring innovation to various scientific fields. The synthesis of nanoparticles (NP) with the green synthesis method is a new environmentally friendly method, especially in which plants are used. Due to its insecticidal properties, the effectiveness of celery (*Apium graveolens* L. var. *dulce*) in controlling many harmful insects has been investigated. In this thesis, it was aimed to use Zinc Oxide (ZnO) NPs, which have low toxicity effect on human health and the environment, as a potential control tool against khapra beetle. The synthesis of ZnO NPs was carried out using celery plant extract without using any toxic solvents or chemical reducing agent. Characterization of synthesized ZnO NPs was performed with Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM), UV-Vis Spectrophotometry (UV-Vis), X-Ray Diffraction (XRD), Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), and Zeta Potential Analyses. The effects of synthesized ZnO NPs on khapra larvae and adults were investigated through feeding experiments. In adults, the LC₅₀ and LC₉₀ values were determined at the end of the 48th and 96th hour following the application of 500 ppm concentration, respectively. The effect of ZnO NPs on Catalase (*TgCAT*), Heat Shock Protein 60 (*TgHSP60*), and Heat Shock Protein 68 (*TgHSP68*) genes was investigated at the molecular level using Quantitative Real Time PCR (RT-qPCR) in larvae and adults. In larvae, the highest expression of *TgCAT*, *TgHSP60*, and *TgHSP68* was detected after 12 hours of ZnO NP exposure. In adults, the highest expression for three genes was observed after 144, 96, and 72 hours, respectively. According to the results of this study, it can be suggested that ZnO NPs can be used as an insecticidal agent in the control of khapra beetle. In addition, the investigated *TgCAT*, *TgHSP60*, and *TgHSP68* genes have potential biomarker feature that can respond to oxidative stress caused by ZnO NPs.

Keywords: *Apium graveolens* L. var. *dulce*, Green synthesise, Khapra beetle, Nanopesticide, Zinc Oxide Nanoparticles

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca her türlü bilimsel katkı, tecrübe ve desteğini esirgemeyen, saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ'ye, emeklerinden dolayı minnet ve saygılarımı sunarım.

İkinci danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN'a, değerli bilimsel katkı ve emeklerinden dolayı saygılarımla teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının projesini destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BAP Proje No: 221315002) ve tez deney ve analizlerinin büyük bir kısmının gerçekleştiği Necmettin Erbakan Üniversitesi BİTAM (Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi)'a teşekkür ederim. Deney ve analizlerimde gereken yardımı ve desteği esirgemeyen Öğr. Gör. Fuat ASLAN'a teşekkür ederim.

Süreç boyunca yanımda olan değerli arkadaşım Mohammed Lengichow KADİR başta olmak üzere katkıda bulunan, desteklerini sunan, emeği geçen ve hayatımda olan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ve hayatım boyunca desteklerini daima hissettiğim, bu süreçte de yanımda olan kıymetli aileme minnetle teşekkür ederim.

Hasan SİVRİKAYA
KONYA-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Kapra Böceği <i>Trogoderma granarium</i>	4
2.1.1. Kapra böceğinin zararı	4
2.1.2. Kapra böceğinin biyolojisi ve yaşam döngüsü	5
2.1.3. Kapra böceği diyapozu	7
2.2. Nanoteknoloji.....	8
2.2.1. Nanoparçacıklar	9
2.2.2. Nanoparçacıkların sınıflandırılması	10
2.2.3. Nanoparçacıkların sentezi	11
2.2.4. Nanopestisitler	12
2.3. Yeşil Sentez.....	15
2.4. Nanoparçacıkların Karakterizasyonu.....	16
2.5. Kereviz Bitkisi (<i>Apium graveolens</i> L. var. <i>dulce</i>)	16
2.6. ZnO NP'ler	18
2.6.1. Yeşil sentez yolu ile elde edilen ZnO NP'ler	18
2.7. Katalaz	20
2.8. Isı Şok Proteinleri	21
2.8.1. HSP60	21
2.8.2. HSP68	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. ZnO NP'lerin Sentezi ve Karakterizasyonu	24
3.1.1. Kereviz bitkisinin yaprağından ekstrakt hazırlanması	24
3.1.2. ZnO NP'lerin yeşil sentezi	24
3.1.3. ZnO NP'lerin karakterizasyonu	26
3.1.4. <i>Trogoderma granarium</i> 'un yetiştirilmesi.....	27
3.1.5. ZnO NP ile besleme biyoassayı	28
3.2. Yeşil Sentezlenmiş ZnO NP'lerin <i>Trogoderma granarium</i> Üzerindeki Etkisinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi.....	28
3.2.1. RNA izolasyonu.....	29

3.2.2. cDNA sentezi.....	29
3.2.3. cDNA kütüphanelerinden detoksifikasyon enzim genleri için primer tasarlanması.....	30
3.2.4. Kantitatif eş zamanlı PCR (RT - qPCR)	30
3.2.5. İstatistiksel hesaplamalar.....	31
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	32
4.1. ZnO NP'lerin Sentezi.....	32
4.2. ZnO NP'lerin Sentezinde Yapılan Optimizasyonlar	34
4.3. ZnO NP'lerin Karakterizasyon Çalışmaları	36
4.3.1. ZnO NP'lerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile boyut ve şekil analizi.....	37
4.3.2. ZnO NP'lerin Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) analizi	38
4.3.3. ZnO NP'lerin Infrared Spektrometresi (FTIR) ile yapısal analizi	38
4.3.4. ZnO NP'lerin X-ışını Difraksiyonu (XRD) analizi	41
4.3.5. ZnO NP'lerin Zeta Potansiyel analizi	42
4.4. Kapra Böceğinin ZnO NP ile Besleme Biyoassayı.....	43
4.5. Yeşil Sentezlenmiş ZnO NP Muamelesi Sonrası <i>TgCAT</i> , <i>TgHSP60</i> ve <i>TgHSP68</i> Genlerinin İfade Seviyesi Analizi	45
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	50
5.1 Sonuçlar	50
5.2 Öneriler	50
6. KAYNAKLAR.....	51
7. ÖZGEÇMİŞ.....	Error! Bookmark not defined.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. Kapra böceği ergini (Pest and Diseases Image Library, Bugwood.org).....	4
Şekil 2. 2. Kapra böceği larvası (https://agric.wa.gov.au/n/1099).	5
Şekil 2. 3. Kapra böceği yumurtaları.....	6
Şekil 2. 4. Kapra böceği yaşam döngüsü.....	7
Şekil 2. 5. Nanoteknoloji ve diğer bilimler.....	9
Şekil 2. 6. NP sentez yöntemleri.	12
Şekil 2. 7. <i>Apium graveolens</i> L. var. <i>dulce</i> yaprağı (https://www.healthbenefitstimes.com/celery).	17
Şekil 2. 8. Katalaz aracılığıyla H ₂ O ₂ 'in su ve oksijene detoksifikasyonu.	21
Şekil 3. 1. Kereviz yapraklarından ekstrakt eldesi.	24
Şekil 3. 2. Yeşil NP Sentezi.	25
Şekil 3. 3. ZnO NP sentez basamakları.	25
Şekil 3. 4. Kapra böceklerinin yetiştirildiği kültür ortamı.....	27
Şekil 3. 5. Besleme deneylerinin gerçekleştirildiği petriler.....	28
Şekil 4. 1. ZnO NP'lerin sentez öncesi (sol), sentez sonrası (sağ) renk değişimleri.	32
Şekil 4.2. Kalsinasyon işleminden sonra elde edilen ZnO NP'ler.	33
Şekil 4. 3. ZnO NP'lerin (mavi) ve <i>Apium graveolens</i> L. var. <i>dulce</i> ekstraktının (turuncu) UV - Vis absorpsiyon spektrumları.	33
Şekil 4. 4. Farklı Zn ²⁺ derişimlerinde sentezlenen ZnO NP'lerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları.	34
Şekil 4. 5. Farklı reaksiyon sürelerinde sentezlenen ZnO NP'lerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları.	35
Şekil 4. 6. Farklı pH'de sentezlenen ZnO NP'lerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları.	36
Şekil 4. 7. Yeşil ZnO NP'lerin TEM görüntüleri.....	37
Şekil 4. 8. ZnO NP'lerin EDX Analizi.....	38
Şekil 4. 9. <i>Apium graveolens</i> L. var. <i>dulce</i> ekstraktı (kırmızı) ve ZnO NP'ye (yeşil) ait FTIR spektrumları.	39
Şekil 4. 10. ZnO NP örneğinin XRD spektrumu.	41
Şekil 4. 11. ZnO NP örneğinin XRD spektrumuna ait piklerin 2θ açıları ve hkl indeskleri. ...	41
Şekil 4. 12. ZnO NP'lerin Zeta Potansiyel Analizi.	42
Şekil 4. 13. Ergin kapra böceğinin yeşil ZnO NP'ler ile beslenmesi sonrası ölüm oranı.....	43
Şekil 4. 14. Yeşil ZnO NP muamelesi sonucu <i>TgCAT</i> geninin ifade seviyeleri.....	46
Şekil 4. 15. Yeşil ZnO NP muamelesi sonucu <i>TgHsp60</i> geninin ifade seviyeleri.....	48
Şekil 4. 16. Yeşil ZnO NP muamelesi sonucu <i>TgHsp68</i> geninin ifade seviyeleri.....	48

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2. 1. Zararlı böceklerle mücadele amacıyla farklı NP uygulamaları.	13
Çizelge 2. 2. HSP'lerin sınıflandırılması ve fonksiyonları.	22
Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılması için tasarlanan primerler.	30
Çizelge 3. 2. RT- qPCR çalışmalarında kullanılan bileşenler.	31
Çizelge 4. 1. FTIR spektrumunda gözlenen bantların dalga sayıları ve karşılık geldiği fonksiyonel gruplar.	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C : Santigrat derece
μ : Mikro

Kısaltmalar

μl	: Mikrolitre
$2^{-\Delta\Delta C_t}$	: Bağlı Nicel Yöntem
ANOVA	: Analysis of Variance (Tek Yönlü Varyans Analizi)
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDX	: Energy Dispersive X-Ray Analysis (Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi)
EPPO	: Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü
FESEM	: Field Emission Scanning Electron Microscopy (Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu)
FTIR	: Fourier Transform Infrared (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi)
g	: Gram
IDT	: Integrated DNA Technologies (Entegre DNA Teknolojileri)
IPM	: Integrated Pest Management (Entegre Zararlı Yönetimi)
kDa	: Kilodalton
LC ₅₀	: Lethal Concentration %50 (Öldürücü Konsantrasyon %50)
LC ₉₀	: Lethal Concentration %90 (Öldürücü Konsantrasyon %90)
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NP	: Nanoparçacık
pH	: Potansiyel Hidrojen Değeri
ppm	: Milyonda Bir
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RT – qPCR	: Kantitatif Eş Zamanlı PCR
s	: Saniye
<i>TgCAT</i>	: <i>Trogoderma granarium</i> Katalaz geni
<i>TgHsp60</i>	: <i>Trogoderma granarium</i> Hsp60 geni
<i>TgHsp68</i>	: <i>Trogoderma granarium</i> Hsp68 geni
UV-Vis	: Ultraviole/Visible
XRD	: X-Ray Diffraction (X-Ray Kırınım Spektroskopisi)

1. GİRİŞ

Dünya çapındaki nüfus artışı, insanların besinsel ihtiyaçlarını karşılayabilecek kaliteli gıdaya erişimi giderek zorlaştırmaktadır. Tarımsal zararlılarla mücadele, gıda arzının sürdürülebilirliğini sağlamada en önemli şartlar arasında bulunmaktadır. Kapra böceği, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) dünyada en önemli depolanmış ürün zararlıları arasında yer almaktadır. Kapra böceğinin depolanabilir tahıllara verdiği zarar, gelişmekte olan ülkelerde %30 civarındayken, gelişmiş ülkelerde bu oran yaklaşık %9'dur (Phillips ve Throne, 2010). Yüzlerce farklı türde depolanmış ürün zararlısı böcek vardır, ancak bunlardan 18 tanesi depolanmış ürünlere verdikleri zararlar bakımından oldukça önemlidir (Boyer ve ark., 2012). Kapra böceği depolarda bulunan, başta buğday, pirinç ve arpa olmak üzere, çeşitli mahsullerin içerisinde kolaylıkla yaşayıp çoğalabilmektedir. Kapra böceği, özellikle açlık ve düşük sıcaklık gibi koşullara dayanıklı yapısı yüzünden EPPO (Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü) tarafından dünyanın en yaygın 100 salgın böcek türü arasında kabul görmektedir (EPPO, 2021). Böylelikle, kapra böceği uluslararası yapılan ticaretlerde, en başta gelen karantina zararlıları arasında sayılmaktadır (Athanassiou ve ark., 2019).

Ergin kapra böceği ve larvaları tahıllarla beslenir ve tahılın besin değerini azaltabilen mekanik bir hasara neden olur (Shivananjappa ve ark., 2020). Gluten buğday, arpa ve diğer tahıllarda bulunan önemli bir proteindir. Kapra böceği buğdayla beslendiğinde gluten proteinlerine zarar vermekte ve dane hacminde azalmaya ve üretilen besinlerde kalite kaybına neden olmaktadır (Ahmedani ve ark., 2009). Kapra böceği uzun süre yiyecek olmadan hayatta kalma yeteneğine de sahiptir; bu da zararlının depolarda tespitinden evvel, yayılmasına olanak tanımaktadır. Ayrıca, çok düşük nem seviyelerinde de hayatta kalabilir; bu nedenle un ve baharatlar gibi kuru gıdalarla da beslenerek yaşamını sürdürebilmektedir. Bu durum da, kapra zararlısının kontrol edilmesini zorlaştırır ve depolamada önemli miktarda tahıl kaybına ve son ürünlerin kalitesinde düşüşe yol açabilir (Özberk ve ark., 2018). Kapra ile mücadelede geçmişten bu yana kullanılan başlıca yöntemlerden birisi kimyasal ilaçlarla mücadeledir (Nayak ve ark., 2020). Ancak, böcekler bu kimyasallara karşı direnç kazandıkça, yeni alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Debnath ve ark., 2012).

Son yıllarda, zararlı böcekler ile mücadelede kimyasal ilaçlar gibi insan sağlığını ve çevreyi tehdit eden araçlara bir alternatif olarak nanoteknoloji aracılığı ile çeşitli ürünlerin

geliştirilmesi ve kullanılması söz konusu olmuştur (Al-Esawy ve ark., 2021). Bu alan yolu ile üretilen nanoparçacıkların (NP) zararlı böcekler ile mücadelede insektisit olarak kullanılabilmesi, böceklerde ilaçlara karşı gelişen direnç çözümü olma potansiyelinin yanı sıra, çevreye ve insan sağlığına tehdit oluşturmaması yönü ile de bilinmektedir (Jasrotia ve ark., 2022; Alavi ve ark., 2019). Örneğin, belirli böcekleri hedef alacak şekilde NP'ler tasarlanabilmekte ve diğer organizmalara zarar verebilecek kimyasal içerikli pestisitlere olan ihtiyacı azaltılabilmektedir (Rai ve Ingle, 2012). Diğer taraftan, NP'ler pestisit uygulamalarında daha verimli ve hassas dağıtım sistemleri oluşturmak için kullanılabilir. Bu alandaki araştırma ve geliştirme, gelecek için sürdürülebilir ve üretken bir gıda arzı sağlamak için oldukça önem taşır (Chaud ve ark., 2021).

NP'lerin hazırlanması için genel olarak kullanılan iki strateji vardır; yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya sentez yöntemleri. Yukarıdan aşağıya yöntem, büyük boyutlu malzemeleri, nano ölçekli daha küçük parçacıklara ayırma temeline dayanır. Bunu amaçlamanın sebebi, bazı metal elementlerinin, küçük formlarına indirgendiğinde yeni özellikler kazanmasıdır (Alavi ve ark., 2019). Örneğin, Çinko (Zn) metal öncül bileşikler, Çinko Oksit NP'lerine (ZnO NP) indirgendiğinde biyosensörlerde, kozmetikte, ilaç dağıtım sistemleri gibi alanlarda kullanımlarının yanı sıra, olağanüstü optik, fiziksel ve antimikrobiyal özelliklere sahip olmaktadır (Sabir ve ark., 2014). Ancak, indirgenen küçük metal NP'lerin yüzey yapılarını pürüzsüz hale getirmek zordur. Aşağıdan-yukarıya sentez yöntemi ise, atomların önce bir çekirdekte toplandığı ve sonunda çekirdek büyümesini gerçekleştirerek kendi kendine bir araya geldiği süreci ifade eder (Abid ve ark., 2021). En yaygın kullanılan hazırlama stratejisi olarak, aşağıdan yukarıya stratejilerle elde edilen ürünler genellikle homojen kimyasal NP bileşimlerine sahiptir. Kimyasal yöntemlerle üretilen NP'ler boyut olarak homojendir; ancak sentez sırasında kullanılan toksik kimyasal reaktifler genellikle NP yüzeyinde kalır ve bu da bazı uygulamalarda toksisiteden dolayı kullanımı sınırlar (Li ve ark., 2020).

Yeşil sentezde ise, tamamen çevre dostu yaklaşımdan yararlanılmaktadır. NP'lerin yeşil sentezinde bakteriler, mantarlar ve mayalar dâhil olmak üzere birçok biyolojik mekanizma kullanılabilir (Alagumuthu ve Kirubha, 2012). Bu yöntemle NP'ler en fazla bitkilerin yapraklarından, çiçeklerinden, köklerinden, gövdelerinden ve kabuklarından elde edilen ekstraktlar kullanılarak hazırlanabilir. Bunun sebebi, bitkilerde indirgeyici, stabilize edici ve kaplayıcı ajanlar olarak işlev görebilen fitokimyasalların bulunmasıdır. Bu fitokimyasallar arasında terpenoidler, flavonoidler, fenolik bileşikler, saponinler, alkaloidler,

tanenler, karbonhidratlar vb. yer almaktadır. Bitki aracılı yeşil sentez, çevreye zararlı olmayan, biyouyumlu, düşük maliyetli bir yöntemdir (Mutukwa ve ark., 2022).

Bu tez çalışmasında kereviz *Apium graveolens* L. var. *dulce* bitkisinin biyoindirgeyici ve kaplayıcı özelliği kullanılarak, yeşil yolla sentezlenen ZnO NP'lerin depolanmış ürün zararlısı olan kapra böceğine karşı mücadelede, geleneksel insektisitlere alternatif olma potansiyeli biyoassay yöntemi aracılığı ile araştırılmıştır. Yeşil yolla sentezlenen ZnO NP'lerin potansiyel insektisit etkinliği, *T. granarium*'a ait *Katalaz (TgCAT)*, *Isı Şok Proteini (Heat Shock Protein) 60 (HSP60)* ve *68 (HSP68)* genlerinin ifade seviyeleri üzerinde, Kantitatif Eş Zamanlı (RT – qPCR) kullanılarak moleküler düzeyde incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1.Kapra Böceği *Trogoderma granarium*

2.1.1. Kapra böceğinin zararı

Kapra böceği, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) dünya çapında en önemli depolanmış ürün zararlılarından (Şekil 2.1). Depolarda muhafaza edilen, başta buğday ve arpa olmak üzere, tahılların içerisinde kolayca yaşayıp çoğalabilmektedir. Bu canlı; açlık, düşük sıcaklık, kalabalık gibi olumsuz koşullarda, diyapoza girmesi nedeni ile dünyanın en yaygın 100 salgın böcek türü arasında sayılmaktadır (EPPO, 2021; Dageri ve ark., 2023). Kapra böceğinin verdiği zararın, olumsuz çevre koşullarında diyapoza girebilme ve çoğalabilme yeteneğinden dolayı, diğer depo ürünü zararlılarına göre nispeten daha fazla olduğu bildirilmiştir (Athanassiou ve ark., 2019).



Şekil 2. 1. Kapra böceği ergini (Pest and Diseases Image Library, Bugwood.org).

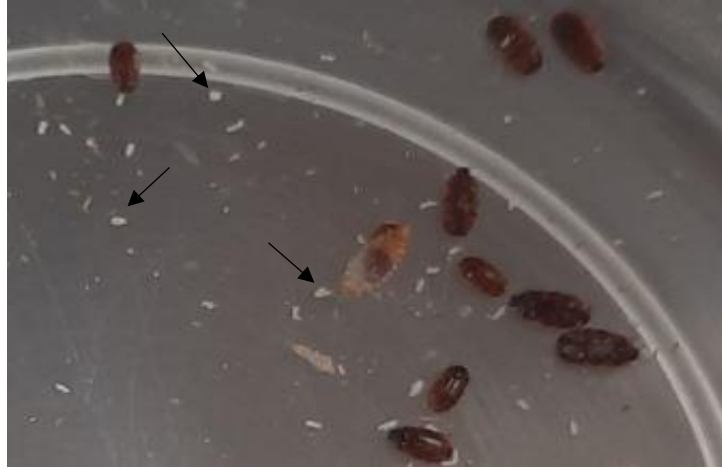
Buğday ve diğer tahıllar, depo zararlılarının istilası nedeniyle her yıl tüm dünyada nicelik ve nitelik bakımından muazzam kayıplara maruz kalmaktadır. Kapra böceğinin larvalarının (Şekil 2.2) tahılların üzerine bıraktığı doku parçaları, hem insan sağlığını tehdit etmekte, hem de ürün kalitesini düşürerek üretici ülkeleri büyük maddi zararlara uğratmaktadır. Yapılan bir çalışmada depolanmış buğday üzerinde kapra böceği istilasının neden olduğu niceliksel ve fiziksel kayıplar araştırılmıştır. Küçük bir popülasyona sahip kapra böceği ile başlatılan deneyde, altıncı ayın sonunda, depolanmış buğday üzerinde başlangıçta belirlenen tohum ağırlıklarına kıyasla %20 azalma olduğu görülmüştür (Ahmedani ve ark., 2011).



Şekil 2. 2. Kara böceği larvası (<https://agric.wa.gov.au/n/1099>).

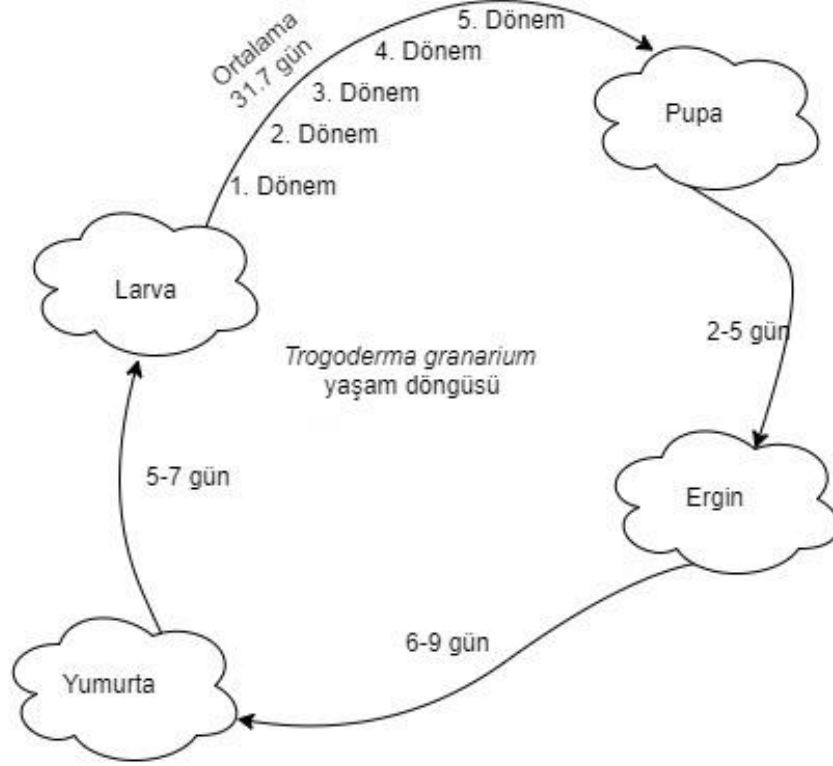
2.1.2. Kara böceğinin biyolojisi ve yaşam döngüsü

33 °C - 35 °C gibi sıcaklıklarda en yüksek verimle yaşayabilen ve çoğalabilen bu canlı, gıda ve çevre koşullarına bağlı olarak senede ortalama on kez yeni nesil oluşturabilme kapasitesine sahiptir (Athanassiou ve ark., 2019). Yumurtadan ergine gelişimsel dönemlerinin tamamlanması, 45 - 50 gün arasında gerçekleşmektedir (Wakil ve ark., 2021; Gupta ve Kataria 2014). Larvalar sıcaklığa bağlı olarak, ergin döneme kadar dört ila beş evreden geçebilir; 35 °C sıcaklıkta 15 gün gibi kısa bir sürede larval gelişimlerini tamamlayabilirler. Bir çalışmada, *T. granarium*'un 35 °C'deki popülasyon artışının, diğer depolanmış ürün zararlılarına göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (Kavallieratos ve ark., 2017; Gupta ve Kataria, 2014). Ortam sıcaklığı 20 °C'nin altına düştüğünde ise, yumurta bırakma gerçekleşmemektedir. 27 °C ile 35 °C arasındaki sıcaklıklarda yumurta bırakma oranı çok değişmese de, nem oranı arttıkça, yumurta bırakma oranı azalmaktadır (Falah ve Azher, 2020; Yadav ve Srivastava, 2017). Bu nedenle, yüksek sıcaklıklar ile birlikte düşük bağıl nem, bu türün hızlı gelişimi ve oluşumu için en önemli koşullardandır. Bu canlı, diğer depolanmış ürün zararlılarına kıyasla, çok yüksek ve çok düşük sıcaklıklara yüksek oranda toleranslıdır (Rizwan ve ark., 2018).



Şekil 2. 3. Kupra böceği yumurtaları.

Kupra böceğinin erginleri pupadan çıktıktan sonra, erkekler ve dişiler arasında bir çiftleşme gerçekleşir. Çiftleşmeden 4 - 5 gün sonra yumurtalar dişi tarafından buğday tanelerinde bulunan yarıklara bırakılmaya başlanır (Şekil 2.3). 5 - 7 gün sonra larvalar yumurtalardan çıkar. Larvalar değişebilen sıcaklık ve yaşam koşullarına bağlı olarak, 30 - 50 gün kadar sürebilen gelişimsel dönemlerden geçerek pupaya girmektedirler (Şekil 2.4). Fakat, son dönem larvaları, henüz tam olarak aydınlatılmamış bir diyapoz mekanizması nedeni ile kontrol edilmesi en zor olan dönem olarak tanımlanmaktadır (Wakil ve ark., 2021; Wilches ve ark., 2016).



Şekil 2. 4. Kapra böceği yaşam döngüsü.

Larva dönemini takiben pupa evresinde yaklaşık olarak 6 gün geçiren canlı, bu sürenin sonunda pupadan çıkarak ergin dişi ve erkek böceklerle dönüşmektedir. Dişilerin pupadan çıkma süreleri erkekler göre genellikle daha uzundur ve sıcaklık arttıkça pupa döneminde geçen süre azalmaktadır (Yadav ve Srivastava, 2017). Ergin dişi ve ergin erkek böceklerin ise, ortalama 7 - 15 gün arasında değişkenlik gösteren kısa bir yaşam süreleri vardır ve bu yaşam sürelerini tamamlamadan önce çiftleşip nesillerini devam ettirirler. Ancak, ergin kapra böceklerinin yaşam süreleri çiftleşmiş olma durumlarına göre değişiklik göstermektedir. Çiftleşmiş dişiler 5 - 11 gün arasında yaşayabilirken, çiftleşmemiş dişilerin 12 - 28 güne kadar yaşayabildiği, çiftleşmemiş erkekler 15 - 17 gün yaşarken, çiftleşmiş erkeklerin ise 3 - 13 gün süre ile yaşadığı belirtilmiştir (Yadav ve Srivastava, 2017).

2.1.3. Kapra böceği diyapozu

Böceklerde diyapoz, sıcaklık veya nem oranı gibi çevresel değişikliklere yanıt olarak ortaya çıkan, gelişimsel bir duraklama dönemidir (Saunders ve ark., 2020). Obligat (zorunlu) diyapoz ve fakültatif (zorunlu olmayan) diyapoz olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Tougeron

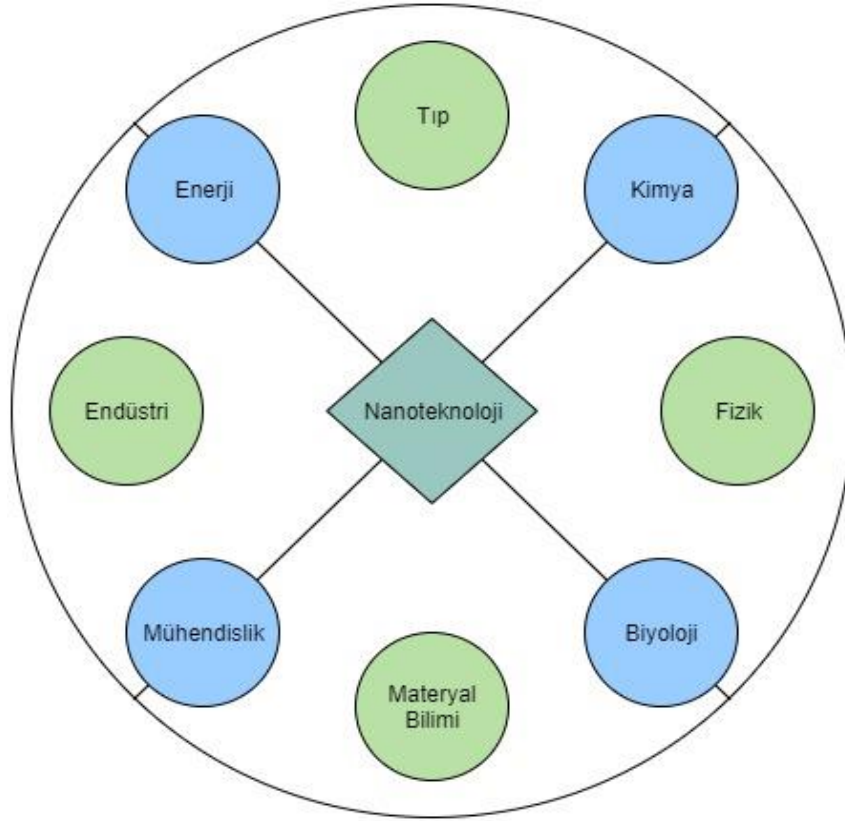
ve ark., 2019; Schebeck ve ark., 2022). Obligat diyapozu olan türler, çevre koşullarından bağımsız olarak yaşam döngüsünün aynı evresinde gelişimini durdururken, fakültatif diyapozu olan türler ise, çevresel koşullara yanıt olarak, diyapoza girip girmeyeceğini belirler. Birçok böcekte diyapoz, gelişimin tamamen durmasını gerektirmez. Diyapoz dinamik bir süreçtir; gaz alışverişi, metabolizma, stres direnci ve belirli genlerin ifadesinde artış gibi faaliyetlerin, diyapoz döneminde görüldüğü kanıtlanmıştır (Hodek, 2013; Košťál, 2006; Hahn ve Denlinger, 2007). Obligat diyapoz, türün devamı için zorunludur. Her iki diyapoz türü de sıcaklık, fotoperiyot veya besin mevcudiyeti gibi çeşitli çevresel koşullar tarafından tetiklenebilir. Ayrıca, diyapoz süresi başta diyapozun çeşidi olmak üzere, böcek türüne ve çevre koşullarına bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. Genel olarak diyapoz, böcekler için önemli bir hayatta kalma stratejisidir ve böceklerin çevresel dalgalanmalarla başa çıkmalarına izin verir (Lindgren ve ark., 1959; Stanic ve ark., 1963).

Son dönem kapra böceği larvası besin, sıcaklık, kalabalık, fekal kalıntılar vb. kaynaklı uygun olmayan şartlarda, kendisini diyapoz dönemine sokarak, şartlar yaşamını devam ettirmek için uygun hale gelene kadar metabolizmasını yavaşlatıp, minimum enerji harcamaktadır. Kapra böceğinde meydana gelen fakültatif diyapozun sekiz yıla kadar sürdüğü, bu zararlı ile mücadelenin diyapoz durumunda iken en zor olduğu ve bu fazda kimyasal mücadele yöntemlerinin bile yetersiz kaldığı rapor edilmiştir (Burges, 1963). Diyapoz fazındaki kapra böceğinin hayatta kalmasına yardımcı olacak bazı genlerin ifade seviyelerinde artış olduğu, soğuk ile indüklenmiş diyapoz ve kontrol larvalarında yapılan karşılaştırmalı RT-qPCR analizi sonucunda gözlenmiştir (Dağeri ve ark., 2022). Kapra böceğinde ilk defa *Antifreeze protein maxi-like* ve *Cold-shock domain-containing protein E1* genleri tanımlanmış, bu genlerin soğukla indüklenmiş diyapoz, akut soğuk şoku ve iyileşme fazlarındaki dahiliyetleri kontrol grupları ile kıyaslanmış, gen ifade profilleri ortaya konulmuştur (Dageri ve ark., 2023).

2.2.Nanoteknoloji

İçinde bulunduğumuz çağ, teknolojinin her alanında minyatürleşmeyi sağlayan bir nanoteknoloji çağıdır. Maddenin nano ölçekte manipüle edilmesini sağlayan nanoteknoloji, teknolojinin farklı alanlarında çeşitli faydalar sağlayan, disiplinler arası araştırma için gelecek vaat eden bir alandır. Son on yılda geleneksel veya mevcut tekniklere kıyasla birçok alana

avantajlar sağlayan nanoteknoloji bilim dalı büyük önem kazanmıştır (Das ve Chatterjee, 2019).



şekil 2. 5. Nanoteknoloji ve diğer bilimler.

Nanoteknoloji, böcek ilaçları, ilaç taşınımı, elektronik cihazlar, güneş pilleri, kozmetik, tekstil, antibakteriyel aktivite ve yüksek iletkenlik ve tarım gibi çeşitli alanlarda çok çeşitli fırsatlar sunmaktadır (şekil 2.5) (Jamkhande ve ark., 2019). Nanomalzemelere dayalı böcek öldürücülerin formülasyonları yoluyla, zararlı böceklerin kontrolü de sağlanabilmektedir. Bu yöntem, zararlı böceklerin kontrolü için kullanılan geleneksel stratejilere ve nanoteknolojinin modern yaklaşımları olan nanomateryallerin potansiyeline odaklanmaktadır. Bu nedenle, tarımda zararlı böceklerin doğaya zarar vermeden kontrolünde nanoteknoloji yeşil ve verimli alternatifler sağlamaktadır (Ragaei ve Sabry 2014). Hala, zararlı böceklere karşı kullanılan kontrol stratejileri sentetik insektisit uygulamalarına dayanmaktadır. Ayrıca, böcek popölasyonlarında insektisit direnci nedeniyle bu uygulamaların etkinliği azalmıştır. Dolayısı ile zararlı böcek kontrolü için nanomateryal tasarlamak, geleneksel böcek ilacı formülasyonlarına kıyasla, birçok bakımdan umut verici bir alternatiftir (Cáceres ve ark., 2019).

2.2.1. Nanoparçacıklar

Nanoteknoloji, teknolojide pek çok uygulamaya sahip, hızla büyüyen ve gelişen bir alandır. Bu alan, nanoparçacıklar (NP'ler) üretmek için yeni yöntemler sağlamak amacıyla kimya, mühendislik, fizik ve biyoloji dâhil olmak üzere çeşitli disiplinlerden yararlanmaktadır. Nanoteknoloji, çeşitli NP'lerin sentezi, karakterizasyonu ve uygulamaları ile ilgilenmektedir. Sentezlenen NP'lerin boyutu 1–100 nm arasında değişebilmektedir (Verma ve ark., 2019). NP'leri sentezlemek için çeşitli sentetik kimyasallar yaygın olarak kullanılır; ancak bunların kullanımı çevre dostu değildir. Toksik olmayan, çevre dostu bir NP üretim teknolojisi geliştirmeye yönelik acil bir ihtiyaç vardır (Hano ve Abbasi 2021).

NP'lerin geniş bir ürün yelpazesi vardır; tıp, enerji üretimi ve çevresel iyileştirme dahil olmak üzere birçok potansiyel uygulamaya sahiptirler. NP araştırmaları için en umut verici alanlardan birisi tıptır. NP'ler, vücuttaki belirli hücreleri ve dokuları hedef alma yeteneğine sahiptir ve bu da onları ilaç dağıtımı için faydalı kılar (Patra ve ark., 2018). Örneğin, NP'ler, kanser hücrelerini hedef alacak şekilde tasarlanabilir ve yalnızca tümör bölgesine ulaştığında bir ilaç yükü salabilir. Bu, kemoterapinin yan etkilerini en aza indirmeye ve tedavinin etkinliğini artırmaya yardımcı olabilir. NP'lerin araştırıldığı bir başka alan da enerji üretimidir. Örneğin, NP'ler güneş pillerinin ve pillerin verimliliğini artırmak için kullanılabilir. Pillerin elektrotlarında NP'ler kullanılarak, depolayabilecekleri enerji miktarını önemli ölçüde artırmak mümkündür (Wei ve ark., 2018). NP'ler çevresel iyileştirmede de kullanılabilir. Örneğin, metilen mavisi (MB) boya ve diğer kirleticileri temizlemek için kullanılabilirler. NP'ler, belirli kirleticileri absorbe edecek ve daha sonra ortamdan kolayca uzaklaştırılacak şekilde tasarlanabilir (Rahaiee ve ark., 2020).

Pek çok potansiyel faydasına rağmen, NP'lerin omurgalı canlıların sağlığı ve çevreye verebilecekleri potansiyel olumsuz etkileri konusunda da endişeler bulunmaktadır. Örneğin, bazı NP'lerin solunduğunda zehirli olduğu tespit edilmiş ve bunların çevrede birikip doğal yaşama zarar verme ihtimali üzerinde durulmuştur. Bu nedenle, NP'lerin güvenlik ve çevresel etkilerine yönelik araştırmalar ayrı ve önemli bir çalışma alanıdır. Genel olarak, NP'ler birçok endüstride devrim yaratma ve yaşamları çeşitli şekillerde iyileştirme potansiyeline sahiptir (Handy ve Shaw, 2007).

2.2.2. Nanoparçacıkların sınıflandırılması

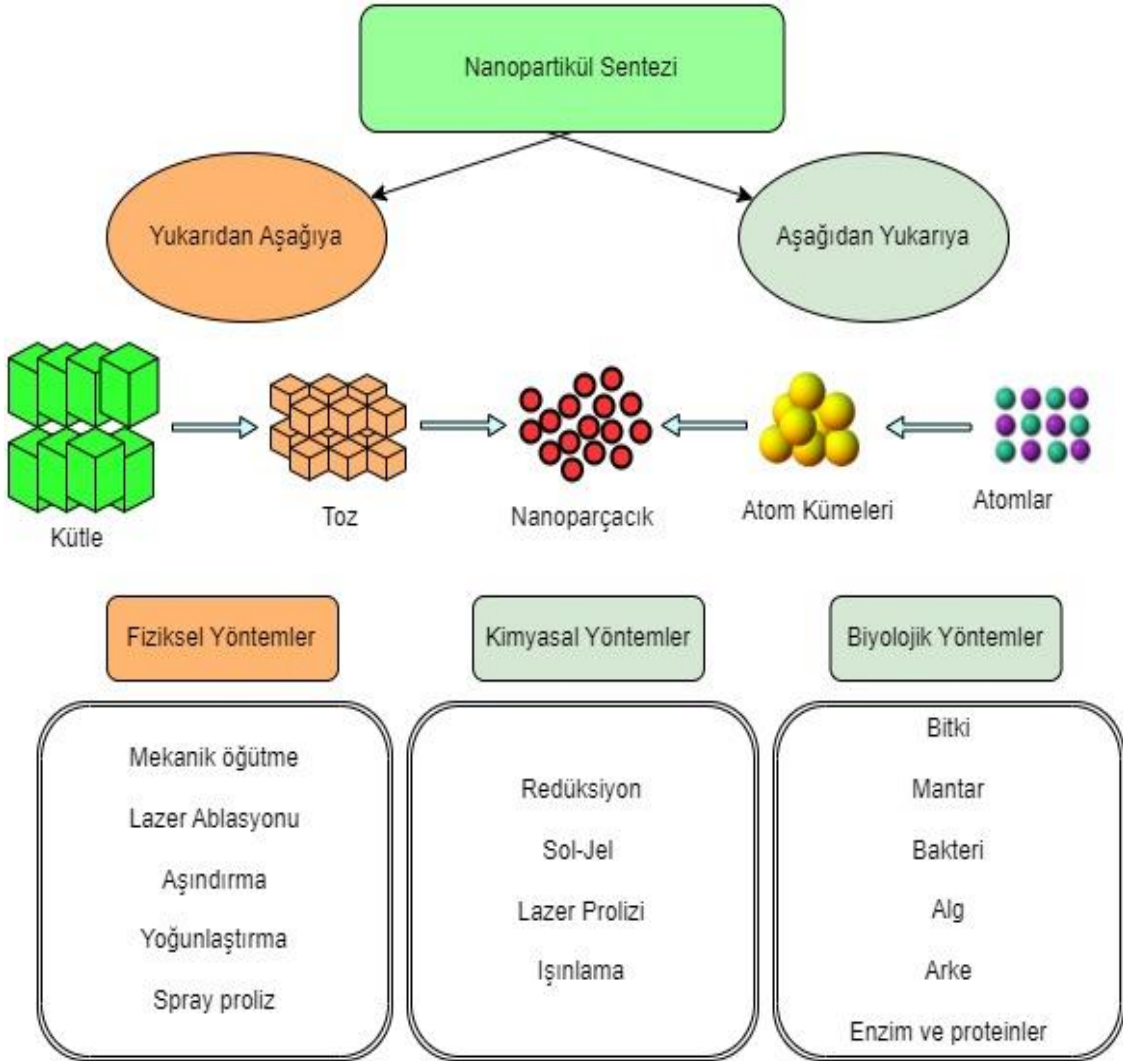
NP'ler, sıfır boyutlu, tek boyutlu, iki boyutlu ve üç boyutlu nanomalzemeler olmak üzere boyutlarına göre dört gruba ayrılırken, yapılarına göre ise temel olarak üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar organik, inorganik ve karbon bazlı NP'lerdir (Joudeh, N., ve Linke, D. 2022). Organik NP'ler, proteinler, karbohidratlar, polimerler veya diğer organik bileşikler içerabilmektedir (Pan ve ark., 2016). Bu NP'ler toksik değildir, biyolojik olarak parçalanabilirler (Ealia ve ark., 2017). Organik NP'lerin potansiyel uygulama alanını belirleyen bileşim, yüzey morfolojisi, kararlılık, taşıma kapasitesi, vb. gibi farklı parametreler vardır. Günümüzde organik NP'ler çoğunlukla biyomedikal alanda hedeflenen ilaç dağıtımında ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Gujrati ve ark., 2014). Karbon bazlı NP'ler yalnızca karbon atomu içeren NP'lerdir. Elektriksel iletkenlikleri, yüksek dayanıklılıkları, elektron afiniteleri, optik ve termal özellikleri sebebiyle kullanılmaktadır (Mauter ve ark., 2008).

İnorganik NP'ler ise metal, seramik ve yarı iletken metallerden oluşan NP'lerdir. Metal NP'ler tamamen metal öncülerinden yapılmıştır: monometalik, bimetalik veya polimetalik olabilirler. Bimetalik NP'ler alaşımlardan yapılabilir veya çekirdek-kabuk gibi birden fazla katmanlarda oluşturulabilir. Lokalize yüzey plazmon rezonans özellikleri nedeniyle, bu NP'ler benzersiz optik ve elektriksel özelliklere sahiptir. Ek olarak, bazı metal NP'ler kendine özgü termal, manyetik ve biyolojik özelliklere sahiptir. Bu, inorganik NP'leri çok sayıda fiziksel, kimyasal, biyolojik, biyomedikal ve farmasötik uygulamada kullanılabilen nanocihazların geliştirilmesi için giderek daha önemli malzemeler haline getirmektedir (Joudeh ve ark., 2022).

2.2.3. Nanoparçacıkların sentezi

NP'ler kimyasal, fiziksel veya biyolojik olarak sentezlenebilmektedir. Fakat temelde aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya olmak üzere iki yöntem bulunmaktadır (Şekil 2.6). Aşağıdan yukarıya yöntem, malzemenin atomdan önce kümeler ve daha sonra NP'lere kadar büyümesidir. Sol-jel, kimyasal buhar biriktirme (CVD), piroliz ve biyosentez, NP üretimi için en yaygın kullanılan aşağıdan yukarıya yöntemlerdir. Yukarıdan aşağıya yöntem, bütün bir kütle halindeki malzemenin nanometrik ölçekli parçacıklara indirgenmesidir. Mekanik

öğütme, nanolitografi, lazerle kesme, püskürtme ve termal ayrıştırma en yaygın kullanılan yukarıdan aşağıya NP sentezleme yöntemlerindendir (Ealia ve ark., 2017).



Şekil 2. 6. NP sentez yöntemleri.

2.2.4. Nanopestisitler

Nanopestisitler, zirai kimyasal bileşenleri taşımak için aktif bileşen olarak NP'leri kullanan, 1 - 200 nm arasında iki ila üç boyutlu nispeten yeni nano yapılardır (Vasseghian ve ark., 2022). Bu küçük parçacıklar boyutlarından dolayı eşsiz olma niteliğinin yanı sıra, insektisit yerine kullanılmaları ve kimyasal ilaçların NP'lere yüklenmesi gibi bir takım yeni avantajlar sunmaktadır (Chaud ve ark., 2021). Bitki dokularına nüfuz etmede etkili olmalarından ötürü, tarım zararlılarını kontrol etmede oldukça iyidirler. Bu nanopestisitler metaller, metal oksitler ve polimerler dâhil olmak üzere çeşitli malzemelerden yapılabilmektedir. Bunlardan bazıları, antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu gösterilen

gümüş, bakır ve ZnO NP'ler ve belirli zararlılara karşı toksik olabilen karbon bazlı NP'lerdir (Kookana ve ark., 2014).

Nanopestisitler, insektisit olarak kullanılmalarının yanısıra, kimyasal içeriklerinden dolayı çevresel kirlenmeye sebep olmakta ve insan sağlığını tehdit etmektedir. Buna ek olarak, nanopestisitlerin sürekli uygulanması, böceklerde direnç neden olabilmesi bakımından, tarımsal zararlılar ile mücadelede zorluklar oluşturmaktadır (Hamel ve ark., 2020). Bu nedenle, zararlı böceklerin kontrolü için tasarlanmış yeni NP'lerin hızla geliştirilmesiyle ileri teknolojileri kullanan yeni stratejiler, bu sorunları çözmeyi amaçlamaktadır. Yeni nanopestisitlerin, zararlı böcekleri kontrol etmeye yönelik metabolizmalarına nüfuz edebilen, aktif ve kararlı kalabilen, aynı zamanda çevreye karşı zararsız olabilen, uygun maliyetli ve gelişmiş formülasyonlar sağlaması beklenmektedir (Deka ve ark., 2021). Genel olarak, nanopestisitlerin evrimi, hem bitki koruma hem de tarım zararlılarının kontrolünün olumsuz çevresel etkisini azaltma faydaları ile umut verici niteliktedir (Çizelge 2.1).

Kimyasal pestisitlerin aşırı kullanımıyla yaşanan önemli ekolojik ve toksikolojik sorunlar, yeşil kimyaya olan ilgiyi artırmıştır (Benelli ve ark., 2018). Yeni polimer bazlı nanoformülasyonları sunan birçok yeni makale, biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin kullanımı yoluyla çevreye daha az zararlı bitki koruma ürünleri geliştirme yolunda çalışmalar yapmaktadır. Nanopestisitler olarak kabul edilen polimer türleri, farmasötik veya kozmetik sektörlerinde kullanılanlara benzer olup, başlıca polisakkaritler (kitosan, aljinatlar ve nişasta) ve poliesterleri (poli-ε-kaprolakton ve polietilen glikol) içermektedir (Abreu ve ark., 2012). Pek çok doğal maddenin böcek öldürücü özellikler sergilediği bilinmektedir; ancak bunlar genellikle kararsızdır ve erken bozunmaya karşı koruma gerektirir. Gelecekte üretilen nanopestisitlerin, hem maliyet hem de performans açısından mevcut formülasyonlarla rekabet edip edemeyecekleri ayrıca araştırılması gereken bir alandır (Kah ve ark., 2014).

Çizelge 2. 1. Zararlı böceklerle mücadele amacıyla farklı NP uygulamaları.

NP türleri	NP'lerin zararlı böcekler üzerindeki insektisidal etkileri	Ölümcül konsantrasyonlar (LC _{50/90}) veya ölüm yüzdesi	Kaynak
ZnO NP	<i>Sitophilus oryzae</i> ve <i>Sitotroga cerealella</i> erginlerine, yeşil sentezlenmiş ZnO NP'ler uygulanmıştır. Erginlerin ölüm oranları, maruz kalma süresi ve NP'lerin konsantrasyonu ile birlikte artmıştır.	Böceklerin 50, 100 ve 150 ppm ZnO NP'ler ile muamele edilmiş buğday tanelerine 7 - 14 günlük maruziyetleri sonrası, istatistiksel olarak anlamlı ölüm oranları (88.89±11.11'e kadar) görülmüştür.	İbrahim ve ark., 2022

ZnO NP	<i>Eucalyptus globulus</i> 'un yaprak ekstraktından sentezlenen yeşil ZnO NP'ler, <i>Rhyzopertha dominica</i> 'nın kontrolünde olumlu etki göstermiştir.	15 günlük maruziyet süresi sonunda 1800 ve 600 ppm dozlarında sırası ile %62,5 ve %80,5 ölüm oranları gözlenmiştir.	Siddique ve ark., 2022
Ag NP	<i>Datura stramonium</i> ve <i>Syzygium aromaticum</i> yağları kullanılarak 300 ppm konsantrasyonunda biyosentezlenmiş Gümüş NP'ler (AgNP'ler), <i>T. granarium</i> 'a karşı insektisidal etki göstermiştir.	<i>T. granarium</i> 'da en yüksek ölüm oranı %41,40 kaydedilmiştir.	Gulzar ve ark., 2020
SiO₂ NP	SiO ₂ NP'lerin, 2 ve 5 günlük uygulamalarının <i>T. granarium</i> ve <i>Stegobium paniceum</i> 'da %100 ölüm oranına sebep olduğu görülürken, <i>Tribolium castaneum</i> 'da 21 günlük uygulamasının ise %83 ölüm oranına neden olduğu bulunmuştur.	Ölüme neden olan konsantrasyonlar, <i>T. granarium</i> için 1,5 ve 2 g/kg ve <i>T. castaneum</i> için 4 g/kg olarak belirlenmiştir.	Abdelfattah ve Zein, 2019
Fe₃O₄	<i>Musca domestica</i> 'da Manyetit NP'ler ile yapılan besleme ve temas toksisite çalışmaları sonucu insektisit etki gözlenmiştir. 23 ila 30 nm boyutunda, Fe ₃ O ₄ NP'lerin, <i>Musca domestica</i> 'nın pupa ve larvalarına karşı toksik etki edebileceği bildirilmiştir.	LC ₅₀ ve LC ₉₀ değerleri, besleme ve temas deneylerini takiben sırasıyla 60 ve 75 µg/mL olarak bulunmuştur.	Toto ve ark., 2022
Cu NP	Mantar kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle sentezlenmiş Cu NP'ler, <i>Tenebrio molitor</i> ve diğer çeşitli sivrisinek larvalarına karşı önemli ölçüde toksik aktivite göstermiştir.	LC ₅₀ ve LC ₉₀ değerleri, <i>T. molitor</i> larvaları için sırasıyla 6.487 - 29.363 µg/mL olarak belirlenmiştir.	Vivekanandhan, ve ark., 2021b
ZnO	Çinko Oksit (ZnO) ve silika NP'lerin <i>Sitophilus oryzae</i> L., <i>Callosobruchus maculatus</i> ve <i>Tribolium castaneum</i> üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir.	Zararlılar üzerindeki ZnO etkisi sırasıyla %98,3, %98 ve %57 olarak belirlenmiştir. Silika NP'lerin en yüksek konsantrasyondaki ölüm oranları sırası ile %100, %88.3 ve %36'dır.	Haroun ve ark., 2020
g - Cu NP	Bakteriler aracılığıyla sentezlenmiş Cu NP'ler <i>Tribolium castaneum</i> 'a karşı önemli ölçüde insektisidal etki göstermiştir.	5 günlük uygulama sonrası LC ₅₀ değeri 37 ppm olarak kaydedilmiştir.	El-Saadony ve ark., 2020
CuO - NP	CuO NP'ler, <i>Sitophilus granarius</i> ve <i>Rhyzopertha dominica</i> 'da yüksek seviyede insektisit aktivite göstermiştir.	10 günlük uygulama sonrası <i>S. granarius</i> için %55 - 94.4 oranlarında ölüm saptanırken, <i>R. dominica</i> 'da %70 - 90 arasında mortalite oranı bulunmuştur.	Badawy ve ark., 2021
AgNP	AgNP'ler, çeşitli sivrisinek türleri olan <i>Anopheles stephensi</i> , <i>Aedes aegypti</i> ve <i>Culex quinquefasciatus</i> üzerinde toksik etki göstermiştir.	Sineklerdeki ölüm oranları sırasıyla, LC ₅₀ = 26.712 µg/mL; LC ₉₀ = 49.061 µg/mL, LC ₅₀ = 29.626 LC ₉₀ = 54.269 µg/mL) ve LC ₅₀ = 32.077 µg/mL; LC ₉₀ = 58.426 µg/mL) olarak belirlenmiştir.	Veerakumar ve ark., 2014

g – Cu NP	Yeşil sentezlenmiş Cu NP'ler <i>Trogoderma granarium</i> üzerinde uygulanmıştır. Cu NP'lerin kapra böceğine karşı önemli bir insektisit olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.	250 ve 300 ppm derişimlerinde uygulanan Cu NP'ler kapra böceği ergininde 144. saatte %90 oranında ölüme sebep olmuştur.	Kadir, M. L., 2022.
ZnO NP	Yeşil sentezlenmiş ZnO NP'ler, <i>Spodoptera litura</i> ve <i>Macrosiphum euphorbiae</i> 'nin kontrolünde çevre dostu alternatif insektisit olarak önerilmiştir.	ZnO NP'lere 144 saat maruziyet sonrası <i>S. litura</i> 'nın üçüncü dönem larvaları ve <i>M. euphorbiae</i> erginlerinde %100 ölüm oranı gözlenmiştir.	Thakur ve ark., 2022
ZnO NP	Ticari olarak temin edilen ZnO NP'lerin insektisidal etkinliği <i>T. granarium</i> 'a karşı 50, 100 ve 200 mg kg ⁻¹ derişimlerinde uygulanarak 7 gün boyunca gözlenmiştir.	50 mg kg ⁻¹ derişiminde %27,5 ölüm oranı görülürken, 100 mg kg ⁻¹ derişiminde bu oranın %37,1 olduğu görülmüştür. Uygulamanın 7. gününde ve en yüksek konsantrasyon olan 200 mg kg ⁻¹ derişimindeki ölüm oranı ise %60 olarak belirlenmiştir.	Raduw ve Mohammed, 2020

2.3. Yeşil Sentez

NP sentezinde kullanılan kimyasal ve fiziksel yöntemlerdeki çevre dostu olmayan yaklaşımlar nedeniyle, biyolojik sentez yöntemi ön plana çıkmıştır. Dolayısı ile son yıllarda NP'ler için güvenli, kolay, uygun maliyetli, sürdürülebilir ve ölçeklenebilir yeşil sentez yaklaşımları geliştirilmiştir. Mayalar, mantarlar, bakteriler ve bitki özleri gibi çeşitli biyolojik sistemler, şu sıralar NP'lerin üretimi için yeşil sentez yaklaşımlarında ana materyal olarak kullanılmaktadır. Bitki temelli NP yeşil sentezi ise, uygulama kolaylığı ve bitki çeşitliliğinin fazla olması nedeniyle biyolojik teknikler arasında en çok tercih edilenidir (Hano ve ark., 2021). Yeşil sentezin kullanılmasına ilişkin diğer avantajlar ise, hem düşük maliyetli hem de çevreye ve canlılara daha az toksik olmasıdır. Bu nedenle, yeşil sentez yöntemi çevre dostu olarak kabul edilmektedir (Benelli ve ark., 2018).

Bitki ekstraktları, NP'ler oluşturmak için metal iyonlarının biyolojik indirgemesinde kullanılmaktadır. Fenolik asitler, şekerler, alkaloidler, terpenoidler, polifenoller ve proteinler gibi bitki metabolitlerin, metal iyonlarının NP'lere indirgenmesinde ve sonraki kararlılıklarının desteklenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Metal tuzu gibi farklı aktif moleküller ve öncüller, NP'lerin nihai morfolojisini ve boyutunu belirler. NP'lerin oluşumu, bitki ekstraktlarının içeriğine bağlı olarak öncül metal çözeltisinde kısa sürede tamamlanabilir; bunun başlıca nedeni ekstraktların konsantrasyonu, metal tuzu konsantrasyonu, pH ve sıcaklıktır (Gour ve ark., 2019). Biyolojik teknikler veya yeşil sentez kullanılarak sentezlenen NP'ler, tek adımlı bir prosedür kullanılarak sentezlendikleri için,

daha fazla kararlılık ve uygun boyut gibi çeşitli özelliklere sahip olurlar (Parveen ve ark., 2016).

2.4. Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

Sentezlenen NP'lerin farklı mikroskopik ve spektroskopik cihazların kullanımı ile morfolojik ve yapısal analizleri yapılmaktadır. En yaygın kullanılan yöntemler şunlardır: Ultraviyole / Görünür Bölge Spektrofotometresi (UV - Vis) , X - Işını Kırınım Spektroskopisi (XRD), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi (FTIR), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM). Genel olarak, bu teknikler NP'lerin boyutu, şekli, bileşimi, kristal yapısı ve yüzey kimyası hakkında kapsamlı bilgi sağlayabilir. Karakterizasyon yönteminin seçimi, karakterize edilmesi gereken özelliklere ve çalışılan numunenin türüne bağlıdır (Gour ve Jain, 2019).

2.5. Kereviz Bitkisi (*Apium graveolens* L. var. *dulce*)

Sap kereviz olarak da bilinen *Apium graveolens* L. var. *dulce* Mısır ve Doğu Asya ülkelerinde yetişen iki yıllık bir bitkidir (Şekil 2.7). Mısır, İsveç ve güney Avrupa ülkelerinin sulak alanlarına özgü bu bitki gıda, ilaç ve aroma için doğal baharat olarak kullanılır (Helaly ve ark., 2015). Kereviz bitkisi Ca, Mn, Mg, P, Fe ve Zn minerallerine ek olarak A, B1, B9, C, E ve K vitaminleri içeriği ile tanınır (Shad ve ark., 2011; Domagaa ve ark., 2012). Yaprakları salatalarda yaygın olarak kullanılırken, tohumları kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklı kandaki lipid seviyesini düşürmede (Shehata ve Soltan, 2012), kas spazmlarında (Saini ve ark., 2014), iltihaplanmalarda ve birçok sağlık sorunlarından korunmaya yardımcı olmada kullanılır (Abdel-Moein ve ark., 2011).



Şekil 2. 7. *Apium graveolens* L. var. *dulce* yaprağı (<https://www.healthbenefitstimes.com/celery>).

Apium graveolens L. var. *dulce* geleneksel olarak, çeşitli sağlık sorunlarını tedavi etmek için kullanılır. Antiinflamatuvar, antiradikal, antidiyabetik, antikoagülan, antimikrobiyal, anti-kanser, hipolipidemik, hipoglisemik, hipokolesterolemik, hepato ve nöroprotektif etkiler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkilere sahiptir (Prasathkumar ve ark., 2021; Chonpathompikunlert ve ark., 2018; Kooti ve ark., 2015; Shivashri ve ark., 2013).

Kereviz bitkisi tohumlarının kapra böceği üzerinde itici ve öldürücü etki gösterdiği belirtilmiştir. % 2, % 4 ve % 6 gibi farklı konsantrasyonlarda kereviz tohumlarının tozları kapra erginleri üzerinde uygulanmıştır. En yüksek ölüm oranı %6 konsantrasyonunda 6 günlük maruziyet sonunda %96.6 olarak belirlenmiştir. Kapra üzerinde iticilik testinde ise, %40 oranındaki kereviz tohumlarının etkili olduğu bildirilmiştir (Mhemed, A. J. 2011).

Aedes aegypti, *Aedes gardnerii* ve *Aedes lineatopennis* gibi çeşitli sivrisinek türlerine karşı uygulanan *A. graveolens* ekstraktının farklı formülasyonları, güçlü bir kovucu özellik göstermiştir. Ticari olarak hali hazırda kullanılan kimyasallara kıyasla daha yüksek kovuculuk gösteren formülasyon, kereviz bitkisinin bu alanda çevreci kullanımının mümkün olabileceğini göstermiştir (Tuetun ve ark., 2008).

İçlerinde kereviz bitkisinin de bulunduğu farklı bitki çeşitlerinin ekstraktlarından yapılmış formülasyonlar, *Sitophilus oryzae*, *Callosobruchus maculatus* ve *Tyrophagus putrescentiae* gibi bazı depolanmış tahıl zararlılarına karşı kullanılmıştır. Kereviz ekstraktının artan konsantrasyonları ile birlikte, zararlılar üzerinde %100 ölüm oranına sebep olduğu bildirilmiştir (Al-Akhdar ve ark., 2015).

Bir tahıl kurdu olan *Rhyzopertha dominica* F. ile mücadelede kereviz tohumlarından ekstrakte edilen esansiyel yağın toksik ve itici etkileri araştırılmıştır. Sonuçta, kereviz esansiyel yağının, *R. dominica*'nın erginleri üzerinde önemli bir toksisiteye sahip olduğu

bildirilmiştir. Genel ölüm oranı, artan uçucu yağ konsantrasyonları ve maruz kalma süreleri ile doğrudan ilişkili olmuştur. Öldürücü olmayan konsantrasyonlarda ise zararlı üzerinde kovucu etki gösterdiği belirtilmiştir (Ebadollahi ve ark., 2018).

Yeşil sentez yoluyla *Apium graveolens* L. var. *dulce* kullanılarak elde edilen gümüş NP'lerin antifungal aktivitesi, iki patojenik mantar çeşidinde (*Aspergillus niger* ve *Aspergillus goii*) incelenmiştir. NP uygulanan bölgede inhibisyon meydana gelmiş ve NP'lerin uygulanan konsantrasyona bağlı olarak mantarların büyümesini çeşitli seviyelerde engellediği görülmüşken, kontrol olarak kullanılan kereviz ekstraktının ise mantar büyümesini devam ettirdiği görülmüştür (Roy ve ark., 2015).

Apium graveolens' den biyolojik olarak sentezlenen kobalt oksit NP'lerin etkinlikleri cilt enfeksiyonlarına neden olan gram-negatif (*Pseudomonas aeruginosa*) ve gram-pozitif (*Staphylococcus aureus*) patojenlere karşı denenmiştir. Kobalt NP'ler küçük olduklarından dolayı bakteri hücre zarını parçalayarak antibakteriyel özellik göstermiştir. Ekstrakt oranının artırılmasının NP etkinliğini artırdığı da ayrıca belirtilmiştir (Urabe ve Aziz, 2019).

Bir çalışmada sap kerevizin yapraklarından elde edilen esansiyel yağ, doğal ortamda ve laboratuvar ortamında olmak üzere iki farklı deney setinde sivrisineklere (*Aedes aegypti*) uygulanmıştır. Farklı dozlarda uygulanan esansiyel yağ, ortamdan bağımsız olarak sivrisineklerin ölüm oranını yükseltmiştir. Sonuç olarak, her iki ortamda yetişen sivrisinekler için de *A. graveolens* esansiyel yağının, insektisidal etki gösterdiği bildirilmiştir (Chaiyasit ve ark., 2006).

Başka bir çalışmada yine *Aedes aegypti* sivrisineklerine uygulanan *A. graveolens*'in tohum ekstraktı, larvalar ve erginlerde insektisidal aktivite göstermiştir. Ayrıca, muamele sonrası anormal hareket sergileyen larvalardan dolayı, *A. graveolens* ekstraktının toksik etkisinin, sinir sistemi üzerinde etkili olabileceği belirtilmiştir. Sonuç olarak, *A. graveolens* tohum ekstraktının sivrisinekler üzerinde kovucu ve öldürücü etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Choochote ve ark., 2004).

2.6. ZnO NP'ler

2.6.1. Yeşil sentez yolu ile elde edilen ZnO NP'ler

ZnO NP'leri, çeşitli alanlarda ilginç özelliklere ve geniş uygulama alanlarına sahip temel metal oksit parçacıklarıdır. Ayrıca, düşük toksisite ve biyouyumluluk gibi özelliklere sahip olan ZnO NP'lerin, diğer NP'lere kıyasla kanser hücrelerine karşı doğal olarak seçici toksisite gösterdiklerini ve bu nedenle, gelecekte bir antikanser ajanı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Anjum, ve ark., 2021). Birçok enzimin kofaktörü olan Zn, DNA replikasyonu, DNA onarımı dâhil olmak üzere hücresel süreçlerde önemli rol oynar ve kanser hücrelerinde oksidatif stresi indüklemeye yeteneğine de sahiptir. Bu nedenle, ZnO NP'lerin kullanımı tıp bilimi açısından oldukça önemlidir. Ayrıca ZnO NP'ler, özel yarı iletken, optik ve piezoelektrik özelliklere sahip olduğundan, biyomedikal görüntüleme, floresan, manyetik rezonans, tomografi, ilaç dağıtımı gibi çok çeşitli biyomedikal uygulamalar için kullanılabilirler (Mohammadian ve ark., 2018).

ZnO NP'ler için mekanokimyasal işleme, kendi kendine birleştirme, mikrodalga yöntemi, doğrudan çökeltme ve RF plazma sentezi gibi birçok farklı sentez yöntemi geliştirilmiştir. Genellikle bu yöntemlerin, tek tip bir parçacık boyutu dağılımına sahip olmaması veya parçacık boyutunun büyük olması gibi dezavantajları vardır. Bu yöntemlerde çözeltiye, yüzey gerilimini etkileyen ve topaklanmayı engelleyen bazı maddeler eklenir (Ayuk, ve ark., 2017).

Bitki ekstraktları, partiküllerin topaklanmasını engelleyen ve daha küçük boyutlu partiküllerin üretilmesini sağlayan maddeler içerir. Bitkilerin toksik olmayan içeriklerinin kullanılması nedeniyle yeşil sentez, NP'lerin sentezi için kullanılması çevre dostu yöntemlerden biridir (Mohammadian, 2018).

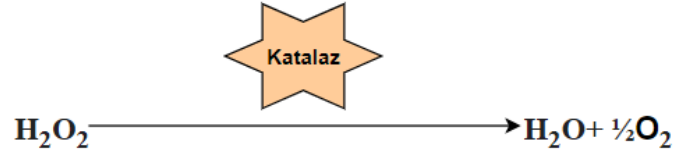
Yapılan bir çalışmada, Etiyopya'nın farklı bölgelerinde yetiştirilen ve endemik bir bitki olan Koseret (*Lippia adoensis*) yaprak ekstraktından yeşil sentez yöntemi ile ZnO NP'ler sentezlenmiştir (Demissie ve ark., 2020). Biyosentezlenen ZnO NP'ler, termogravimetrik analiz (TGA), XRD, TEM, enerji dağılımlı spektroskopi (EDS), SEM, UV-Vis ve FTIR kullanılarak karakterize edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada araştırmacılar, sentezlenen ZnO NP'lerin *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*'in klinik ve standart suşlarına karşı disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivitesini de değerlendirmiştir. Böylece, *Lippia adoensis* yaprak ekstraktı kullanılarak sentezlenen ZnO NP'ler, hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakteri suşlarına karşı sırasıyla 14 mm ve 12 mm inhibisyon bölgesi oluşturarak antibakteriyel etki göstermiştir (Demissie ve ark., 2020).

Ticari olarak temin edilen yeşil ZnO NP'lerin *T. granarium* üzerindeki insektisidal etkisi araştırılmıştır. Uygulanan dozlara göre ölüm oranları farklılık göstermiştir. Kapra böceğinin ikinci dönem larvalarının, diğer dönemlerden fazla ölüm oranına sahip olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak, kapra böceğinin ZnO NP'lerle muamelesi ile kontrol edilebileceği bildirilmiştir (Raduw ve Mohammed, 2020).

2.7. Katalaz

Antioksidanlar, hücrelerdeki serbest radikalleri nötralize ederek hücre hasarını önlemektedir. Katalaz (CAT) enzimi, hücrelerin antioksidan savunmasının önemli bir parçasıdır. CAT hücrelerdeki Hidrojen Peroksit (H_2O_2) gibi zararlı bileşikleri parçalayarak su ve oksijene dönüştürür (Şekil 2.8). Böylece serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek, antioksidan savunmanın etkinliğini artırır (Kim ve ark., 2008). H_2O_2 , hücrelerdeki enzimlerin aktivitesi sırasında oluşabilir ve hücrelere zarar verebilmektedir. CAT, hücre metabolizmasında da önemli bir rol oynar. Özellikle karaciğer ve böbreklerde, yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve metabolik atıkların parçalanmasına yardımcı olur (Kaushal ve ark., 2018). Birçok organizma gibi böcekler de, oksidatif hasar savunması oluşturmak için önemli derecede CAT kullanırlar (Xu ve ark., 2017). CAT'ın yapısı ve regülasyonu *Bombyx mori*, *Protaetia brevitaris*, *Daphnia magna*, *Spodoptera exigua* ve *Helicoverpa armigera* gibi bazı böceklerde incelenmiştir (Yamamoto ve ark., 2005; Kim ve ark., 2008; Hu ve ark., 2011; Kim ve ark., 2010; Wang ve ark., 2012).

Bir çalışmada CAT, *Drosophila melanogaster*'da kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve aşırı ifadesinin *D. melanogaster*'ın yaşam süresini uzattığı anlaşılmıştır (Orr ve Sohal, 1994). Ayrıca, CAT'ın *Anopheles gambiae*'nin oositlerini ve embriyolarını reaktif oksijen türleri (ROS) nedeniyle oluşan hasardan korumada önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (DeJong ve ark., 2007).



Şekil 2. 8. Katalaz aracılığıyla H_2O_2 'in su ve oksijene detoksifikasyonu.

2.8. Isı Şok Proteinleri

Isı Şok Proteinleri (Heat Shock Proteins: (HSPs) (HSP'ler)), hücrelerde proteinlerin doğru şekilde katlanmasını, düzenlenmesini ve yıkımını sağlayan bir grup protein ailesidir. HSP'ler, artan sıcaklık, oksidatif stres, pH değişiklikleri, enfeksiyonlar, tıbbi müdahaleler gibi çeşitli uyarıcılara yanıt olarak hücrelerde sentezlenirler (Hartl ve ark., 2011).

1962 yılında *Drosophila melenogaster* larvasına uygulanan ısı şoku sonucunda sinekte kromozomal bir anormalliğin farkedilmesi sonucu keşfedilen HSP'ler, böceklerin çevresel stres faktörleriyle mücadelesinde büyük öneme sahiptir (Ritossa, 1962). HSP'ler yapılarına ve moleküler ağırlıklarına göre HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 ve küçük HSP'ler (small Heat Shock Proteins) olarak sınıflandırılmışlardır (Çizelge 2.2) (Tutar ve Tutar 2010). HSP'ler, tüm organizmaların hücrelerinde bulunan ve yeni oluşan polipeptitlerin katlanmasına yardımcı olan şaperon proteinleridir. Protein ifadesinin düzenlenmesi, böceklerin farklı çevresel stres koşullarına karşı savunma mekanizmalarından biridir. Hücresel stresin artması, protein yapılarının bozulmasına ve dolayısıyla *HSP* gen ifadesinde artışa neden olmaktadır. Oksidatif stres (Lopez-Martinez ve ark., 2008), sıcak (Joplin ve Denlinger 1990; Tungjitwitayakul ve ark., 2015), soğuk (Rinehart ve ark., 2007), ağır metal (Shu ve Wang 2011), radyasyon (Nguyen ve ark.,2009), virüs (Lyupina ve ark., 2010), bakteri (Iryani ve ark., 2017) gibi biyotik ve abiyotik stresler sonucu *HSP*'lerin ifade düzeyleri artmaktadır (Guz ve ark., 2021). HSP'lerin ayrıca, böcek diyapozunda bulunduğu organizmaya direnç sağladığı düşünülmektedir (Denlinger ve ark., 2001).

2.8.1. HSP60

HSP60, diğer ismiyle GroE şaperonları veya şaperonin, prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda bulunan 60 kDa büyüklüğünde oldukça korunmuş bir proteindir (Gupta,

1995). HSP60 proteinleri mitokondrilerde ve kloroplastlarda bulunur; uygun protein katlanmasını kolaylaştırmada çok önemli bir role sahiptir (Neupert, 1997; Bukau ve Horwich, 1998). Ayrıca protein agregasyonunu önler ve stres kaynaklı apoptozu düzenlerler. HSP'lerin stres aracılığı ile indüklenmesi, hücrelerin normalde ölümcül olan koşullarda hayatta kalmaları için hücrel koruma özelliği kazanmalarını sağlamaktadır (Kregel, 2002; Chow ve ark., 2009).

2.8.2. HSP68

HSP68, HSP70 ailesinin bir üyesidir. 68 kDa büyüklüğünde öncü bir protein olarak sentezlenen HSP68 mitokondriyal matrikste lokalizedir. HSP68, proteinlerin doğru şekilde katlanmasına ve yanlış katlanmış proteinlerin düzeltilmesine yardımcı olan bir şaperon proteindir (Palter ve ark., 1986). Ayrıca stres koşullarına yanıt olarak üretilir ve hasarlı proteinlerin yeniden düzenlenmesine ve hücrelerin stres koşullarına uyum sağlamasına yardımcı olur. HSP68'in antiapoptotik etkileri olduğu da gösterilmiştir (Nollen ve ark., 1999). Tüm bunlara ek olarak, ATP bağlayıcı olarak da görev almaktadır.

Çizelge 2. 2. HSP'lerin sınıflandırılması ve fonksiyonları.

İsim	Moleküler Ağırlık (kDa)	Lokalizasyon	Fonksiyon	Kaynak
Küçük HSP'ler	10-40	Sitozol, Nükleus	Hücre iskeletinin stabilizasyonu	Sun, 2005
HSP60	58-65	Sitozol, Mitokondri	Protein katlanması, agregasyonun önlenmesi	Gupta, 2010
HSP70	66-78	Sitozol, Mitokondri, Endoplazmik retikulum	Protein katlanması, oksidatif strese karşı koruma	Mayer ve Bakau, 2005
HSP90	82-90	Sitozol, Endoplazmik retikulum	HSF1 onarımı, agregasyonun önlenmesi	Snoeckx ve ark., 2001
HSP100	97-120	Sitozol, Mitokondri, Nükleus	Termo tolerans, protein katlanması	Barends, 2010

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. ZnO NP'lerin Sentezi ve Karakterizasyonu

3.1.1. Kereviz bitkisinin yaprağından ekstrakt hazırlanması

ZnO NP'lerin sentezinde kereviz bitkisi (*Apium graveolens* L. var. *dulce*)'nin yaprak ekstraktı kullanılmıştır. Satın alınan (Greenada Tarım Gıda Turizm İnşaat İthalat İhracat Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi) taze kereviz yaprakları oda sıcaklığında kurutulmuş ve öğütülerek toz haline getirilmiştir. Bitki tozu, 1:10 (kütle:hacim) oranındaki dH₂O-etanol içerisinde 80 °C sıcaklıkta 1 saat karıştırılarak ekstrakt elde edilmiştir. Elde edilen ekstrakt 9000 rpm'de (Nüve NF 800R) santrifüjlenerek Whatman kağıdı (no:1) ile süzölmüştür. Daha sonra bitki posaları ayrıştırılarak, elde edilen süpernatant +4°C'de saklanmıştır. Kereviz ekstraktın hazırlanmasında kullanılan çözücü, bitki miktarı, ısıtma süresi ve sıcaklığı standardize edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. Kereviz yapraklarından ekstrakt eldesi.

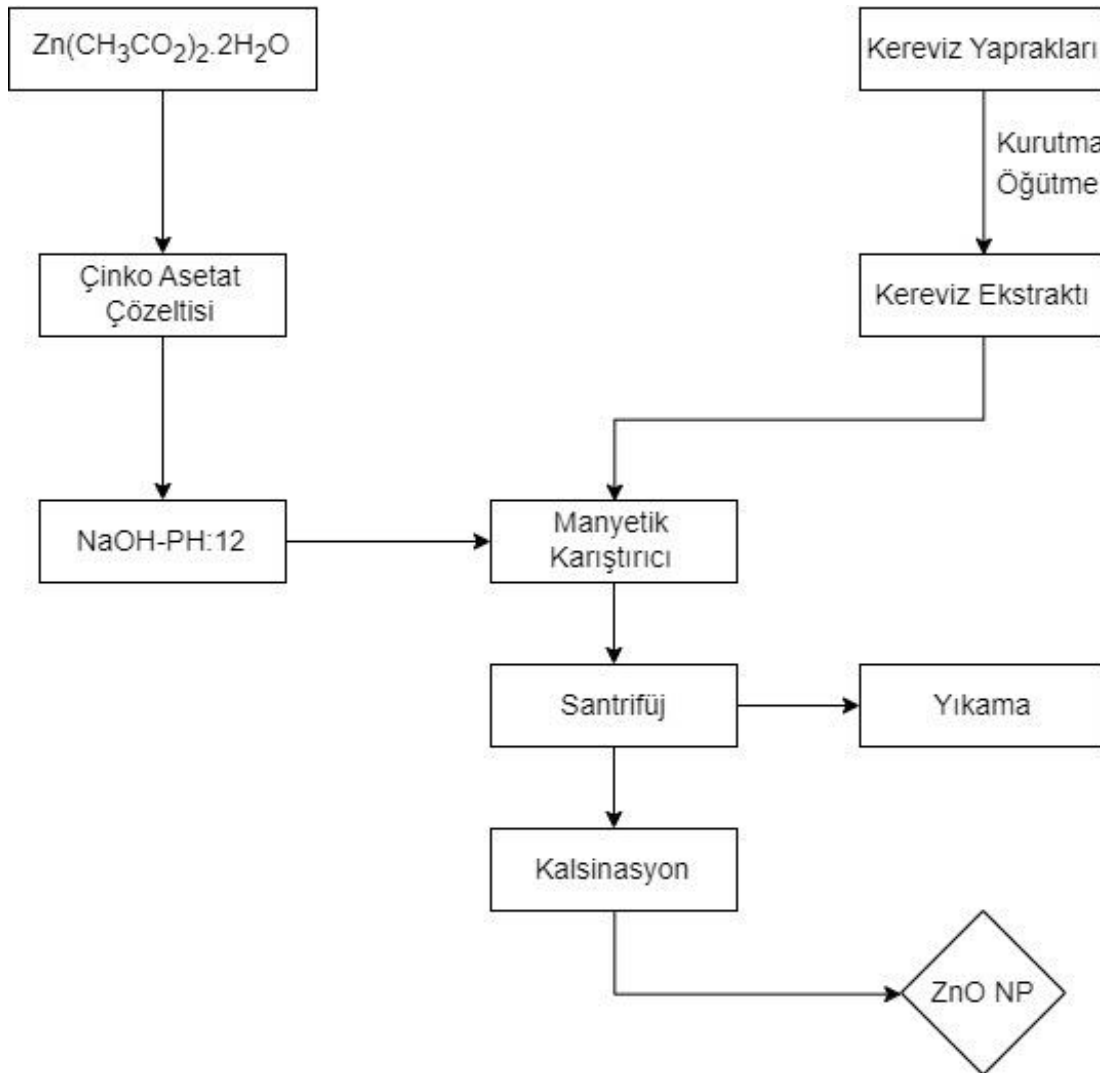
3.1.2. ZnO NP'lerin yeşil sentezi

ZnO NP sentezinde, Zn²⁺ kaynağı olarak, çinko asetat dihidrat (Zn(CH₃COO)₂.2H₂O) kullanılmıştır. NP sentezinde, çinko öncülünün indirgenmesi ve indirgendikten sonra yüzey kaplama ajanı olarak, kereviz bitki ekstraktı ile kaplanması amaçlanmıştır. İlk olarak, tartılan çinko asetat dihidrat 100 ml distile su ile çözülerek farklı derişimlerde (6, 20, 10, 50, 100 mM) hazırlanmıştır. 10 ml 10 mM çinko asetat dihidrat çözeltisi üzerine, 1 ml bitki ekstraktı damla damla eklenerek, 2 saat süre ile karışmaya bırakılmıştır. Çinko iyonları ekstraktın aktif molekülleri ile çevrelendikten sonra, reaksiyon ortamı bazik duruma getirilerek (pH:12), 1 saat daha karıştırılmıştır.



Şekil 3. 2. Yeşil NP Sentezi.

Oluşan NP çözeltisi 15 ml'lik falkon tüpüne alınarak 9000 rpm'de santrifüjlenmiş ve süpernatant yeni bir tüpe alınmıştır. Beş defa dH_2O ile yapılan yıkama işleminin ardından NP'lar kalsinasyon için yüksek sıcaklıkta ($400\text{ }^\circ\text{C}$) 1 saat süreyle yakılmıştır. Kalsinasyon işlemi ile ZnO NP oluşumu tamamlanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3. 3. ZnO NP sentez basamakları.

ZnO NP'lerin sentezi için reaksiyon parametreleri olarak; metal derişimi, metal:ekstrakt oranı, reaksiyon süresi, pH ve sıcaklık etkileri takip edilerek, monodispers (homojen dağılımlı ve homojen boyutlu) NP'lerin elde edilmesi hedeflenmiştir. Metal derişimi optimizasyonu için farklı derişimlerde (6, 10, 20, 50 ve 100 mM) çinko asetat dihidrat çözeltileri kullanılmıştır. Bununla birlikte, farklı metal:ekstrakt oranları (1:5 ve 1:10) kullanılarak da sentezler yapılmıştır. Optimum reaksiyon süresi reaksiyonun 5. dakikasından 120. dakikasına kadar çeşitli aralıklarla alınan örneklerin UV-Vis Spektrofotometresi ile absorbans ölçümleri ile belirlenmiştir. Ayrıca, ideal NP sentezi için pH optimizasyonu da yapılmıştır (pH: 9, 10, 11, 12). Reaksiyonun tamamlandığı koşullar UV-Vis Spektrofotometresi kullanılarak nanoparçacıklara ait absorbans takibi ile tespit edilmiştir.

ZnO NP'lerinin sudaki çözünürlüğünün düşük olması sebebi ile NP'lerin yüksek biyoyumlulukta olan polietilen glikol çözeltisi (PEG) ve HEPES tampon çözeltisi gibi çözücüler içerisindeki çözünürlükleri test edilmiştir. Uygun çözücü ortamı bulunurken elde edilen ZnO NP tozları miligram seviyelerinde tartılarak, belirli derişimde ve pH'daki çözücülerin içerisinde çözölmüştür.

3.1.3. ZnO NP'lerin karakterizasyonu

Sentezlenen NP'lerin oluşumu UV-Vis (Agilent Technologies Cary 60) cihazı kullanılarak ölçölen ZnO'e ait karakteristik absorpsiyon pikleri ile takip edilmiştir. NP'lerin boyut ve şekil analizi alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM, ZEISS GeminiSEM 500) görüntölemesi ile yapılmıştır. Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX, ZEISS GeminiSEM 500) analizi ile örneğin bileşimi analizi edilmiştir. Oluşan NP'lerin kristal yapıları XRD (PANalytical EMPYREAN) spektrumu ile belirlenmiştir. FT-IR (Thermo Scientific – Nicolet iS20) spektrometresi ile bitki ekstraktının ve NP'lerin yapısal analizi yapılmıştır. NP'lerin HEPES ortamındaki süspansiyonunun yüzey yükleri Zeta Potansiyel (Micromeritics – Nanoplus 3) analizi ile belirlenmiştir.

3.1.4. *Trogoderma granarium*'un yetiştirilmesi

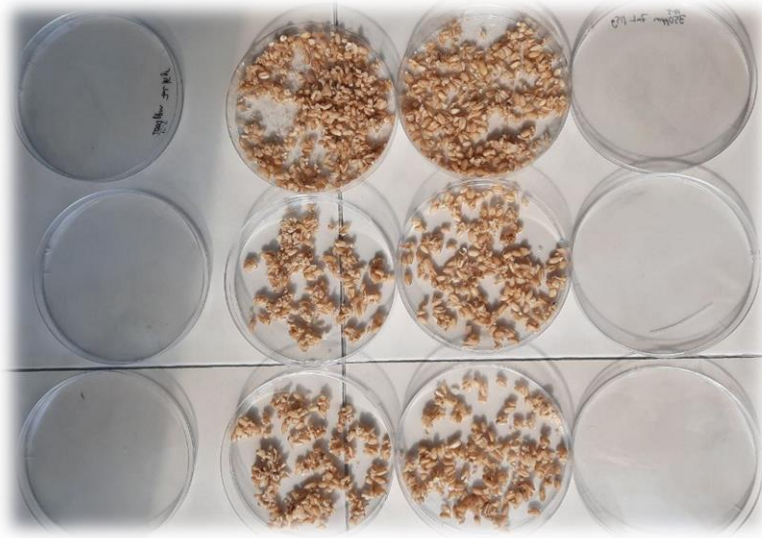
Trogoderma granarium böcekleri kültüre alınmadan önce beslenecekleri buğday, 55 °C'de 6 saat süre ile etüvde tutularak muhtemel bir kontaminasyona karşı steril edilmiştir. Kültür kaplarının kapaklarına küçük delikler açılarak havalandırma sağlanmıştır (Şekil 3.4). Ardından, yüz adet son dönem larva 500 gr steril buğday içeren, kapağında delikler bulunan plastik bir kaba (27cm x 17cm x 5cm) konularak 35±1 °C sıcaklıkta ve %65 ± 5 bağıl nemde etüvde tutulmuştur. Oluşturulan kültürlerden pupalar toplanarak, yeni çıkan erginler ile NP biyoassay deneyleri yapılmıştır. Kültürden, ayrıca, toplanan ergin böcekler yumurta bırakmaları için ayrı kaplarda buğday üzerine alınmıştır. Larvalar, yumurtadan çıkışın yaklaşık beşinci gününde, yani üçüncü dönemde iken, NP biyoassay deneylerinde kullanılmak üzere toplanmıştır (Kulkarni ve ark., 2015). Larvaların üçüncü döneminin seçilmesinin sebebi dört ve beşinci döneme kıyasla daha az dirençli olmalarıdır (Mohammed ve ark., 2019). Ayrıca, üçüncü dönem larvaların dördüncü dönem larvaya geçişi ortalama 7,5 gün sürmektedir. Bu da bu larval dönemi, biyoassay deneyleri için uygun kılmıştır (Kulkarni ve ark., 2015).



Şekil 3. 4. Kapa böceklerinin yetiştirildiği kültür ortamı.

3.1.5. ZnO NP ile besleme biyoassayı

Bu aşamada, ZnO NP'lerin farklı derişimleri kapra böceğinin üçüncü dönem larva ve erginlerinde ölümcül dozlar (Lethal Concentration (LC) / Letal Konsantrasyon) belirlemek üzere uygulanmıştır. 500 ppm ZnO NP'nin 2 ml'si petriler üzerine 200 µl halinde damla damla eklenerek, 7 g buğday ile karıştırılmıştır. ZnO NP'nin buğday üzerine homojen bir şekilde yayılabilmesi için, petriler içerisindeki buğday karıştırılmış ve 35°C sıcaklıkta etüvde takip edilerek kurumaya bırakılmıştır. Aynı uygulama kontrol grubu için yapılmış, ancak ZnO NP yerine 0.1 M pH:6 HEPES solüsyonu kullanılmıştır. Her iki uygulama da, üç farklı tekrar içermiştir. 20 adet larvanın bırakıldığı uygulama petrilerinde, ölüm oranları 12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat sonunda kaydedilmiştir. Yukarıda verilen sürelerden sonra muamele ve kontrol grubundaki larva ve erginler sayılarak, LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri belirlenmiştir.



Şekil 3. 5. Besleme deneylerinin gerçekleştirildiği petriler.

3.2. Yeşil Sentezlenmiş ZnO NP'lerin *Trogoderma granarium* Üzerindeki Etkisinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi

Katalaz (*TgCAT*), Isı şoku proteini 60 (*Hsp60*) ve Isı şoku proteini 68 (*Hsp68*) genlerinin ifade düzeyleri, Kantitatif eş zamanlı PCR (RT-qPCR) yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bunun için, besleme biyoassay çalışmaları tekrar edilip, belirtilen süre sonunda

larva ve ergin böcekler toplanarak, içerisinde NucleoZOL (Machery-Nagel GmbH, Düren, Almanya) bulunan mikrosantrifüj tüplerine RNA izolasyonu için hızlıca aktarılmıştır.

3.2.1. RNA izolasyonu

500 ppm ZnO NP'ler ile muamele edilmiş, belirli süreler sonunda (12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat) toplanan larva ve ergin örnekleri ve kontrol örneklerinden toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. Toplanan larvalar ve ergin böcekler 500 µL solüsyon içeren mikrosantrifüj tüplerinde, tüplere uyumlu havaneli yardımı ile homojenize edilmiştir. 15 s çalkalamayı takiben, 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilen örnekler, 12000 g'de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Pelletler atılarak içerisinde RNA'nın bulunduğu süpernatantlar, temiz mikrosantrifüj tüplerine transfer edilmiştir. Daha sonra izopropanol eklenerek RNA'lar çöktürülerek pellet haline getirilmiştir. Tüpün tabanında görünür hale gelen RNA pelletleri 500 µL %75 etanol ile yıkandıktan sonra, 3 dk 8000 g'de santrifüj edilmiş, bu işlem iki kere tekrarlanmıştır. Son aşamada, pelletler üzerine RNaz içermeyen ultra saf su eklenerek dilüe edilmiş ve RNA'ların miktarı ve saflığı Multiskan GO µDrop Spektrofotometre (Termo Fisher Scientific, MA, ABD) cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.2. cDNA sentezi

RNA'lar izole edildikten sonra OneScript® Plus cDNA Sentez Kiti (ABM Good, Kanada) prosedürü uygulanarak RNA'lardan cDNA sentezi yapılmıştır. Kit içerisinde bulunan cDNA sentezi öğeleri; 1 µl OneScript® Plus RTase, 1 µl Oligo - dT primer, 4 µl 5X RT tamponu, 1 µl dNTP'den oluşmaktadır ve 1 µg RNA da eklenerek reaksiyon son hacmi 20 µl olacak şekilde kalan hacim ddH₂O ile tamamlanmıştır. cDNA'lar, 15 dk boyunca 55 °C'de ve 5 dk boyunca 85 °C'de inkübasyon aşamaları ile sentezlenmiş ve tüpler buz üzerinde şoklanarak reaksiyon sonlanmıştır. Üretilen cDNA'ların miktar ve saflık ölçümü Multiskan GO µDrop Spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiş, örnekler gen ifade analizi yapılana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. cDNA kütüphanelerinden detoksifikasyon enzim genleri için primer tasarlanması

TgCAT, *TgHsp60* ve *TgHsp68* ve internal kontrol gen β -aktin (*TgACT*) kodlayan dört adet gen, *T. granarium*'un geçmişte oluşturulmuş cDNA kütüphanesinde tespit edilmiştir (Dağeri, 2022). Primerler, Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) yazılımından faydalanılarak hazırlanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılması için tasarlanan primerler.

Gen	Primerlerin Dizisi (5'-3')
<i>TgCAT</i>	F: GTCTGGAACCGACCCCGATT R: GTGCGGCCACACTTTTGTCA
<i>TgHSP60</i>	F: CTTCTGGTGTGCGCTCATTAT R: CATACCACCCATGCCAGTT
<i>TgHSP68</i>	F: ACTCCTCTGTCTCTGGAATAG R: GGTGAAGGTCTGTGTCTGTTT
<i>TgACT</i>	F: ATGGCGTGTGGCAAAGCGTAA R: CCTTCAACACACCAGCTATGT

3.2.4. Kantitatif eş zamanlı PCR (RT - qPCR)

ZnO NP'ler ile muamele edilmiş larva, ergin böcekler ve kontrol gruplarında RT - qPCR çalışmaları, QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems) cihazı kullanılarak, gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar toplamda 20 µl hacimde, FastStart Essential DNA Green Master (Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2).

RT - qPCR çalışma prensibine göre; 95 °C'de 10 dk süreyle bir ön inkübasyon aşamasını takiben 95 °C'de 10 s tutulmuştur. Ardından primerlere göre değişen spesifik bağlanma sıcaklıklarında 10 s, 72 °C'de 10 s boyunca 40 döngü tamamlandıktan sonra 40 °C'de 10 s boyunca soğutma aşaması gerçekleştirilmiştir. Üreticinin talimatına göre her bir çalışmanın ardından, çoğaltılan her fragmentin yapısındaki bütünlüğü doğrulamak ve kontaminasyon riskinin kontrolünü gerçekleştirmek için erime eğrisi analizleri yapılmıştır.

Çizelge 3. 2. RT- qPCR çalışmalarında kullanılan bileşenler.

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

Her reaksiyon üç biyolojik ve üç tekniksel tekrar içermektedir. *TgCAT*, *TgHsp60* ve *TgHsp68* hedef genlerinin ifade seviyelerinin hesaplanmasında bağıl nicel yöntem olan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ kullanılmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

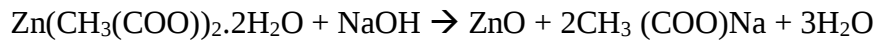
3.2.5. İstatistiksel hesaplamalar

Minitab 19.0 (Minitab Ltd, Brandon Court, Birleşik Krallık) yazılımı kullanılarak istatistiksel değerlendirme yapılırken, gerçekleştirilen çalışmalar arasındaki istatistiksel anlamlılık derecelerinin belirlenmesi için, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Bu analizlerin ardından Tukey HSD (Honestly Significant Difference) testi yapılmıştır. 0.05'ten küçük olan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

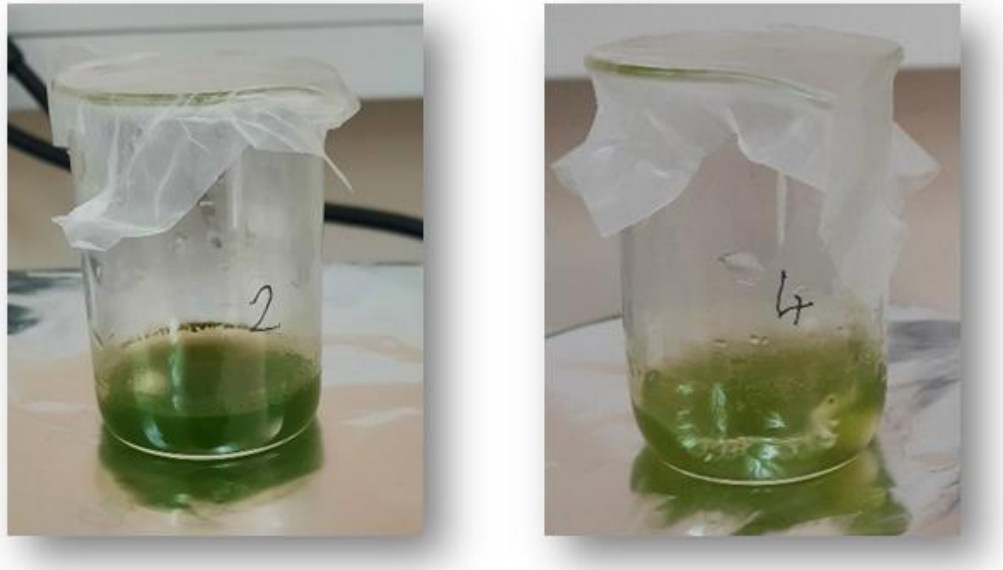
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. ZnO NP'lerin Sentezi

Bu çalışmada ZnO NP'lerin sentezinde kereviz (*Apium graveolens* L. var. *dulce*) bitkisinin biyoindirgeyici ve kaplayıcı özelliğinden faydalanılmıştır. Reaksiyon mekanizması önce çinko asetat ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) bileşiklerinin bazik ortamda Zn^0 atomuna indirgenmesi, daha sonra çekirdek büyümesi ile birlikte ZnO NP'lere dönüşmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir.



Kereviz bitkisinin indirgeme ve kaplama potansiyelinin saptanması için bir dizi optimizasyon deneyi yapılmıştır. Optimize edilen sentezde ise renk zamanla koyu yeşilden açık yeşile dönmüştür (Şekil 4.1).



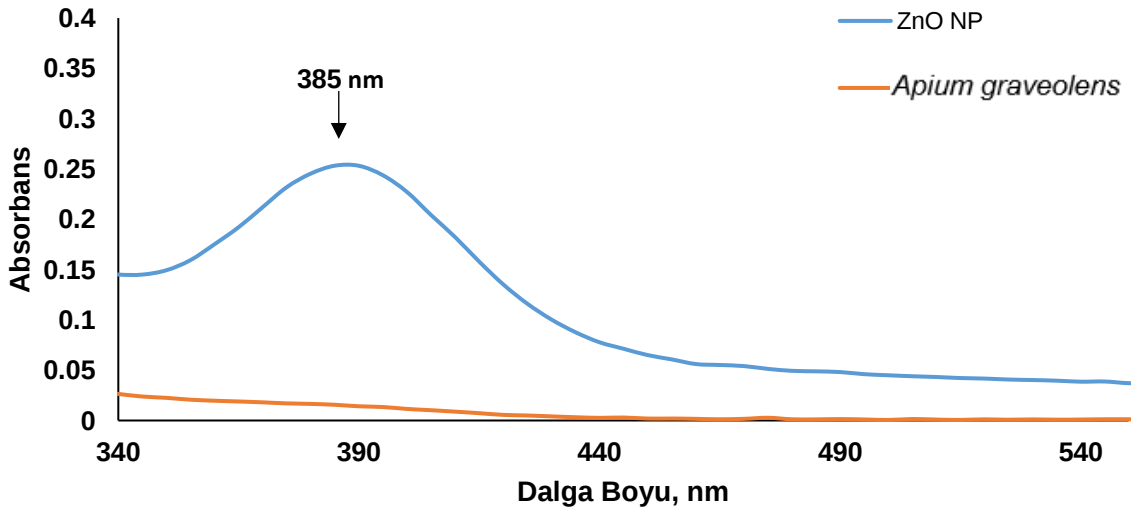
Şekil 4. 1. ZnO NP'lerin sentez öncesi (sol), sentez sonrası (sağ) renk değişimleri.

Daha sonra NP peleti 800 °C'de 2 saat boyunca kalsine edilmek üzere yakılmıştır. Böylece ZnO oluşumu stabilize edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Kalsinasyon işleminden sonra elde edilen ZnO NP'ler.

Elde edilen toz halindeki ZnO NP'ler HEPES tamponunda çözülerek, UV-Vis spektroskopisi ile ZnO'ya ait absorpsiyon piki incelenmiştir (Şekil 4.3).



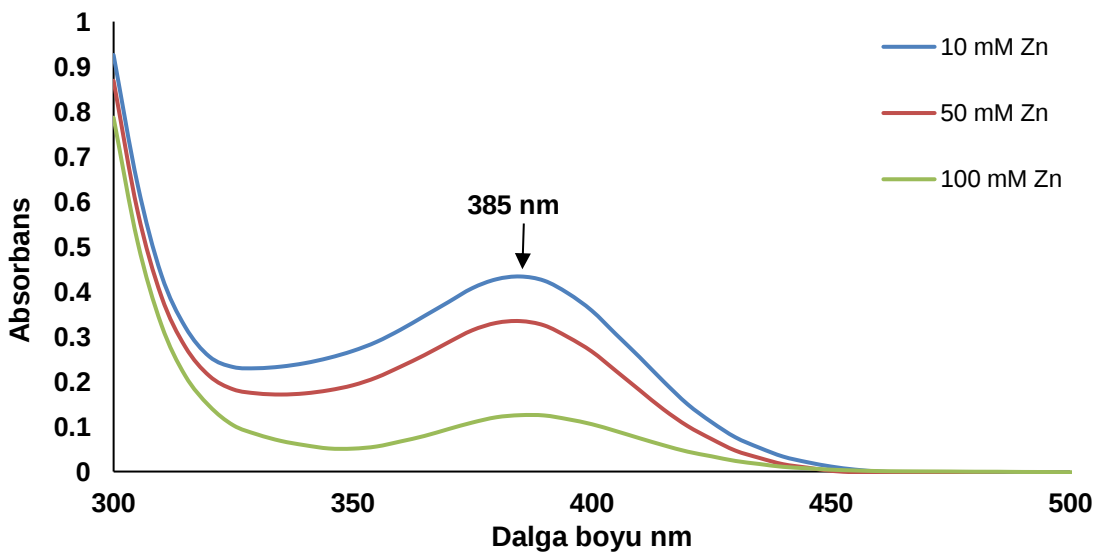
Şekil 4. 3. ZnO NP'lerin (mavi) ve *Apium graveolens* L. var. *dulce* ekstraktının (turuncu) UV - Vis absorpsiyon spektrumları.

Görülen spektrumlardan mavi renkte olan spektrum bandı, *A. graveolens* L. var. *dulce* ekstraktı kullanılarak hazırlanan ZnO NP'ye aittir ve maksimum absorpsiyon piki 385 nm'de gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). NP'lerin absorpsiyon dalgalıboyları parçacık boyutuna göre değişiklik göstermesine rağmen, çinko için spesifik UV-Vis absorpsiyon bantları 360-390 nm arasındadır (Mohammadian, 2018; Goh ve ark., 2014).

4.2. ZnO NP'lerin Sentezinde Yapılan Optimizasyonlar

Sentezlenen NP'lerin boyutu, morfolojisi, bileşimi ve biyoyumluluğu özellikle biyomedikal ve biyoteknoloji alanlarında hücre, doku ve organizmaların biyolojik aktiviteleri üzerinde gerçekleştireceği potansiyel etkiler açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle NP'lerin monodispers, biyoyumlu, küçük boyutlara sahip ve kararlı olması gerekmektedir (Shahzad ve ark., 2021). Sentezde kullanılan ekstraktın hacmi, çözeltinin konsantrasyonu, reaksiyon karışımı, pH'ı ve reaksiyon sıcaklığı da önem arz eden parametreler arasında yer almaktadır (Zeng ve ark., 2020).

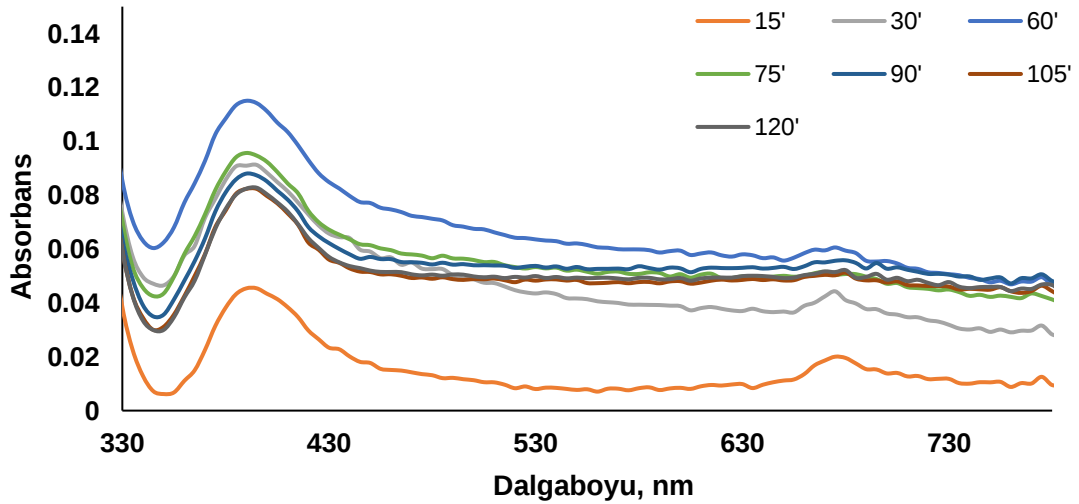
Optimizasyonlar gerçekleştirilirken her defasında bir parametre değiştirilmiştir ve diğer parametreler (pH, sıcaklık, çinko asetat derişimi ve sentez süresi) sabit tutulmuştur. Bitki ekstraktının konsantrasyonu NP sentezinde önemli bir parametredir (Jameel, ve ark., 2020). Düşük oranda ekstrakt kullanımı tanecik oluşumunu sağlamazken, yüksek oranda kullanılan ekstrakt, sentezde çökmeye neden olmuştur. Metal:Ekstrakt hacim oranları 1:1, 5:1, 10:1, 15:1 (hacim:hacim) olarak çalışılmıştır. Sonuç olarak, optimum ekstrakt oranı 10:1 olarak belirlenmiştir. İkinci parametre olarak, çinko iyonu derişimi çalışılmıştır. Üç farklı çinko derişimi (10, 50 ve 100 mM) ile 10:1 ekstrakt oranında sentezler gerçekleştirilmiştir ve örneklere ilişkin UV-Vis spektrumları kaydedilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4. Farklı Zn^{2+} derişimlerinde sentezlenen ZnO NP'lerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları.

10 mM çinko çözeltisi kullanılarak yapılan sentezde, ZnO'ya ait 385 nm'deki absorpsiyon pikinin diğer kullanılan derişimlere göre artması ile nano oluşumun daha fazla olduğu ve derişimin artması ile daha büyük nanoparçacıkların oluştuğu ve bunun sonucu olarak aglomere olup çöktükleri sonucuna varılmıştır (Zheng ve ark., 2013). Senteze, 10 mM çinko çözeltisi ile devam edilmiştir.

NP sentezinde reaksiyon süresinin optimizasyonu önemlidir; çünkü reaksiyon süresi, üretilen NP'lerin boyutunu ve şeklini etkilemektedir ve reaksiyon süresinin optimize edilmesi ile NP'lerin küçük boyutlu ve homojen dağılımlı olmaları sağlanabilmektedir (Al-Radadi, N. S., 2019; Nishanthi ve ark., 2019). Genel olarak, reaksiyon süresi optimizasyonu, NP'lerin sentez verimini artırmaya da yardımcı olmaktadır (Vedelago ve ark., 2018). Bunun için, diğer reaksiyon parametreleri sabit tutularak, sentezin 5. dakikasından 120. dakikasına kadar her 15 dakikada bir alınan örneklerin absorpsiyon ölçümü gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5).

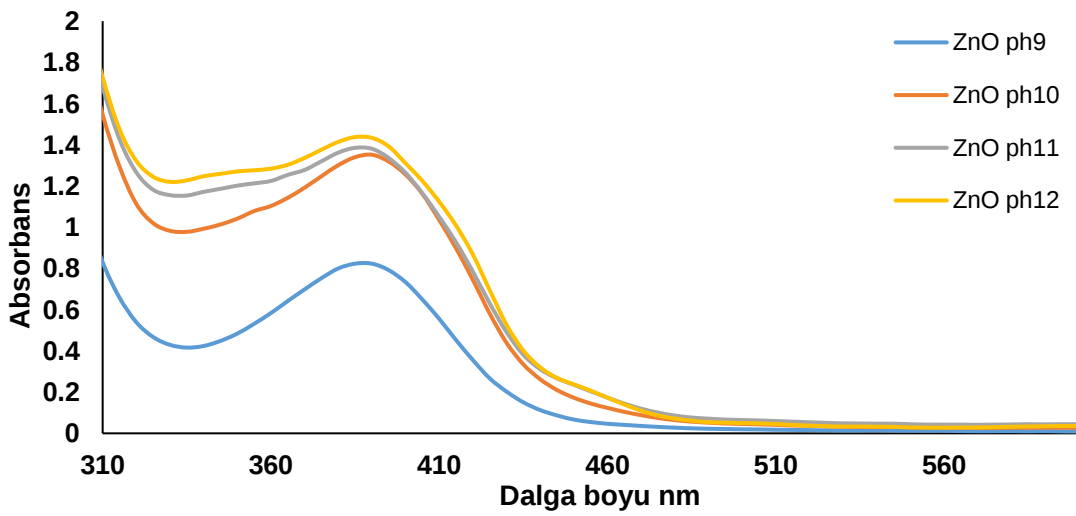


Şekil 4. 5. Farklı reaksiyon sürelerinde sentezlenen ZnO NP'lerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları.

Optimum reaksiyon süresi 60 dk olarak belirlenmiştir. Reaksiyon ortamının pH değeri, NP'lerin stabilitesini ve sentez verimini etkilemesinden ötürü önemlidir (Alias ve ark., 2010). Bu etki, pH arttıkça çekirdeklenme merkezlerinin gelişimindeki artışa neden olarak NP boyutunun büyümesine neden olmaktadır (Velgosová ve ark., 2016). Metal iyonlarının metal NP'lere indirgenmesi, çekirdeklenme merkezinin genişlemesiyle eşzamanlı olarak artmaktadır. Çözelti pH'ı bitki ekstraktındaki

fonksiyonel grupların aktivitesini kontrol ederek, metal öncülünün indirgenme oranını belirlemektedir (Jameel ve ark., 2020). Bu yüzden pH optimizasyonu önemlidir.

pH optimizasyonunda ideal ve küçük boyutta NP elde etmek için sentezin gerçekleşmesi gereken ortamın bazik olması gerekmektedir. Bundan dolayı sentezlerde pH:9, pH:10, pH:11 ve pH:12 değerleri denenmiştir. Bu tezde en kararlı NP'lerin pH:12'de gerçekleştirilen sentez sonucu elde edildiği, UV - Vis bölge analizi ile tespit edilen en dikkat çekici pik aracılığı ile anlaşılmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6. Farklı pH'de sentezlenen ZnO NP'lerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları.

Elde edilen spektrumlara göre, en kararlı ZnO NP'lerin pH:12'de gerçekleştirilen sentez sonucu elde edildiği görülmüştür.

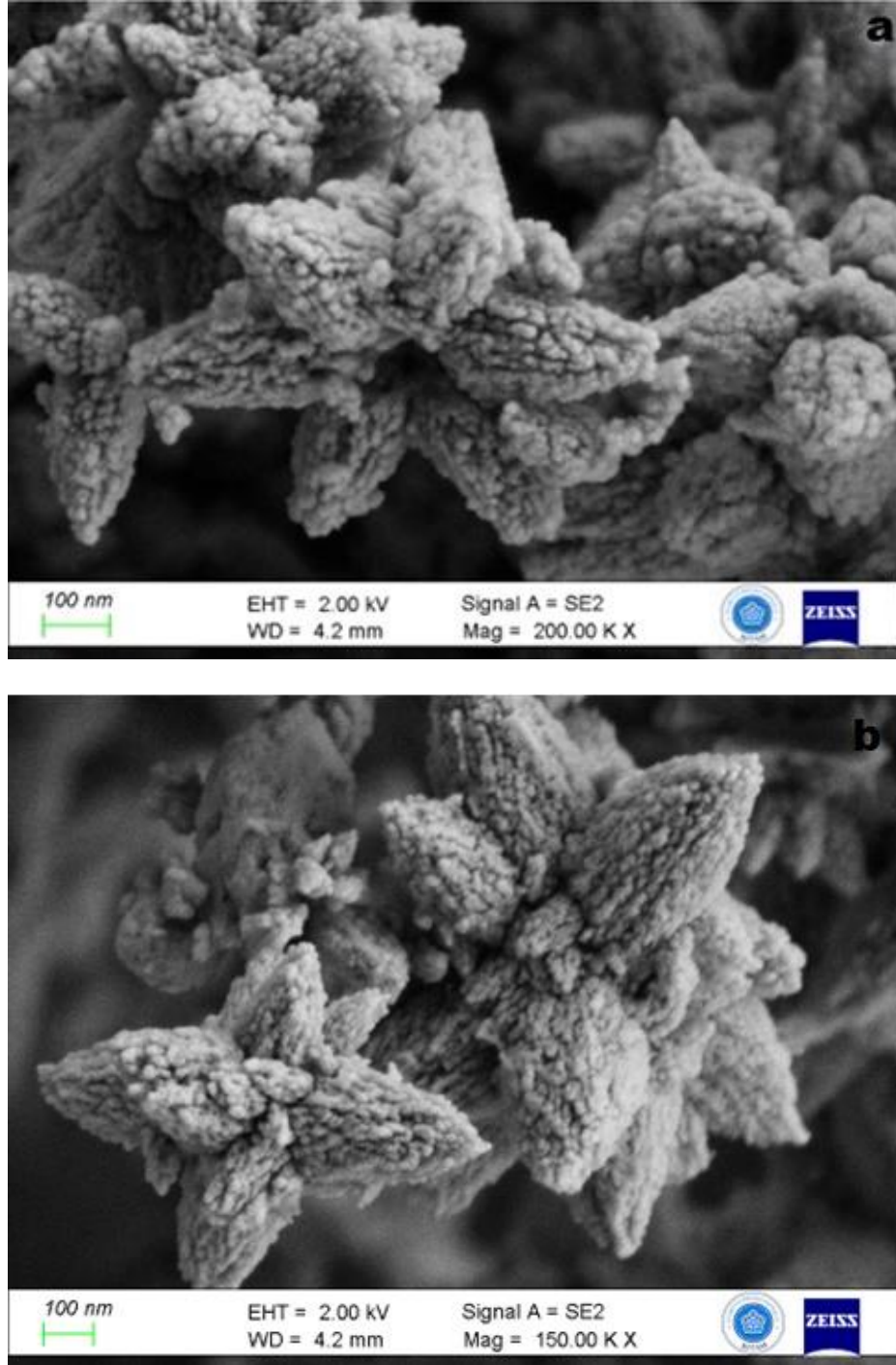
Sonuç olarak bu çalışmada; optimum sentez koşulları; Zn^{2+} derişimi: 10 mM ve çinko:ekstrakt oranı: 10:1, reaksiyon sıcaklığı: oda sıcaklığı, reaksiyon pH'sı:12 ve reaksiyon süresi: 60 dk olarak belirlenmiştir.

4.3. ZnO NP'lerin Karakterizasyon Çalışmaları

Apium graveolens L. var. *dulce* ekstraktı kullanılarak, UV-Vis spektroskopisi kullanılarak optimize edilmiş reaksiyon parametreleri kullanılarak yeşil yolla sentezlenmiş ZnO NP'lerin karakterizasyon çalışmaları için FESEM, EDX, XRD, FTIR, ve Zeta Potansiyeli ölçümü gibi mikroskopik ve spektroskopik yöntemler kullanılmıştır.

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

TEM, NP'lerin görüntülenmesinde atomik ölçeğe kadar yüksek çözünürlükte görselleştirmeye izin verdiği için, boyut analizinde temel araçlardandır. ZnO NP'lerin yapısının ve boyutunun analiz edilmesinde TEM kullanılmıştır (Şekil 4.7 (a-b)).

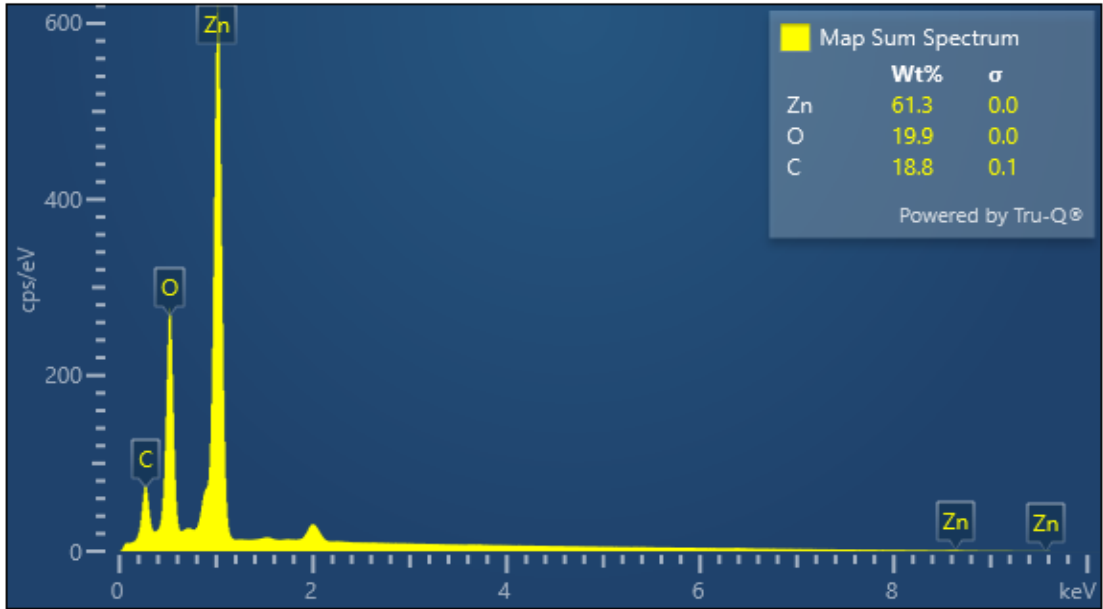


Şekil 4. 7. Yeşil ZnO NP'lerin TEM görüntüleri.

ZnO NP'lere ait TEM görüntülerinden, nano çiçek oluşumunun gerçekleştiği görülmüştür. Örneğe ilişkin farklı bölgelerden birden fazla görüntü alınarak, yapının nano çiçek şeklinde meydana geldiği doğrulanmıştır. Literatürde de ZnO'nun çiçek şeklinde nano oluşumları gözlemlenmiştir (Pachauri ve ark., 2006; Du ve ark., 2014).

4.3.2. ZnO NP'lerin Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) analizi

ZnO NP örneğinden 10 µL alınarak karbon bant üzerine damlatılmış ve 4.30 nm kalınlığında iridyum kaplama yapılmış ve Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskopisi (FESEM) cihazı kullanılarak EDX analizi ile örneğin bileşimi gözlemlenmiştir.(Şekil 4.8).

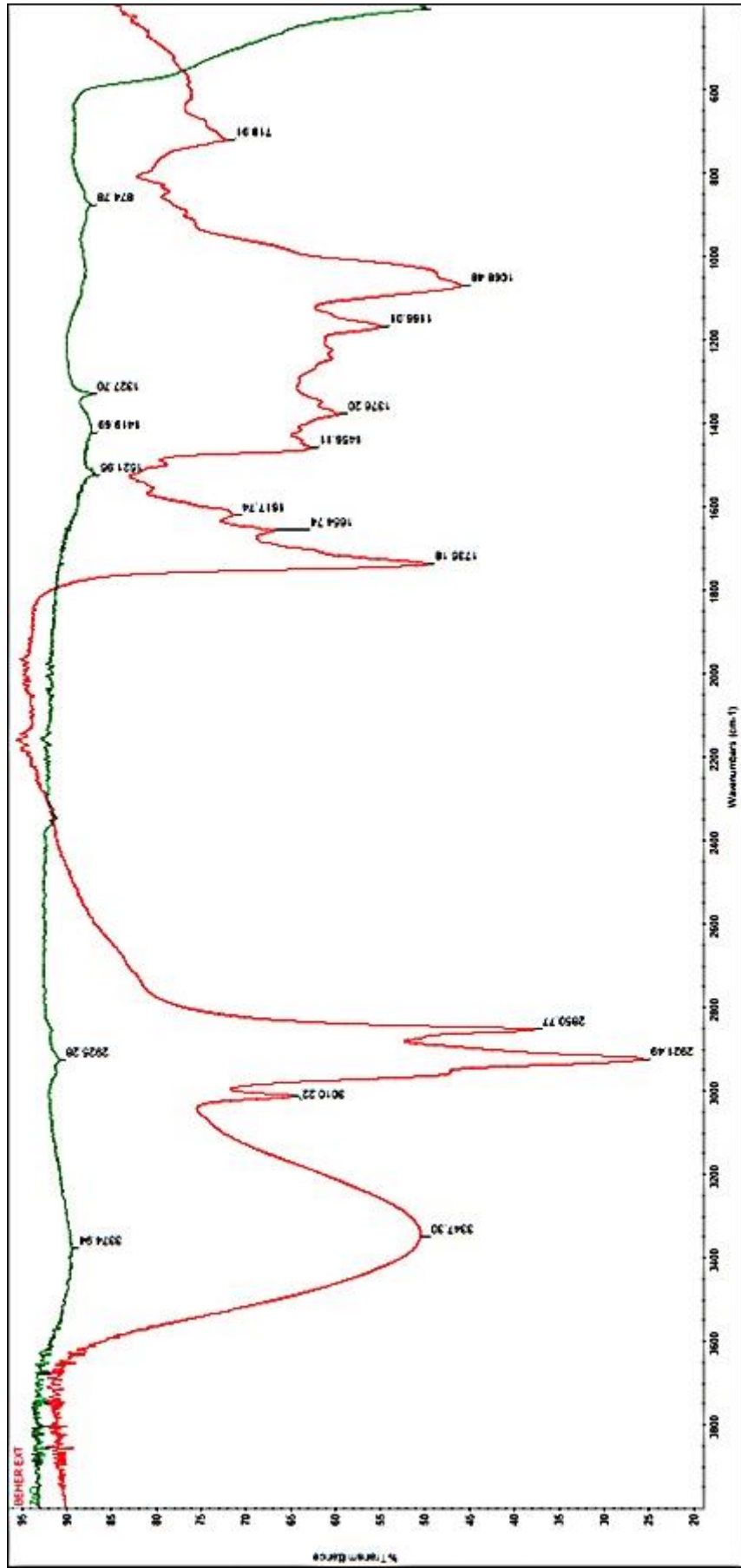


Şekil 4. 8. ZnO NP'lerin EDX Analizi.

ZnO NP'ye ait EDX spektrumundan, örneğin Zn ve O içeriği gösterilmiştir. Spektrumdaki C bandı ise örneğin damlatıldığı karbon banttan ileri gelmektedir.

4.3.3. ZnO NP'lerin Infrared Spektrometresi (FTIR) ile yapısal analizi

FTIR, NP'lerin fonksiyonel gruplarını tanımlamak, diğer bileşenlerle etkileşimlerini incelemek için kullanılan önemli bir tekniktir. Sentezlenen ZnO NP örneklerinin FTIR spektrumları, 400 - 4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında alınmıştır ve bitki ekstraktı ile üst üste çakıştırılarak analiz edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4. 9. *Apium graveolens* L. var. *dulce* ekstraktı (kırmızı) ve ZnO NP'ye (yeşil) ait FTIR spektrumları.

Örneklere ait FTIR spektrumunda gözlenen bantların dalga sayıları; ZnO NP'ler için, 3374.94, 2925.28, 1521.95, 1419.69, 1327.70, 874.78 cm^{-1} olarak tespit edilmiştir. *A. graveolens* L. var. *dulce* ekstraktı için ise; 3347.30, 3010.22, 2921.49, 2850.77, 1735.18, 1654.74, 1617.74, 1456.11, 1376.20, 1166.01, 1068.48, 718.91 cm^{-1} olarak gözlemlenmiştir. Bantların karşılık geldiği fonksiyonel gruplar çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.1).

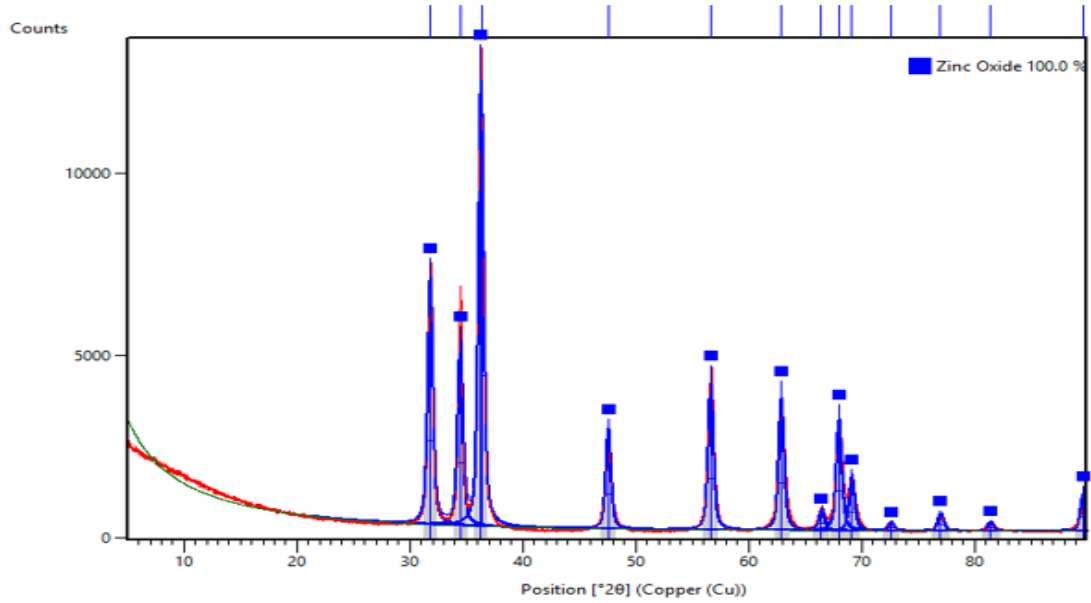
Çizelge 4. 1. FTIR spektrumunda gözlenen bantların dalga sayıları ve karşılık geldiği fonksiyonel gruplar.

Dalga sayısı (cm^{-1})	Bağ türü	Fonksiyonel gruplar	Kaynak
3200-3600	O-H	Alkol (asit)	(Marselia ve
2850-2970	C-H	Alkanlar	ark., 2021;
1610-1680	C=C	Alkinler	Kamli ve ark.,
1450-1550	N-H	Birincil amidler	2021;
1300-1450	N-O	Nitro	Luque ve ark.,
1150-1250	C-O	Eterler	2022).
1000-1050	C-O	Alkol	
800-900	1 C-H düzlem dışı	Aromatikler	
600-800	1 C-H düzlem dışı	Aromatikler	
552-417		Çinko Oksit	

Apium graveolens L. var. *dulce* ekstraktının spektrumunda gözlemlenen fonksiyonel gruplar, ZnO NP'ye ilişkin spektrumda da gözlemlenmiştir. Bu sonuç ZnO NP'lerin belirtilen ekstrakt ile sentezlendiğini göstermektedir. Ancak, ZnO NP'ler sentez prosedüründe bulunan kalsinasyon işlemine tabi tutuldukları için, içeriğinde bulunan ekstrakt bileşenlerinin de kalsinasyon sıcaklığında uçuculaştıkları bilinmektedir. Dolayısıyla ilgili fonksiyonel gruplarının bant şiddetlerinde azalma görülmüştür. Literatürde ZnO NP'lere ilişkin tipik FTIR bantları 552-417 cm^{-1} aralıklarında görülmektedir. Sentezlenen ZnO NP'lere ilişkin bant ise 400-450 cm^{-1} aralığında gözlemlenmiştir (Labhane ve ark., 2015).

4.3.4. ZnO NP'lerin X-Işını Difraksiyonu (XRD) analizi

XRD analizi, malzemelerin kristal yapısını incelemek için kullanılan bir tekniktir. Sentezlenen ZnO NP'lerin kristal yapısı ve saflığı XRD analizi ile aydınlatılmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10. ZnO NP örneğinin XRD spektrumu.

Elde edilen XRD spektrumu için yapılan Rietveld analizi ile örneğin kristal yapısının %100 ZnO'ya ait olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.10). Ayrıca spektrumda gözlemlenen piklerin 2θ açıları ve hkl indeksleri Şekil 4.11'de verilmiştir.

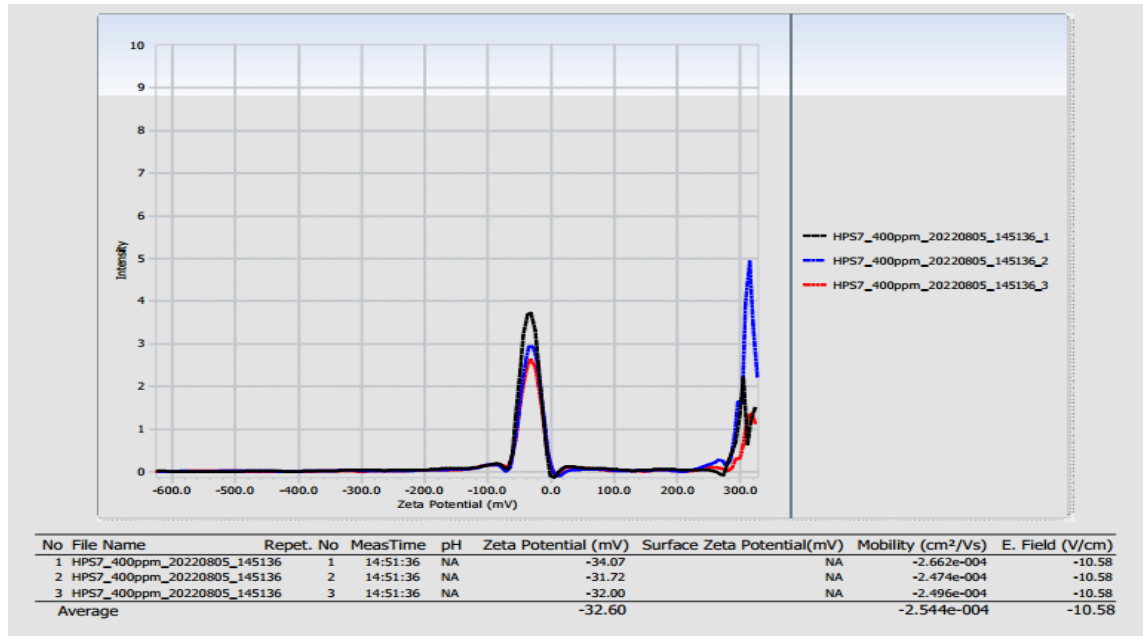
No.	Pos. [°2θ]	d-spacing [Å]	Height [cts]	FWHM Left [°2θ]	FWHM Right [°2θ]	Shape L	Shape Right	Integral Breadth [°2θ]	Area [cts*°2θ]	h	k	l
1	31.8423	2.80809	4776.57	0.5326		0.600		0.702831	3357.12	1	0	0
2	34.4865	2.59860	3811.78	0.5326		0.600		0.702831	2679.04	0	0	2
3	36.3225	2.47134	8696.20	0.5326		0.600		0.702831	6111.96	1	0	1
4	47.5958	1.90899	1997.73	0.5326		0.600		0.702831	1404.07	1	0	2
5	56.6493	1.62350	2649.23	0.5326		0.600		0.702831	1861.96	1	1	0
6	62.8949	1.47647	2747.68	0.5326		0.600		0.702831	1931.15	1	0	3
7	66.4203	1.40640	348.96	0.5326		0.600		0.702831	245.26	2	0	0
8	67.9861	1.37777	2043.18	0.5326		0.600		0.702831	1436.01	1	1	2
9	69.1269	1.35779	941.57	0.5326		0.600		0.702831	661.76	2	0	1
10	72.5868	1.30136	199.72	0.5326		0.600		0.702831	140.37	0	0	4
11	76.9882	1.23756	311.82	0.5326		0.600		0.702831	219.15	2	0	2
12	81.3961	1.18131	195.81	0.5326		0.600		0.702831	137.62	1	0	4
13	89.6196	1.09300	701.30	0.5326		0.600		0.702831	492.89	2	0	3

Şekil 4. 11. ZnO NP örneğinin XRD spektrumuna ait piklerin 2θ açıları ve hkl indeksleri.

ZnO NP'lere ilişkin XRD spektrumunda gözlemlenen piklerin 2θ açıları: $\sim 32^\circ$, 34° , 36° , 48° , 57° , 63° , 66° , 68° , 69° ve 77° literatür ile uyum içerisinde ve ZnO kristal yapısına karşılık gelmektedir (Barzinjy ve ark., 2020; Jalal ve ark., 2010).

4.3.5. ZnO NP'lerin Zeta Potansiyel analizi

ZnO NP'lerin sudaki çözünürlüğünün düşük olması nedeni ile NP'leri çözebilmek için biyouyumlu bir çözücü olarak 0,1 M HEPES tampon çözeltisi (pH: 7) seçilmiştir. ZnO NP'lerin bu tampondaki yüzey yükleri ve kararlılığı zeta potansiyeli analizi ile gösterilmiştir (Şekil 4.12).



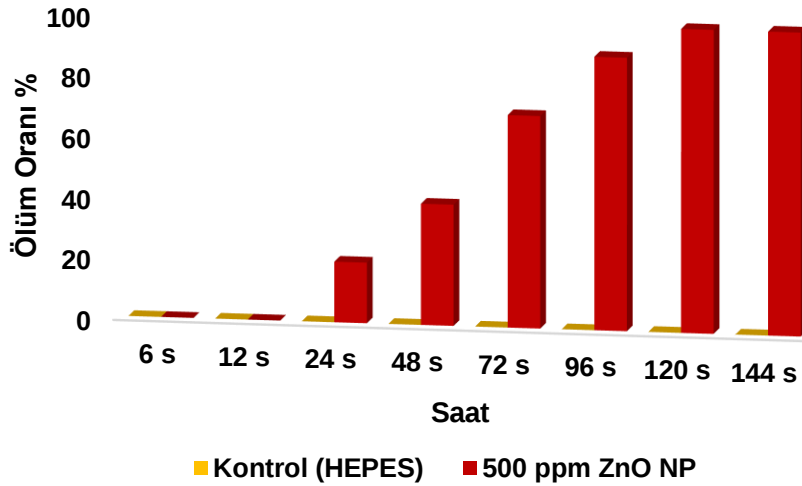
Şekil 4. 12. ZnO NP'lerin Zeta Potansiyel Analizi.

Zeta potansiyeli ± 30 mV ve üzeri değerler, süspansiyonlarda kararlılığı gösteren bir değerdir. ZnO NP'lerinin HEPES tamponundaki zeta potansiyeli ortalama -32,60 mV olarak ölçülmüştür. Bu değer ile ZnO NP'lerinin HEPES tamponu ortamında aglomere olmadan çözülebildiği ve stabil kalabildiği gösterilmiştir (Clogston ve Patri, 2011; Honary ve Zahir, 2013).

4.4. Kapra Böceğinin ZnO NP ile Besleme Biyoassayı

Kapra böceği, birçok depolanmış ürün zararlısı gibi tahıl depolarında kullanılan fumigasyona karşı direnç geliştirmiştir. Zararlı ile mücadelede kullanılan kimyasalların üretimi ve temini için gereken yüksek maliyetlerin yanı sıra, doğaya ve canlılara verdikleri zararın da önüne geçilmesi için, alternatif yöntemler araştırılmaktadır. Bu alternatif yöntemlerin başında yeşil sentezlenmiş NP'lerin üretimi ve zararlı böcekler ile mücadelede kullanımı gelmektedir.

Bu tez çalışmasında, 500 ppm derişiminde yeşil sentezlenmiş ZnO NP eklenen buğdaylar ile beslenen ergin kapralar, 12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saatler boyunca gözlenmiştir. Maruz kalınan süre ile ergin kapra ölümleri arasında korelasyon gözlenmiştir. 500 ppm derişiminde LC₅₀ değeri 48. saat sonunda gözlemlenirken, LC₉₀ değeri 96. saat itibarı ile tespit edilmiştir. Devam eden saatlerde ergin kapra ölüm oranı artmıştır. Üçüncü dönem larvalara uygulanan 500 ppm ZnO NP muamelesi sonucunda ise herhangi bir ölüm gözlenmemiştir. Böylelikle kapra üçüncü dönem larvalarının erginlere kıyasla 500 ppm dozundaki yeşil sentezlenmiş ZnO NP'lere daha dirençli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4. 13. Ergin kapra böceğinin yeşil ZnO NP'ler ile beslenmesi sonrası ölüm oranı

Kapra böceği üzerinde, NP uygulamalarını içeren gerçekleştirilmiş çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Yapılan bir araştırmada, kapra böceği ile mücadelede kullanılmak üzere ticari olarak satın alınmış, ancak yeşil yolla sentezlenmemiş ZnO

NP'nin 50, 100 ve 200 ppm konsantrasyonlarının böceğin farklı larval dönem ve erginlerine etkisi biyoassay aracılığı araştırılmıştır (Raduw ve Mohammed, 2020). 7 gün süren çalışmada, en yüksek doz olarak kullanılan 200 ppm uygulamasını takiben, erginlerde ve üçüncü dönem larvalarda gözlemlenen ölüm oranı sırası ile %12.5 ve %64 olarak kaydedilmiştir. Buradan yola çıkarak *A. graveolens* L. var. *dulce* ekstraktı kullanılarak yeşil sentezlenmiş ZnO NP'lerin 500 ppm dozunun kapra erginleri üzerindeki ölümcül etkisinin, ticari olarak satın alınmış 200 ppm ZnO NP dozuna kıyasla daha etkili olduğu sonucuna varılabilir. Yine bu iki çalışma kıyaslandığında üçüncü dönem larvalar üzerinde gözlemlenen aksi durumun ise, NP sentezi, NP konsantrasyonu vb. etkilerden kaynaklanabileceği kanısına ulaşılabılır.

Bir çalışmada, 200, 250 ve 300 ppm derişimlerinde bakır NP'ler (g - Cu NP) ile muamele edilmiş *T. granarium* erginlerinde besleme biyoassayı yapılmıştır. 144 saat boyunca gözlemlenen kapra erginlerinin ölüm oranları kaydedilmiştir. %90 ölüm oranına 250 ve 300 ppm doz uygulamalarının, 144. saatinden sonra ulaşılmıştır. Sonuç olarak, kapra böceği ile mücadelede g-Cu NP'lerin etkin bir insektisit olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Kadir, 2022).

Yapılan bir diğer çalışmada, harmala alkaloitleri kullanılarak hazırlanan gümüş nanoparçacıklar (AgNP'ler), filtre kâğıtlarına uygulandıktan sonra petrilere yerleştirilip kurutulmuştur. Kapra böceği erginleri ve ikinci dönem larvaları kurutulan petrilere yerleştirilmiş ve 24, 48 saat boyunca temas toksisitesi deneyi yapılmıştır. Sonuç olarak, böceğin ölüm oranı doza ve zamana bağlı olarak doğru orantılı bir şekilde artmışken, gelişme hızları yavaşlamıştır (Almadiy ve ark., 2018). Başka bir çalışmada ise, siliko nanoparçacıklar (SNP'ler), AgNP ve ZnO NP'ler ikinci dönem kapra larvalarına uygulanmıştır. Larvalarda NP'lere bağlı ölümler 1, 3, 5 ve 7. günün sonunda gözlemlenmiştir. 7. günün sonunda, farklı derişimlerde uygulanan NP'lerden en yüksek derişimde ölüm oranları sırasıyla; SNP'ler, AgNP'ler ve ZnO NP'ler için %92,6, %87,3 ve %60 olarak belirtilmiştir (Raduw ve Mohammed, 2020).

ZnO NP'ler, pirinç biti (*Sitophilus oryzae* L.) (Das ve Chatterjee, 2019), börölce böceği (*Callosobruchus maculatus*) (Malaikozhundan ve Vinodhini 2018; Malaikozhundan ve ark., 2017), ekin kambur biti (*Rhyzopertha dominica* F.) (Siddique ve ark., 2022), güz tırtılı (*Spodoptera frugiperda*) (Pittarate ve ark., 2021) gibi birçok zararlıya karşı etkili bir şekilde kullanılmıştır. Yine pirinç bitinde insektisit olarak

titanyum dioksit (TiO₂), alüminyum oksit (ANP) ve ZnO NP'lerin uygulanması sonucu, bu NP'ler böcek üzerinde insektisidal etki göstermiştir. Sonuçta TiO₂ ve ANP'ler daha yüksek insektisidal etki göstermelerine rağmen, ZnO NP'lerin tarımsal olarak daha az tehlikeli olduğu kaydedilmiştir. (Das ve ark., 2019). Hint kayını (*Pongamia pinnata*) ekstraktı kullanılarak hazırlanmış ZnO NP'ler, *Callosobruchus maculatus*'un larva ve pupalarında böcek gelişimini baskılayanın yanı sıra, verimlilik ve kuluçka kabiliyetini de büyük ölçüde azaltmıştır. Ayrıca, ZnO NP'ler, zararlının sindirim enzimlerinin işlevselliğini önemli ölçüde olumsuz yönde etkilemiştir (Malaikozhundan ve Vinodhini 2018).

Başka bir çalışmada pirinç biti (*Sitophilus oryzae* L.), kırmızı un böceği (*Tribolium castaneum* Herbst.) ve börülce böceği (*Callosobruchus maculatus* F.) gibi zararlılarının kontrol edilmesi için ZnO ve SiO₂ NP'ler kullanılmıştır. Çalışma sonucunda SiO₂ uygulaması ardından tespit edilen ölüm oranları böcekler için sırasıyla %58.3, %81.6 ve %98.3 olarak belirlenmiştir. ZnO NP uygulaması sonrasındaki ölüm oranları ise, sırasıyla %88.3, %100 ve %38.3 olarak bildirilmiştir (Haroun ve ark., 2020).

Bir diğer çalışmada *T. granarium* ve *T. castaneum*'a ZnO NP uygulaması yapılmıştır. Muamelede, toplanan hint yağı bitkisi (*Ricinus communis*) ve kurkas'ın (*Jatropha curcus*) yaprakları gölgede kurutulduktan sonra hazırlanan ekstraktlar NP sentezinde kullanılmıştır. Artan derişimler ile uygulanan ZnO NP'lerin etkinliği, *T. castaneum* ve *T. granarium* böceklerinde 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda araştırılmıştır. Her iki böcekte de NP'ye maruz kalınan süre arttıkça, ölüm oranının da arttığı tespit edilmiştir (Haider ve ark., 2020).

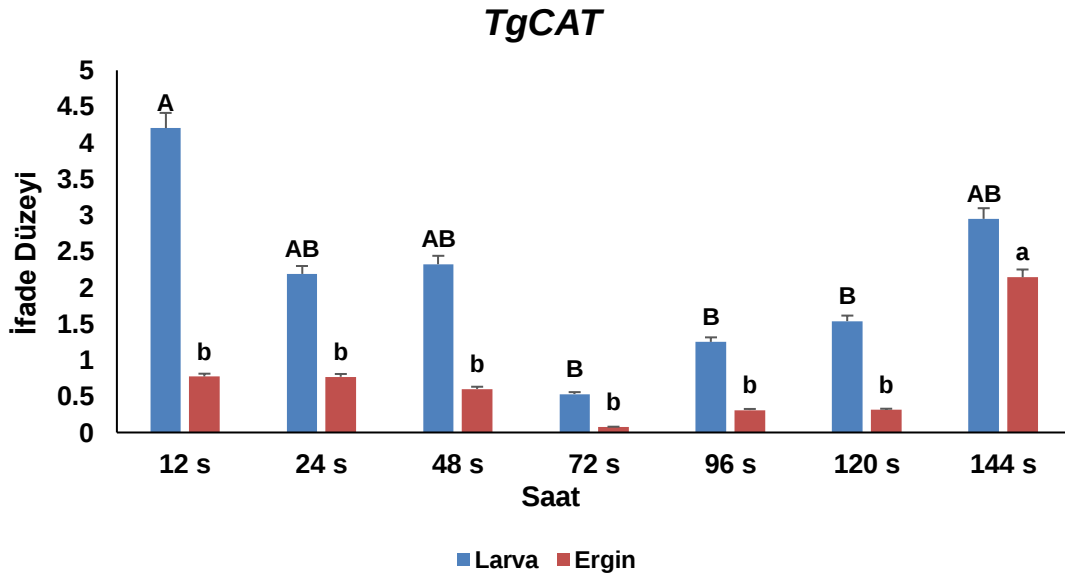
Bu tez çalışmasında da, kapra böceği ergin ölüm oranının, zamana bağlı olarak artış gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Böylece *A. graveolens* L. var. *dulce* ekstraktı kullanılarak yeşil sentezlenmiş ZnO NP'lerin *T. granarium*'a karşı insektisidal bir ajan niteliğine sahip olabileceği sonucuna varılmıştır.

4.5. Yeşil Sentezlenmiş ZnO NP Muamelesi Sonrası *TgCAT*, *TgHSP60* ve *TgHSP68* Genlerinin İfade Seviyesi Analizi

TgCAT, *TgHSP60* ve *TgHSP68* genlerinin, 500 ppm yeşil sentezlenmiş ZnO NP ile muamele edilmiş buğday taneleri ile beslenen üçüncü dönem larva ve pupadan yeni

çıkışmış *T. granarium* erginlerindeki ifade seviyeleri farklı zaman noktalarında (12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat) incelenmiştir.

En yüksek *TgCAT* ifadesi, 500 ppm konsantrasyondaki ZnO NP ile muamele edilmiş buğday taneleri ile beslenen larvalarda 12. saat itibari ile tespit edilmiştir. Bunu sırası ile 144, 48, 24, 120 ve 96. saat uygulamaları takip etmiştir. Öte yandan, uygulamanın 72. saatinden sonra *TgCAT* ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Ergin böcekte en yüksek *TgCAT* mRNA miktarı ise, 144. saat muamelesinden sonra tespit edilmiştir. Araştırılan diğer saatlerde ise, genin ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.14).



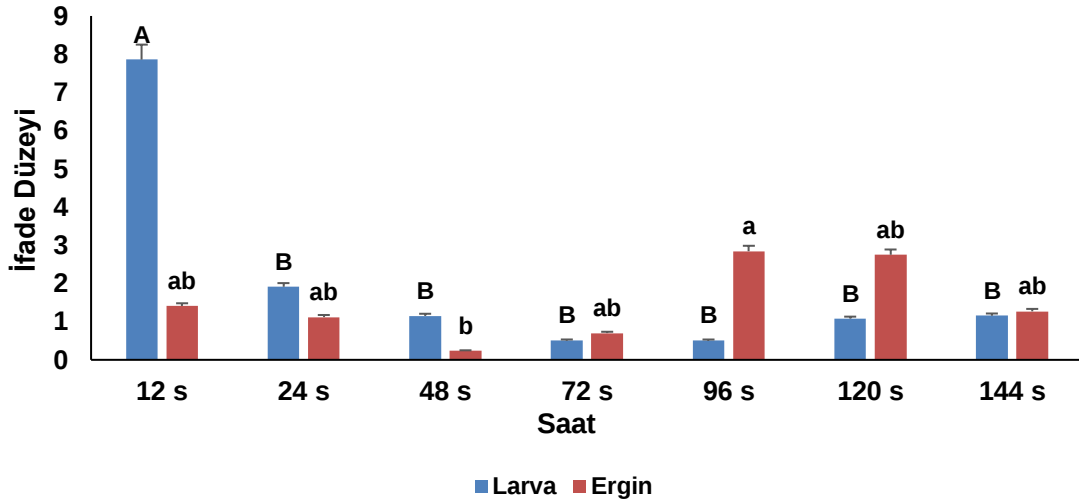
Şekil 4. 14. Yeşil ZnO NP muamelesi sonucu *TgCAT* geninin ifade seviyeleri.

Yapılan bir çalışmada farklı derişimlerdeki (200 ve 300 ppm) g - Cu NP ile muamele edilmiş *T. granarium* erginlerinde *CAT* geni ifade seviyesi, muamele sürecinde farklı zaman aralıklarında incelenmiştir. Sonuç olarak, 200 ppm derişimine maruziyet ile birlikte *CAT* geni ifadesinin en yüksek 48. saatten sonra görüldüğü ve yaklaşık 8.4 kat arttığı bildirilmiştir (Kadir, 2022). Palyaço sineği olarak bilinen (*Chironomus riparius*) bir sinek türüne 0.2, 0.5 ve 1 mg L⁻¹ derişimlerinde AgNP'ler ve Ag⁺ iyonları uygulanmıştır. 24 saatlik bir maruziyet sonrası farklı dozlarda uygulanan Ag⁺ iyonları, sineğin *CAT* gen ifade profilini değıştirmemişken, uygulanan AgNP'lerin *CAT* ifadesini artırdığı görülmüştür. *CAT* ifade seviyesini en anlamlı şekilde artıran AgNP konsantrasyonu ise 0,5 mg L⁻¹ olarak tespit edilmiştir (Nair ve ark., 2013). İpekböceğı

(*Bombyx mori* L.) orta bağırsağında ZnO NP'lere maruz kalmanın neden olduğu oksidatif hasar değerlendirilmiştir. CAT dâhil olmak üzere reaktif oksijen türlerinin (ROS) aktivitesini azaltmakla görevli diğer antioksidan genlerinin ifade seviyesinin muamele sonrası arttığı bildirilmiştir (Xu ve ark., 2020). MoS₂ (Molibden disülfid) NP'lerin muamelesinin, dokumacı karınca (*Oecophylla smaragdina*) CAT geninin ifade seviyesinde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Sheeja ve ark., 2020). Bir mantar (*Beauveria brongniartii*) suşundan sentezlenen Fe NP'lerin, pamuk yaprak kurduna (*Spodoptera litura* (Lepidoptera; Noctuidae) karşı biyo-insektisidal aktivitesi araştırılmıştır. Araştırmacılar, kontrol grubuna kıyasla, NP muamelesinin böcekteki CAT geni ifadesini önce arttığını, ardından azalttığını bildirmiştir (Xu ve ark., 2020). Bütün bu çalışmalar ışığında CAT'ın, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek, antioksidan savunmasında rol almasından yola çıkarak; ZnO NP uygulaması sonucu artan *TgCAT* ifadesinin, kapra böceğinde gelişen antioksidan tepkisinin bir biyomarkeri olduğu sonucuna varılabilir.

500 ppm konsantrasyonunda ZnO NP'ler ile muamele edilmiş buğday taneleri ile beslenen kapra larvalarında en yüksek *TgHSP60* gen ifadesi sırasıyla 12, 24, 144 ve 48. saatlerden sonra gözlenmiştir. Bu genin ifadesinin 120. saat uygulamasından sonra neredeyse duyarsız olduğu tespit edilmiştir. Buna ilave olarak, larvada bu konsantrasyonun 48 ve 72. saat uygulamalarından sonra gen ifadesini azalttığı görülmüştür. Ergin kaprada ise, en yüksek *TgHSP60* transkript miktarının 96, 120 ve 12 saat muamelelerinden sonra olduğu görülmüştür. 144 ve 24 saat uygulamalarından sonra ise hafif miktarda artan gen ifadesi gözlenmiştir. 48 ve 72 saat uygulamalarını takiben ise, genin ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15).

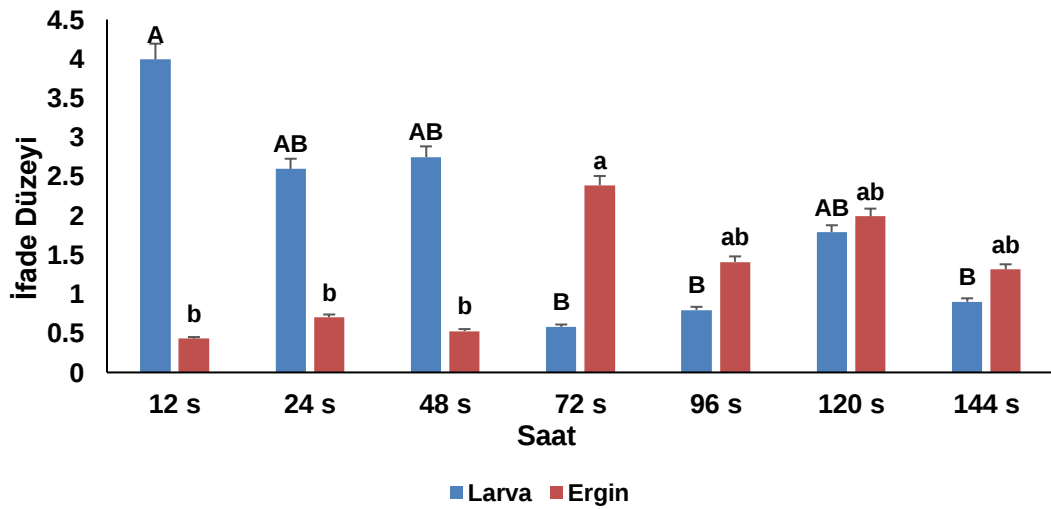
TgHSP60



Şekil 4. 15. Yeşil ZnO NP muamelesi sonucu *TgHsp60* geninin ifade seviyeleri.

Kapra larvasında en yüksek *TgHSP68* ifadesinin, 500 ppm konsantrasyondaki ZnO NP ile muamele edilmiş buğday taneleri ile beslemenin 12. saatinden sonra tespit edildiği gözlenmiştir. Bunu sırası ile 48, 24 ve 120 saat uygulamaları takip etmiştir. 72, 96 ve 144 saat uygulamalarının ise larvada gen ifadesinin azaldığı görülmüştür. Ergin böcekte en yüksek *TgHSP68* transkript seviyeleri sırası ile 72, 120, 96 ve 144 saat muamelelerini takiben gözlenmiştir. 12, 24 ve 48 saat uygulamalarından sonra ise, genin ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.16).

TgHSP68



Şekil 4. 16. Yeşil ZnO NP muamelesi sonucu *TgHsp68* geninin ifade seviyeleri.

HSP'lerin ifadeleri, stres faktörlerine yanıt olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Bir çalışmada RNA dizileme analizi sonucu, ipekböceğinin yağ dokusunda *HSP68*'in de dahil olduğu birçok *HSP* geninin seviyesinde, titanyum oksit NP'ler ile (TiO_2) muamele sonucunda önemli seviyede artış olduğu gösterilmiştir (Tian ve ark., 2016). Bir başka çalışmada ise, *Spodoptera litura*'nın Zn NP'lere maruz kalması, organizmadaki *HSP70* ve diğer *HSP* genlerinin ifadesini önemli ölçüde indüklemiştir (Shu ve ark., 2010; Zhao ve ark., 2012). *HSP* proteinlerinin *Spodoptera litura*'daki ifadesinin Zn stresi ile güçlü bir korelasyona sahip olduğu bulunmuştur (Shu ve ark., 2011). *Drosophila melanogaster*'ın Cu NP'ler ile muamelesinin, *HSP*'lerin farklı ifadelerine neden olduğu görülmüştür. Uygulamanın böceğin gelişiminin gecikmesine ek olarak, organizmanın ikinci ve üçüncü dönemlerinde *Hsp70* geninin ifadesini artırdığı saptanmıştır (Saudi ve ark., 2022). *CAT*, *HSP26*, 60, 70 ve 83'ün aralarında bulunduğu genlerin ifadesini araştırmak amacıyla sirke sineğine (*Drosophila melanogaster* Oregon R) bazı kimyasal pestisitler uygulanmıştır. Muamele sonrası sinekteki oksidatif stres genlerinde çeşitli yanıtlar oluşmuştur. Değişen pestisit dozlarına beş gün maruz kaldıktan sonra ise, gen ifade düzeylerinde artış gözlenmiştir (Doganlar ve Doganlar, 2015). Bir çalışmada ise, *Drosophila melanogaster*'a uygulanan amorf silika nanoparçacıkları (aSNP'ler), *Drosophila*'nın orta bağırsak hücrelerinde, membran istikrarsızlığı ve mitokondriyal membran potansiyel kaybı ile birlikte önemli ölçüde artan *HSP70* ve *HSP22* ifadesine neden olmuştur (Pandey ve ark., 2013). AgNP'lerin potansiyel toksik etkilerinin incelenmesinde, *Drosophila melanogaster*'da *HSP70* ifadesinde artış gözlemlenmiştir (Ahamed ve ark., 2010). Kadmiyum metale maruz bırakılan çizgili yaprak kurdu'nun (*Spodoptera exigua*), *HSP70* gen ifadesi miktarının kontrole göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Kafel ve ark., 2012).

Maruz kaldıkları stres faktörleri, böceklerin *HSP* geni ifade seviyelerinin değişmesine sebep olabilmektedir. Yukarıda bahsi geçen geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli NP uygulamalarının *HSP* genlerinin ifade seviyelerinde değişime sebebiyet verdiği görülmüştür. Bu çalışmada yeşil ZnO NP muamelesi sonrası *T. granarium* larva ve erginlerinde *TgHSP60* ve *TgHSP68* gen ifade seviyeleri analiz edilmiştir. Artan *TgHSP60* ve *TgHSP68* gen ifade düzeylerinden yola çıkarak, ağır metal dâhil çeşitli stres faktörlerine yanıt olarak çalışan ısı şok mekanizmasının, kapra böceğinde özellikle 12. saatten sonra tetiklendiği görülmektedir. Böylece, kapra böceğinde ZnO NP uygulaması sonrası gelişen oksidatif strese, *HSP*'lerin bir biyomarker olarak yanıt verdiği sonucuna ulaşılabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Günümüzde, depolanan ürünlerin zararlılar tarafından istila edilmesi ve zararlı kontrolünün kullanılan kimyasal pestisitlere karşı gelişen direnç sonucunda zorlaşması, ciddi bir sorun haline gelmiştir. Bu sorun ekonomi, çevre ve insan sağlığı bakımından istenmeyen sonuçlara yol açmaktadır. Son yıllarda, nanoteknoloji bilim dalının ürünü olan NP'lerin tarımsal zararlılara karşı insektisit olarak kullanılabilmesi gündeme gelmiştir. ZnO NP'lerin depolanan ürün zararlıları ile mücadele için kullanılması üzerine yapılan araştırmalar, bu NP'lerin kimyasal pestisitlerin iyi bir alternatifi olabileceğini göstermiştir. Bu NP'ler, birçok zararlı böceğin büyüme, üreme ve yaşamını sürdürmesini engelleme potansiyeline sahiptir. Dahası, çeşitli çalışmalarda ZnO NP'lerin sadece zararlılar üzerinde etkili olduğu, ürünlerin miktarını ve kalitesini etkilemeden kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle, ZnO NP'lerin depolanan ürün zararlılarının kontrolünde kullanımı, kimyasal mücadele yöntemlerinin yerine umut verici bir alternatif yöntem olarak görülebilir.

Bu tezin sonuçlarına göre kapra böceğinin larva ve erginlerine uygulanan yeşil ZnO NP'lerin potansiyel insektisit olma; araştırılan *TgCAT*, *TgHSP60* ve *TgHSP68* genlerinin ise ZnO NP'lerin meydana getirdiği oksidatif strese yanıt geliştiren biyomarker olma özelliği vardır.

5.2 Öneriler

ZnO NP'lerin kapra böceği ile mücadelede etkili olabileceği ve entegre zararlı yönetiminin (IPM) muhtemel bir ögesi olarak kullanılması tavsiye edilebilir. NP uygulaması sonucu kapra larva ve erginlerinde meydana gelen gen ifade düzeyi değişimlerinin mekanizmasının larvaya ve ergine bağlı olarak nasıl değiştiği farklı larval dönem ve konsantrasyonlar içeren biyoassayler yapılarak araştırılabilir. Ayrıca, ZnO NP uygulamalarının sonucunda ifade düzeyleri araştırılan genler, RNA interferans ve CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) gibi teknikler ile susturularak veya modifiye edilerek, bu genlerin fonksiyonel özellikleri araştırılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abdelfattah, N. A., and Zein, D. M., 2019. Biological studies and toxicity experiments of AEROSIL 200 nanoparticles on adults and larvae of some stored grain insects. *International Journal of Entomology Research*, 4(1), 103-108.
- Abdel-Moein, N. M., E. A. Abdel-Moniem, D. A. Mohamed, and E. A. Hanfy., 2011. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-arthritic effects of some plant extracts. *Grasas y Aceites*. 62(4):365-374.
- Abid, N., Khan, A. M., Shujait, S., Chaudhary, K., Ikram, M., Imran, M., and Maqbool, M., 2021. Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 102597.
- Abreu, F. O., Oliveira, E. F., Paula, H. C., and de Paula, R. C., 2012. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate polymers*, 89(4), 1277-1282.
- Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T. J., Nielsen, M., Hussain, S. M., and Rowe, J. J., 2010. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and applied pharmacology*, 242(3), 263-269.
- 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., Haque, M. I., Afzal, S. N., Naeem, M., Hussain, T., and Naz, S., 2011. Quantitative losses and physical damage caused to wheat kernel (*Triticum aestivum* L.) by khapra beetle infestation. *Pakistan Journal of Botany*, 43(1), 659-668.
- Alagumuthu, G., and Kirubha, R., 2012. Green synthesis of silver nanoparticles using *Cissus quadrangularis* plant extract and their antibacterial activity. *International Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2(3), 30-33.
- Al-Akhdar, H. H., Boraie, D. M., and Habashy, M. G., 2015. Efficacy of some plant extracts against some stored grain pests. *Acarines: Journal of the Egyptian Society of Acarology*, 9(1), 55-61.
- Alavi, M., Karimi, N., and Valadbeigi, T., 2019. Antibacterial, Antibiofilm, Antiquorum Sensing, Antimotility, and Antioxidant Activities of Green Fabricated Ag, Cu, TiO₂, ZnO and Fe₃O₄ NPs via *Protoparmeliopsis muralis* Lichen Aqueous Extract against Multi-Drug-Resistant Bacteria, *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 5(9), 4228–4243.
- Al-Esawy, M. T., Alshukri, B. M. and Kadhim, B. J., 2021, Carbon nanotubes as control agents against the Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), *Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences*, 16(4), 1–9.

- Alias, S. S., Ismail, A. B. and Mohamad, A. A., 2010. Effect of pH on ZnO nanoparticle properties synthesized by sol-gel centrifugation. *Journal of Alloys and Compounds*, 499(2), 231-237.
- Almadiy, A. A., Nenaah, G. E. and Shawer, D. M., 2018. Facile synthesis of silver nanoparticles using harmala alkaloids and their insecticidal and growth inhibitory activities against the khapra beetle. *Journal of Pest Science*, 91(2), 727-737.
- Al-Radadi, N. S., 2019. Green synthesis of platinum nanoparticles using Saudi's Dates extract and their usage on the cancer cell treatment. *Arabian journal of chemistry*, 12(3), 330-349.
- Andras Szito, Oonagh Byrne, Pia Scanlon, Agriculture and Food, 2022, <https://www.agric.wa.gov.au/biosecurity/khapra-beetle-declared-pest?nopaging=1> (Erişim Tarihi: 04 Temmuz 2022).
- Anjum, S., Hashim, M., Malik, S. A., Khan, M., Lorenzo, J. M., Abbasi, B. H. and Hano, C., 2021. Recent advances in zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) for cancer diagnosis, target drug delivery, and treatment. *Cancers*, 13(18), 4570.
- 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.
- Ayuk, E. L., Ugwu, M. O. and Aronimo, S. B., 2017. A review on synthetic methods of nanostructured materials. *Chemistry Research Journal*, 2(5), 97-123.
- Badawy, A. A., Abdelfattah, N. A. H., Salem, S. S., Awad, M. F. and Fouda, A., 2021, Efficacy assessment of biosynthesized copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) on stored grain insects and their impacts on morphological and physiological traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) plant, *Biology*, 10(3), 1–20.
- Barends, T. R., Werbeck, N. D. and Reinstein, J., 2010. Disaggregases in 4 dimensions. *Current opinion in structural biology*, 20(1), 46-53.
- Barzinjy, A. A., Hamad, S. M., Esmaeel, M. M., Aydın, S. K. and Hussain, F. H. S., 2020. Biosynthesis and characterisation of zinc oxide nanoparticles from *Punica granatum* (pomegranate) juice extract and its application in thin films preparation by spin-coating method. *Micro and Nano Letters*, 15(6), 415-420.
- Benelli, G., Maggi, F., Pavela, R., Murugan, K., Govindarajan, M., Vaseeharan, B. and Higuchi, A., 2018. Mosquito control with green nanopesticides: towards the One Health approach? A review of non-target effects. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10184-10206.
- Boyer, S., Zhang, H. and Lempérière, G., 2012, A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects, *Bulletin of Entomological Research*, 102(2), 213– 229.
- Bukau, B. and Horwich, A. L., 1998. The *Hsp70* and *Hsp60* chaperone machines. *Cell*, 92(3), 351-366.

- Cáceres, M., Vassena, C. V., Garcerá, M. D. and Santo-Orihuela, P. L., 2019. Silica nanoparticles for insect pest control. *Current Pharmaceutical Design*, 25(37), 4030-4038.
- Chaiyasit, D., Choochote, W., Rattanachanpichai, E., Chaithong, U., Chaiwong, P., Jitpakdi, A. and Pitasawat, B., 2006. Essential oils as potential adulticides against two populations of *Aedes aegypti*, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai province, northern Thailand. *Parasitology research*, 99, 715-721.
- Chaud, M., Souto, E. B., Zielinska, A., Severino, P., Batain, F., Oliveira-Junior, J. and Alves, T., 2021. Nanopesticides in agriculture: Benefits and challenge in agricultural productivity, toxicological risks to human health and environment. *Toxics*, 9(6), 131.
- Chonpathompikunlert, P., Boonruamkaew, P., Sukketsiri, W., Hutamekalin, P. and Sroyraya, M., 2018. The antioxidant and neurochemical activity of *Apium graveolens* L. and its ameliorative effect on MPTP-induced Parkinson-like symptoms in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 1-12.
- Choochote, W., Tuetun, B., Kanjanapothi, D., Rattanachanpichai, E., Chaithong, U., Chaiwong, P. and Pitasawat, B., 2004. Potential of crude seed extract of celery, *Apium graveolens* L., against the mosquito *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, 29(2), 340-346.
- Chow, A. M., Ferrier-Pagès, C., Khalouei, S., Reynaud, S. and Brown, I. R., 2009. Increased light intensity induces heat shock protein *Hsp60* in coral species. *Cell stress and Chaperones*, 14, 469-476.
- Clogston, J. D. and Patri, A. K., 2011. Zeta potential measurement. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*, 63-70.
- Dageri, A., Kadir, M. L., Guz, N., Ogreten, A. and Arshad, M., 2023. The involvement of Antifreeze protein maxi-like and Cold-shock domain-containing protein genes in cold-induced larval diapause and cold-shock treatment of khapra beetle. *Journal of Stored Products Research*, 101, 102074.
- Dağeri, A., Öğreten, A. and Güz, N., 2022, Depo Zararlısı *Trogoderma granarium*'da Karşılaştırmalı Transkriptom Analizi, *Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü*.
- Das, M. and Chatterjee, S., 2019. Green synthesis of metal/metal oxide nanoparticles toward biomedical applications: Boon or bane. In Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles (pp. 265-301). *Elsevier*.
- Das, S., Yadav, A. and Debnath, N., 2019. Entomotoxic efficacy of aluminium oxide, titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles against *Sitophilus oryzae* (L.): A comparative analysis. *Journal of Stored Products Research*, 83, 92-96.
- Debnath, N., Das, S., Patra, P., Mitra, S. and Goswami, A., 2012, Toxicological evaluation of entomotoxic silica nanoparticle, *Toxicological and Environmental Chemistry*, 94(5), 944 – 951.

- Deka, B., Babu, A., Baruah, C. and Barthakur, M., 2021. Nanopesticides: a systematic review of their prospects with special reference to tea pest management. *Frontiers in Nutrition*, 8.
- Demissie, M. G., Sabir, F. K., Edossa, G. D. and Gonfa, B. A., 2020. Synthesis of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of *Lippia adoensis* (koseret) and evaluation of its antibacterial activity. *Journal of Chemistry*, 2020.
- 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.
- Doganlar, O. and Doganlar, B. Z., 2015. Responses of antioxidant enzymes and heat shock proteins in *Drosophila* to treatment with a pesticide mixture. *Archives of Biological Sciences*, 67(3), 869-876.
- Du, F., Tong, G., Tong, C., Liu, Y., & Tao, J., 2014. Selective synthesis and shape-dependent microwave electromagnetic properties of polymorphous ZnO complex architectures. *Journal of Materials Research*, 29(5), 649-656.
- Ealia, S. A. M. and Saravanakumar, M. P., 2017, November. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. In IOP conference series: materials science and engineering (Vol. 263, No. 3, p. 032019). *IOP Publishing*.
- Ebadollahi, A. (2018). Fumigant toxicity and repellent effect of seed essential oil of celery against lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* F. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(1), 146-154.
- El-Saadony, M. T., Abd El-Hack, M. E., Taha, A. E., Fouda, M. M. G., Ajarem, J. S., Maodaa, S. N., Allam, A. A. and Elshaer, N., 2020, Ecofriendly synthesis and insecticidal application of copper nanoparticles against the storage pest *Tribolium castaneum*, *Nanomaterials*, 10(3), 587.
- Falah, A. S. and Azher, M. A., 2020. Effect of different levels of relative humidity and impurities in three stored insects. *Plant Arch*, 20, 257-261.
- Goh, E. G., Xu, X. and McCormick, P. G., 2014. Effect of particle size on the UV absorbance of zinc oxide nanoparticles. *Scripta Materialia*, 78, 49-52.
- Gour, A. and Jain, N. K., 2019. Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artificial cells, nanomedicine and biotechnology*, 47(1), 844-851.
- Gujrati, M., Malamas, A., Shin, T., Jin, E., Sun, Y. and Lu, Z. R., 2014. Multifunctional cationic lipid-based nanoparticles facilitate endosomal escape and reduction-triggered cytosolic siRNA release. *Molecular pharmaceuticals*, 11(8), 2734-2744.
- Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K., & Chowdhuri, D. K. (2010). Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life sciences*, 86(11-12), 377-384.
- 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. and 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.
- 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.
- Haider, Z., Ayub, A. R., Tahir, M. U., Sajid, S. A. and Khalid, M., 2020. Efficacy and characterization of synthesized zinc oxide nanoparticles against *Tribolium castaneum* and *Trogoderma granarium*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 10(3), 131-151.
- Hamel, D., Rozman, V. and Liška, A., 2020, Storage of cereals in warehouses with or without pesticides, *Insects*, 11(12), 1–21.
- Handy, R. D. and Shaw, B. J., 2007. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health, Risk and Society*, 9(2), 125-144.
- Hano, C. and Abbasi, B. H., 2021. Plant-based green synthesis of nanoparticles: Production, characterization and applications. *Biomolecules*, 12(1), 31.
- Haroun, S. A., Elnaggar, M. E., Zein, D. M. and Gad, R. I., 2020, Insecticidal efficiency and safety of zinc oxide and hydrophilic silica nanoparticles against some stored seed insects, *Journal of Plant Protection Research*, 60(1), 77–85.
- Hartl, F. U., Bracher, A. and Hayer-Hartl, M., 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324-332.
- Helaly, Alaa Al-Din, Jun Pill Baek, Emad Mady, M.H.Z. Eldekashy and Lyle Craker., 2015. "Phytochemical Analysis of Some Celery Accessions." *Journal of Medicinally Active Plants* 4, (1):1-7.
- HODEK, I., 2013. Controversial aspects of diapause development. *European Journal Of Entomology*, 99(2), 163-173.
- Honary, S. and Zahir, F., 2013. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical journal of pharmaceutical research*, 12(2), 265-273.
- Hu, Z., Zuo, H., Li, Y., Huang, J. and Hu, M., 2011. Cloning, sequence analysis and expression profiling of cDNA coding for catalase from the beet army worm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(11), 1249-1257.
- Ibrahim, S., Elbehery, H. and Samy, A., 2022. Insecticidal activity of ZnO NPs synthesized by green method using pomegranate peels extract on stored product insects. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(4), 135-145.
- 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.
- Jalal, R., Goharshadi, E. K., Abareshi, M., Moosavi, M., Yousefi, A. and Nancarrow, P., 2010. ZnO nanofluids: green synthesis, characterization and antibacterial activity. *Materials Chemistry and Physics*, 121(1-2), 198-201.
- Jameel, M. S., Aziz, A. A. and Dheyab, M. A., 2020. Green synthesis: Proposed mechanism and factors influencing the synthesis of platinum nanoparticles. *Green processing and synthesis*, 9(1), 386-398.
- Jasrotia, P., Nagpal, M., Mishra, C. N., Sharma, A. K., Kumar, S., Kamble, U., Bhardwaj, A. K., Kashyap, P. L., Kumar, S. and Singh, G. P., 2022, Nanomaterials for Postharvest Management of Insect Pests: Current State and Future Perspectives, *Frontiers in Nanotechnology*, 3, p.100.
- Joplin, K. H. and Denlinger, D. L., 1990. Developmental and tissue specific control of the heat shock induced 70 kDa related proteins in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology*, 36(4), 239-249.
- Joudeh, N. and Linke, D., 2022. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 1-29.
- Kafel, A., Nowak, A., Bembenek, J., Szczygie, J., Nakonieczny, M. and Świergosz-Kowalewska, R., 2012. The localisation of HSP70 and oxidative stress indices in heads of *Spodoptera exigua* larvae in a cadmium-exposed population. *Ecotoxicology and environmental safety*, 78, 22-27.
- Kah, M. and Hofmann, T., 2014. Nanopesticide research: current trends and future priorities. *Environment international*, 63, 224-235.
- Kamli, M. R., Malik, M. A., Srivastava, V., Sabir, J. S. M., Mattar, E. H. and Ahmad, A., 2021, Biogenic ZnO Nanoparticles Synthesized from *Origanum vulgare* Abrogates Quorum Sensing and Biofilm Formation in Opportunistic Pathogen *Chromobacterium violaceum*, *Pharmaceutics*, 13(11), 1743.
- Kaushal, J., Mehandia, S., Singh, G., Raina, A. and Arya, S. K., 2018. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 192-199.
- 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.
- Kim, B. Y., Kim, H. J., Lee, K. S., Seo, S. J. and Jin, B. R., 2008. Catalase from the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis*: cDNA sequence, expression, and functional characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(1), 183-190.

- Kim, J., Kim, S., An, K. W., Choi, C. Y., Lee, S. and Choi, K., 2010. Molecular cloning of *Daphnia magna* catalase and its biomarker potential against oxidative stresses. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 152(3), 263-269.
- Kookana, R. S., Boxall, A. B., Reeves, P. T., Ashauer, R., Beulke, S., Chaudhry, Q. and Van den Brink, P. J., 2014. Nanopesticides: guiding principles for regulatory evaluation of environmental risks. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(19), 4227-4240.
- Kooti, W., Ali-Akbari, S., Asadi-Samani, M., Ghadery, H. and Ashtary-Larky, D., 2015. A review on medicinal plant of *Apium graveolens*. *Advanced Herbal Medicine*, 1(1), 48-59.
- Košťál, V., 2006. Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of insect physiology*, 52(2), 113-127.
- Kregel, K. C., 2002. Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of applied physiology*, 92(5), 2177-2186.
- Kulkarni, N. V., Gupta, S., Kataria, R. and Sathyanarayana, N., 2015. Morphometric analysis and reproductive system studies of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). *International Journal of Scientific and Research Publications*, 5, 1-8.
- Labhane, P. K., Huse, V. R., Patle, L. B., Chaudhari, A. L. and Sonawane, G. H., 2015. Synthesis of Cu doped ZnO nanoparticles: crystallographic, optical, FTIR, morphological and photocatalytic study. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 3(07), 39.
- Li, Y., Yang, Y., Li, R., Tang, X., Guo, D. and Qin, Y., 2020. Enhancing ZnO-NP antibacterial and osteogenesis properties in orthopedic applications: a review. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 6247.
- Lindgren, D. L. and Vincent, L. E., 1959, Biology and control of *Trogoderma granarium* Everts. *Journal of Economic Entomology*, 52(2), 312-319.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lopez-Martinez, G., Elnitsky, M. A., Benoit, J. B., Lee Jr, R. E. and Denlinger, D. L., 2008. High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica antarctica*, and developmentally linked expression of genes encoding superoxide dismutase, catalase and heat shock proteins. *Insect biochemistry and molecular biology*, 38(8), 796-804.
- Luque, P. A., Garrafa-Gálvez, H. E., García-Maró, C. A. and Soto-Robles, C. A., 2022, Study of the optical properties of ZnO semiconductor nanoparticles using *Origanum vulgare* and its effect in *Rhodamine B* degradation, *Optik*, 258, 168937.

- 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.
- Malaikozhundan, B., Vaseeharan, B., Vijayakumar, S. and Thangaraj, M. P., 2017. *Bacillus thuringiensis* coated zinc oxide nanoparticle and its biopesticidal effects on the pulse beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 174, 306-314.
- Malaikozhundan, B. and Vinodhini, J., 2018. Nanopesticidal effects of *Pongamia pinnata* leaf extract coated zinc oxide nanoparticle against the Pulse beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Materials Today Communications*, 14, 106-115.
- Marselia, A., Wahdaningsih, S. and Nugraha, F., 2021. Analisis gugus fungsi dari ekstrak metanol kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) menggunakan FT-IR. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 5(1).
- Mauter, M. S. and Elimelech, M., 2008. Environmental applications of carbon-based nanomaterials. *Environmental science and technology*, 42(16), 5843-5859.
- Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005;62(6):670-684.
- Mhemed, A. J., 2011. The efficacy of four seed powders on some biological aspects and mortality of khapra beetle. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 42(6), 112-123.
- Mohammadian, M., Es'haghi, Z. and Hooshmand, S., 2018. Green and chemical synthesis of zinc oxide nanoparticles and size evaluation by UV-Vis spectroscopy. *Journal of Nanomedicine Research*, 7(1), 00175.
- Mohammed, A. A., Kadhim, J. H. and Hasan, A. M., 2019. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi for the control of khapra beetle (Coleoptera: Dermestidae) and their effects on the beetles' fecundity and longevity. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 35(1), 1-11.
- Mutukwa, D., Taziwa, R. and Khotseng, L. E., 2022. A Review of the Green Synthesis of ZnO Nanoparticles Utilising Southern African Indigenous Medicinal Plants. *Nanomaterials*, 12(19), 3456.
- Nair, P. M. G., Park, S. Y. and Choi, J., 2013. Evaluation of the effect of silver nanoparticles and silver ions using stress responsive gene expression in *Chironomus riparius*. *Chemosphere*, 92(5), 592-599.
- Nayak, M.K., Daglish, G.J., Phillips, T.W. and Ebert, P.R., 2020, Resistance to the fumigant phosphine and its management in insect pests of stored products: a global perspective, *Annual Review of Entomology*, 65, 333-350.
- Neupert, W., 1997. Protein import into mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), 863-917.

- Nguyen, H. M., Hwang, I. C., Park, J. W. and Park, H. J., 2012. Enhanced payload and photo-protection for pesticides using nanostructured lipid carriers with corn oil as liquid lipid. *Journal of Microencapsulation*, 29(6), 596-604.
- Nguyen, H. M., Hwang, I. C., Park, J. W. and Park, H. J., 2012. Photoprotection for deltamethrin using chitosan-coated beeswax solid lipid nanoparticles. *Pest management science*, 68(7), 1062-1068.
- Nguyen, T. T. A., Michaud, D., and Cloutier, C., 2009. A proteomic analysis of the aphid *Macrosiphum euphorbiae* under heat and radiation stress. *Insect biochemistry and molecular biology*, 39(1), 20-30.
- Nishanthi, R., Malathi, S. and Palani, P., 2019. Green synthesis and characterization of bioinspired silver, gold and platinum nanoparticles and evaluation of their synergistic antibacterial activity after combining with different classes of antibiotics. *Materials Science and Engineering: C*, 96, 693-707.
- Nollen, E. A., Brunsting, J. F., Roelofsen, H., Weber, L. A. and Kampinga, H. H., 1999. In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Molecular and cellular biology*, 19(3), 2069-2079.
- Orr, W. C. and Sohal, R. S., 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 263(5150), 1128-1130.
- Özberk, F., 2018. Impacts of khapra beetle (*T. granarium* Everts) onto marketing price and relevant traits in bread wheat (*T. aestivum* L.). *Applied Ecology and Environmental Research*, 16, 6143-6153.
- Pachauri, V., Subramaniam, C., & Pradeep, T., 2006. Novel ZnO nanostructures over gold and silver nanoparticle assemblies. *Chemical physics letters*, 423(1-3), 240-246.
- Pan, K. and Zhong, Q., 2016. Organic nanoparticles in foods: fabrication, characterization, and utilization. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7(1), 245-266.
- Pandey, A., Chandra, S., Chauhan, L. K. S., Narayan, G. and Chowdhuri, D. K., 2013. Cellular internalization and stress response of ingested amorphous silica nanoparticles in the midgut of *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(1), 2256-2266.
- Parveen, K., Banse, V. and Ledwani, L., 2016, April. Green synthesis of nanoparticles: their advantages and disadvantages. In AIP conference proceedings (Vol. 1724, No. 1, p. 020048). *Physical Science Publishing - AIP Publishing LLC*.
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S. and Shin, H. S., 2018. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 1-33.

- Phillips, T. W. and Throne, J. E., 2010, Biorational approaches to managing stored-product insects, *Annual Review of Entomology*, 55, 375–397.
- Pittarate, S., Rajula, J., Rahman, A., Vivekanandhan, P., Thungrabeab, M., Mekchay, S. and Krutmuang, P., 2021. Insecticidal effect of zinc oxide nanoparticles against *Spodoptera frugiperda* under laboratory conditions. *Insects*, 12(11), 1017.<https://doi.org/10.3390/insects12111017>.
- Prasathkumar, M., Anisha, S., Dhriya, C., Becky, R. and Sadhasivam, S., 2021. Therapeutic and pharmacological efficacy of selective Indian medicinal plants—a review. *Phytomedicine Plus*, 1(2), 100029.
- Raduw, G. G. and Mohammed, A. A., 2020. Insecticidal efficacy of three nanoparticles for the control of Khapra beetle (*Trogoderma granarium*) on different grains. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 36(1), 90-100.
- Ragaei, M. and Sabry, A. K. H., 2014. Nanotechnology for insect pest control. *International journal of science, environment and technology*, 3(2), 528-545.
- Rahaiee, S., Ranjbar, M., Azizi, H., Govahi, M. and Zare, M., 2020, Green synthesis, characterization, and biological activities of saffron leaf extract-mediated zinc oxide nanoparticles: A sustainable approach to reuse an agricultural waste, *Applied Organometallic Chemistry*, 34(8), e5705.
- 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.
- Rizwan, M., Aslam, A., Majeed, D. and Malik, M. K., 2018, Effects of temperature and relative humidity on the development of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), *International Journal of Entomology Research*, 3(4), 09–12.
- Roy, K., Sarkar, C. K. and Ghosh, C. K., 2015. *Apium graveolens* leaf extract-mediated synthesis of silver nanoparticles and its activity on pathogenic fungi. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 10, 393-400.
- Saini, N., G.K. Singh and B.P. Nagori., 2014. Spasmolytic potential of some medicinal plants belonging to family Umbelliferae: A review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*. 5(1):74-83.
- Saudi, M., Said, O., Abdel-Samie, E. and Abdel-Hakim, M., 2022. Exposure to copper nanoparticles induces oxidative stress and alters Hsp70 and Sod2 gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Egyptian Journal of Pure and Applied Science*, 60(2), 36-50.
- Saunders, D. S., 2020. Dormancy, diapause and the role of the circadian system in insect photoperiodism. *Annual Review of Entomology*, 65, 373-389.

- Schebeck, M., Dobart, N., Ragland, G. J., Schopf, A. and Stauffer, C., 2022. Facultative and obligate diapause phenotypes in populations of the European spruce bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Pest Science*, 95(2), 889-899.
- Shad, A.A., H.U. Shah, J. Bakht, M.I. Choudhary and J. Ullah., 2011. Nutraceutical potential and bioassay of *Apium graveolens* L. grown in *Medicinal plants research in Pakistan* 5(20):5160-5166.
- Shahzad, K. and Manzoor, F., 2021. Nanoformulations and their mode of action in insects: a review of biological interactions. *Drug and chemical toxicology*, 44(1), 1-11.
- Sheeja, C. C., Anusri, A., Levna, C., Aneesh, P. M. and Lekha, D., 2020. MoS₂ nanoparticles induce behavioral alteration and oxidative stress mediated cellular toxicity in the social insect *Oecophylla smaragdina* (Asian weaver ant). *Journal of hazardous materials*, 385, 121624.
- Shehata, M. M. and S.S. Soltan., 2012. The effects of purslane and celery on hypercholesterolemic mice. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. 7(2):212-221.
- 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.
- Shivashri, C., Rajarajeshwari, T. and Rajasekar, P., 2013. Hepatoprotective action of celery (*Apium graveolens*) leaves in acetaminophen-fed freshwater fish (*Pangasius sutchi*). *Fish physiology and biochemistry*, 39(5), 1057-1069.
- 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 and Integrative Physiology*, 158(1), 102-110.
- Siddique, M. A., Sagheer, M. and Sahi, S. T., 2022. Comparative toxic effects of *Eucalyptus globulus* L.(Myrtales: Myrtaceae) and its green synthesized zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) against *Rhyzopertha dominica* (F.)(Coleoptera: Bostrichidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 42(2), 1697-1706.
- Stanic, V., Shaaya, E. and Shulov, A., 1963, The effect of larval excrements on the growth of *Trogoderma granarium*, *Rivista Parassitologia*, 24, 13-17.
- Sun, Y. and MacRae, T. H., 2005. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62, 2460-2476.
- Tian, J. H., Hu, J. S., Li, F. C., Ni, M., Li, Y. Y., Wang, B. B. and Li, B., 2016. Effects of TiO₂ nanoparticles on nutrition metabolism in silkworm fat body. *Biology Open*, 5(6), 764-769.
- Toto, N. A., Elhenawy, H. I., Eltaweil, A. S., El-Ashram, S., El-Samad, L. M., Moussian, B. and El Wakil, A., 2022, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) as a

- biological model for the assessment of magnetite nanoparticles toxicity, *Science of the Total Environment*, 806, 151483.
- Tougeron, K., 2019. Diapause research in insects: historical review and recent work perspectives. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(1), 27-36.
- Trogoderma granarium* (TROGGA) World distribution| EPPO Global Database., 2021, <https://gd.eppo.int/taxon/TROGGA/distribution>.
- Tuetun, B., Choochote, W., Kanjanapothi, D., Rattanachanpichai, E., Chaithong, U., Chaiwong, P. and Pitasawat, B., 2005. Repellent properties of celery, *Apium graveolens* L., compared with commercial repellents, against mosquitoes under laboratory and field conditions. *Tropical Medicine and International Health*, 10(11), 1190-1198.
- Tungjitwitayakul, J., Tatun, N., Vajarasathira, B. and Sakurai, S., 2015. Expression of heat shock protein genes in different developmental stages and after temperature stress in the maize weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of economic entomology*, 108(3), 1313-1323.
- Tutar, L. and Tutar, Y., 2010, Heat shock proteins; an overview. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(2), 216-222.
- Urabe, A. A., and Aziz, W. J., 2019. Biosynthesis of cobalt oxide (Co₃O₄) nanoparticles using plant extract of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and *Apium graveolens* L. as the antibacterial application. *World News of Natural Sciences*, 24, 356-364.
- Vasseghian, Y., Arunkumar, P., Joo, S. W., Gnanasekaran, L., Kamyab, H., Rajendran, S. and Klemeš, J. J., 2022. Metal-organic framework-enabled pesticides are an emerging tool for sustainable cleaner production and environmental hazard reduction. *Journal of Cleaner Production*, 133966.
- Vedelago, J., Gomez, C. G., Valente, M. and Mattea, F., 2018. Green synthesis of silver nanoparticles aimed at improving theranostics. *Radiation Physics and Chemistry*, 146, 55-67.
- Veerakumar, K., Govindarajan, M. and Hoti, S. L., 2014, Evaluation of plant-mediated synthesized silver nanoparticles against vector mosquitoes, *Parasitology Research*, 113(12), 4567–4577.
- Velgosová, O., Mražíková, A. and Marcinčáková, R., 2016. Influence of pH on green synthesis of Ag nanoparticles. *Materials letters*, 180, 336-339.
- Verma, N. and Kumar, N., 2019, Synthesis and Biomedical Applications of Copper Oxide Nanoparticles: An Expanding Horizon, *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 5(3), 1170–1188.
- Vivekanandhan, P., Swathy, K., Thomas, A., Kweka, E. J., Rahman, A., Pittarate, S. and Krutmuang, P., 2021b, Insecticidal efficacy of microbial-mediated synthesized copper nano- pesticide against insect pests and non-target organisms,

- International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(19), 10536.
- Wakil, W., Kavallieratos, N. G., Usman, M., Gulzar, S. and El-Shafie, H. A., 2021. Detection of phosphine resistance in field populations of four key stored-grain insect pests in Pakistan. *Insects*, 12(4), 288.
- Wang, Y., Wang, L., Zhu, Z., Ma, W. and Lei, C., 2012. The molecular characterization of antioxidant enzyme genes in *Helicoverpa armigera* adults and their involvement in response to ultraviolet-A stress. *Journal of Insect Physiology*, 58(9), 1250-1258.
- Wei, J., Ji, G., Zhang, C., Yan, L., Luo, Q., Wang, C. and Ma, C. Q., 2018. Silane-capped ZnO nanoparticles for use as the electron transport layer in inverted organic solar cells. *ACS Nano*, 12(6), 5518-5529.
- Welch WJ, Feramiso JR, 1982: Purification of the major mammalian heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry* 257:14949- 14959.
- 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.
- Xu, J., Lu, M.X., Huang, D.L., Du, Y.Z., 2017, Molecular cloning, characterization, genomic structure and functional analysis of catalase in *Chilo suppressalis*, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20, 331–336.
- Xu, J., Zhang, K., Cuthbertson, A. G., Du, C. and Ali, S., 2020. Toxicity and biological effects of *Beauveria brongniartii* Fe⁰ nanoparticles against *Spodoptera litura* (Fabricius). *Insects*, 11(12), 895.
- Xu, Y., Wang, W., Ma, L., Cui, X., Lynch, I. and Wu, G., 2020. Acute toxicity of Zinc Oxide nanoparticles to silkworm (*Bombyx mori* L.). *Chemosphere*, 259, 127481.
- Yadav, S. K. and Srivastava, C., 2017. Effect of temperature and food on the biology of khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5, 1015-1019.
- Yamamoto, K., Banno, Y., Fujii, H., Miake, F., Kashige, N. and Aso, Y., 2005. Catalase from the silkworm, *Bombyx mori*: Gene sequence, distribution, and overexpression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4), 277-283.
- Zeng, J., Zhang, B., Vuong, T. M. D., Zhang, T., Yang, J. and Zhang, G., 2020, Molecular cloning, characterization, and antioxidant function of catalase in *Lymantria disparasiatic* (Lepidoptera: Lymantriidae) under avermectin stress, *Journal of Forestry Research*, 31(6), 2563–2570.
- Zhao, L. and Jones, W. A., 2012. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *Invertebrate Survival Journal*, 9(1), 93-101.

Zheng, B., Kong, T., Jing, X., Odoom-Wubah, T., Li, X., Sun, D. and Li, Q., 2013. Plant-mediated synthesis of platinum nanoparticles and its bioreductive mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*, 396, 138-145.