ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Trogoderma granarıum'un (Coleoptera: Dermestıdae) DİYAPOZLA İLİŞKİLİ GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Fatma ÖZDAMAR

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ANKARA
2021

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Trogoderma granarıum'un (Coleopreta: Dermestıdae) DİYAPOZLA İLİŞKİLİ GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Fatma ÖZDAMAR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nurper GÜZ

Hububat ürünleri ülkemiz açısından önemli ekonomik değere sahiptir. Bu nedenle hububat ürünlerinin hastalık ve zararlılardan korunarak saklanması önemlidir. Depo zararlısı *Trogoderma granarium* dünya çapında karantinaya dahil edilmiş 100 istilacı tür arasında yer almaktadır. Geniş konukçu tercihine sahip olması, döl sayısının uygun şartlar altında 12'ye kadar ulaşabilmesi ve uzun yıllar sürebilen diyapoz mekanizmasına sahip olması bu tür ile mücadeleyi zorlu kılmaktadır. Biyoteknolojik çalışmaların önem kazanmasıyla birlikte zararlılar ile mücadelede hedef genin bilgisinin bulunuyor olması önem kazanmıştır. Bu amaçla tez kapsamında *T. granarium* bireylerinin diyapozla ilişkili olduğu düşünülen 5 adet genin ifade düzeyleri analiz edilmiştir. Bu genler *peritrophic matrix protein 14 precursor* (*PM*), *spidroin-1-like* (*SP*), *endochitinase A-like, A-kinase anchor protein 14-like [Ceratitis capitata]* (*EC*) , *anti-diruetic peptide precursor* (*ADH*) olarak belirlenmiştir. Gen ifadelerine 4 farklı koşul (Açlık, feçes, populasyon, soğuk baskısı) ve 5 farklı dönemden (1., 2., 3. dönem larva, ergin dişi ve ergin erkek) elde edilen örneklerden 3 tekerrürlü olacak şekilde incelenmiştir. qPCR analizi sonucunda elde edilen CT değerleri, housekeeping genlere ait CT değerleri ile karşılaştırılmak üzere, $2^{-\Delta CT}$ formülü kullanılarak normalize edilmiştir. Örnekler arasındaki istatistiksel anlamlılık, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey's Honest Significant Difference (HSD) testi ile belirlenmiştir. Değerlendirmede koşullara göre *EC* geni hariç tüm genlerin soğuk baskısı altında, *EC* geninin ise popülasyon baskısında en fazla ifade edildiği bulunmuştur. Dönemlere göre *ADH* geni hariç diğer tüm genlerin 1. dönem larvada ifade düzeyinin en fazla olduğu bulunmuştur. *ADH* geni tüm dönemler arasında en fazla ergin dişide ifade edilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen verilerin zararlı ile mücadelede böcek fizyolojisini hedef alan diğer bilimsel çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Aralık 2021, 91 sayfa

Anahtar kelimeler: *Trogoderma granarium*, diyapoz, genetik regülasyon, hububat

ABSTRACT

Master Thesis

EXPRESSION PROFILES OF DIAPAUSE RELATED GENES IN *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestıdae)

Fatma ÖZDAMAR

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Nurper GÜZ

Cereal products have an important economic value for our country. For this reason, it is important to store cereal products by protecting them from diseases and pests. The storage pest *Trogoderma granarium* is among the 100 invasive species included in quarantine worldwide. The fact that it has a wide host preference, the number of offspring can reach up to 12 under suitable conditions and it has a diapause mechanism that can last for many years makes it difficult to fight with this species. Recently, with the increasing of biotechnology studying in pest control, it has become important to have the knowledge of the target gene of the mechanism that is desired to be broken in the fight against pests. For this purpose, within the scope of the thesis, the expression levels of 5 genes thought to be associated with diapause in *T. granarium* individuals were examined. These genes were identified as peritrophic matrix protein 14 precursor (*PM*), spidroin-1-like (*SP*), endochitinase A-like, A-kinase anchor protein 14-like [Ceratitis capitata] (*EC*), anti-diruetic peptide precursor (*ADH*). Gene expressions were examined in 3 replications from samples obtained from 4 different conditions (starvation, faeces, population, cold pressure) and 5 different periods (1st, 2nd, 3rd instar larvae, adult female, and adult male). CT values obtained as a result of real-time PCR analysis were normalized to be compared with the CT values of housekeeping genes using the $2^{-\Delta CT}$ formula. Statistical significance between samples was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's Honest Significant Difference (HSD) test. In the evaluation, it was found that all genes except the *EC* gene were expressed the most under cold pressure, and the *EC* gene was most expressed under population pressure according to the conditions. It was found that the expression level of all other genes except the *ADH* gene was the highest in the 1st instar larva according to the periods. *ADH* gene was most expressed in adult females among all periods. It is thought that the data obtained from this study will shed light on other scientific studies.

December 2021, 91 Page

Key Words: *Trogoderma granarium*, diapause, genetic regulation, cereals

TEŞEKKÜR

Lisans üstü eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen, tez sürecinde sahip olduğu tüm imkanları bana sunan, azmi ve çalışma hayatı ile kendime örnek aldığım değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Nurper GÜZ'e sevgi ve minnetlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde paylaşım ve önerilerini esirgemeyen NE Üniversitesi Dr. Öğretim üyesi Aslı Dağeri'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunma jürimde görev alan değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Hilal TUNCA COSİC'e ve Sayın Doç. Dr. Özgür SAĞLAM'a teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitim hayatıma aynı laboratuvarda beraber başladığım katkı, öneri ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Ziraat yüksek mühendisi N. Sena Çağatay'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı yürüttüğüm ve birçok deneyim kazandığım bursiyerlik sürecini geçirdiğim, Ankara Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Entomoloji Laboratuvarının kurulması sürecinde emeği geçen ve katkıda bulunan hocalarıma teşekkürlerimi iletirim.

Eğitim hayatım boyunca maddi, manevi her zaman yanımda olduklarını ve bana inandıklarını bildiğim çok sevgili babam Süreyya DİKMEN, annem Süheyla DİKMEN, ağabeylerim Serdar DİKMEN'e ve Serhat DİKMEN'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Tez yazdığım süreçte bana destekte bulunan kayınvalidem Perihan ÖZDAMAR'a ve anlayışı için kayınpederim Mustafa ÖZDAMAR'a saygı ve minnetlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olduğunu ve olacağını bildiğim çok sevgili eşim Oğuz ÖZDAMAR'a bana olan desteği, duyarlılığı ve inancı için en kalpten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak varlığı ile en büyük motivasyon kaynağım olan, bir gülüşü ile tüm yorgunluğumu unutturan canım oğlum Uraz ÖZDAMAR'a en derin sevgilerimi sunarım.

Fatma ÖZDAMAR
Ankara, Aralık 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **5**
2.1 *Trogoderma Granarium*'un Taksonomik Sınıflandırılması ve Tanımı **5**
2.2 *Trogoderma Granarium*'un Yaşam Döngüsü **8**
2.3 Trogoderma Granarium Zararı ve Kayıplar **10**
2.4 Trogoderma Granarium'un Yayılışı **10**
2.5 Trogoderma Granarium'un Mücadelesi **12**
2.5.1 Kimyasal insektisitler **12**
2.5.2 Diğer mücadele yöntemleri **13**
2.6 Diyapoz **15**
2.6.1 Diyapozun aşamaları **17**
2.6.2 Diyapozu etkileyen faktörler **18**
2.6.2.1 Fotoperiyot **18**
2.6.2.2 Sıcaklık **20**
2.6.2.3 Nem **21**
2.6.2.4 Besin **22**
2.6.3 Diyapozun genetik regülasyonu **23**
2.6.3.1 Gen ifadesi modelleri **26**
2.7 PCR [Quantitative PCR (qPCR)] **30**
3. MATERYAL VE YÖNTEM: **34**
3.1 Materyal **34**
3.1.1 Araç ve gereçler **34**
3.1.2 Tampon çözeltiler **35**
3.2 Yöntem **35**

3.2.1 *Trogoderma granarium*'un yetiştirilmesi 35
3.2.1.1 *Trogoderma granarium* bireylerinde soğuk baskısı uygulaması 36
3.2.1.2 *Trogoderma granarium* bireylerinde açlık baskısı uygulaması 36
3.2.1.3 *Trogoderma granarium* bireylerinde feces baskısı uygulaması 37
3.2.1.4 *Trogoderma granarium* bireylerinde kalabalık baskısı uygulaması 37
3.2.2 RNA İzolasyonu 37
3.2.3 Agaroz jel elektroforezi 39
3.2.4 cDNA sentezi 39
3.2.5 Kullanılacak genlerin seçimi 40
3.2.6 qPCR analizi 42
3.2.7 Veri analizi 44
4. BULGULAR 45
4.1 Diyapozla İlişkili Genlerin Ekspresyon Analizleri 45
4.1.1 *Endochitinase A-like* geninin ekspresyon analizi 46
4.1.2 *Peritrophic matrix protein 14 precursor* geninin ekspresyon analizi 49
4.1.3 *A-kinase Anchor Protein 14-like* geninin ekspresyon analizi 51
4.1.4 *Spidroin* geninin ekspresyon analizi 53
4.1.5 *Antidiuretic hormone* geninin ekspresyon analizi 56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 59
KAYNAKLAR 70
EKLER 80
EK 1 *T. granarium*'da *Tubilin* Geninin q-PCR Sonuçları 81
EK 2 *T. granarium*'da *Endochitinase A-like* ve *Peritrophic Matrix Protein 14 Precursor* Genlerinin q-PCR Sonuçları 83
EK 3 *T. granarium*'da *A-kinase Anchor Protein 14-like* Geninin q-PCR Sonuçları 84
EK 4 *T. granarium*'da *Spidroin* Geninin q-PCR Sonuçları 85
EK 5 *T. granarium*'da *Antidiuretic Hormone* Geninin q-PCR Sonuçları 86
EK 6 *T. granarium* normalize edilmiş gen ifadesi seviyeleri 87
EK 7 *T. granarium* gen ifadesi seviyelerinin istatistiksel olarak standart sapma değerleri 88
EK 8 *T. granarium* gen ifade seviyelerinin istatistiksel olarak sonuçları 89
ÖZGEÇMİŞ 90

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

℃	Santigrad derece
°	Derece
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
ddH2O	Çift Distile Su
H_2O	Su
CO_2	Karbondioksit
O_2	Oksijen
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribonükleik asit
cDNA	Komplementer DNA
mRNA	Mesenger RNA
dNTP	Nükleozit Trifosfat
EDTA	Etilendiaminotetra-Asetik Asit
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HCl	Hidroklorik Asit
ppm	Milyonda bir birim
g	Gram
hm	Hektometre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
cm	Santimetre
nm	Nanometre
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
dk	Dakika
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
V	Volt
RH	Bağıl Nem
OP	Organofosfat
IGR	Insect Growth Regulator
MB	Metil bromür
%	Yüzde
IPM	Integrated Pest Management
CRY	Kriptokrom
kDa	Kilodalton
JH	Jüvenil Hormon
DH	Diyapoz Hormonu
ATP	Adenozin trifosfat
UV	Ultraviyole
sn	Saniye

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *T. granarium* görselleri a) ergini b) larvası....6
Şekil 2.2 *T. granarium*'un tanımlanması ve diğer *Trogoderma* türlerinden tanısal ayrımı için kullanılan morfolojik karakterlerden bazıları....8
Şekil 2.3 *T. granarium*'un yaşam döngüsü....9
Şekil 2.4 *T. granarium* yayılışı....11
Şekil 2.5 Diyapozun aşamaları....18
Şekil 2.6 Diyapoza neden olan genetik olayların şematik gösterimi....24
Şekil 2.7 Başlıca hormonel olaylar....25
Şekil 2.8 Pupa diyapozu dönemi için, *Sarcophaga crassipalpis*'te temsili gen ifadesi kalıpları....29
Şekil 2.9 qPCR amplifikasyonlarında kantitasyon döngüsü (quantification cycle, Cq)....31
Şekil 2.10 Asimetrik siyanin boya SYBR Green I'in kimyasal yapısı....32
Şekil 2.11 SYBR Green I yöntemi....33
Şekil 4.1 *T. granarium*'un diyapozla ilişkili genlerinin farklı koşullardaki ekspresyon düzeyleri....45
Şekil 4.2 *T. granarium*'un diyapozla ilişkili genlerinin dönemsel ekspresyon düzeyleri....46
Şekil 4.3 *T. granarium*'da *Endochitinase A-like* ve *Peritrophic matrix protein 14 precursor* genlerinin qPCR sonuçları....46
Şekil 4.4 *EC* geninin farklı koşullardaki ekspresyon düzeyleri....47
Şekil 4.5 *EC* geninin farklı dönemlerdeki ekspresyon düzeyleri....48
Şekil 4.7 *PM* geninin farklı dönemlerdeki ekspresyon düzeyleri....50
Şekil 4.8 *T. granarium*'da *A-kinase Anchor Protein 14-like* geninin qPCR sonuçları....51
Şekil 4.9 *AP* geninin farklı koşullardaki ekspresyon düzeyleri....51
Şekil 4.10 *AP* geninin farklı dönemlerdeki ekspresyon düzeyleri....52
Şekil 4.11 *T. granarium*'da *Spidroin* geninin qPCR sonuçları....53
Şekil 4.12 *SP* geninin farklı koşullardaki ekspresyon düzeyleri....54
Şekil 4.13 *SP* geninin farklı dönemlerdeki ekspresyon düzeyleri....55
Şekil 4.14 *T. granarium*'da *Antidiuretic hormone* geninin qPCR sonuçları....56
Şekil 4.15 *ADH* geninin farklı koşullardaki ekspresyon düzeyleri....56
Şekil 4.16 *ADH* geninin farklı dönemlerdeki ekspresyon düzeyleri....57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Deney materyalleri 34
Çizelge 3.2 Agaroz jel elektroforezi jellerinin hazırlanmasında kullanılan stok ve tampon çözeltiler 35
Çizelge 3.3 cDNA sentezi reaksiyon hazırlığı 39
Çizelge 3.4 Kullanılan primerler 41
Çizelge 3.5 qPCR mix hazırlığında kullanılan kimyasallar 43
Çizelge 3.6 qPCR cihaz protokolü 43

1. GİRİŞ

Khapra böceği, *Trogoderma granarium (*Everts, 1898) (Coleoptera: Dermestidae) primer bir tahıl zararlısı olup doğrudan tanede zarar yapan, iç ve dış karantinaya tabi bir böcektir. Erginleri gıda almaksızın 14-22 gün yaşar, fakat 16°C'nin altındaki sıcaklıklarda birkaç ay veya yıl hayatta kaldıkları bilinmektedir. Dişilerin bıraktıkları yumurtalardan çıkan larvalar ilk önce çevrelerindeki besinlerle beslenmektedir. Larvalar ilk dönemlerinde sağlam tahıl taneleri ile beslenemediği için kırık taneler, döküntüler ve diğer besinlerle beslenmektedir. Bu zararlının larvaları 4-5 yıl beslenmeksizin yaşayabilmektedir. Ayrıca, larvaların bulundukları ambarlarda çatlak ve yarıklarda barınma alışkanlıkları da mevcuttur. Yılda ortalama 4-5 döl verir. Elverişli koşullarda döl sayısı 12'ye kadar çıkabilir. Khapra böceği; tahıl ürünlerinde, özellikle buğday, arpa, yulaf, çavdar, darı, pirinç, un, bira mayası, süt tozu, pamuk tohumu, sebze tohumları, yer fıstığı ve erişte gibi yiyeceklerle beslenerek zarar yapar (Dodanlı ve Mutlu 2020).

Trogoderma granarium'un temel biyolojisinde uzun süren diyapoza sahiptir. Öyle ki yıllar boyunca varlıklarını devam ettirebilirler. Diyapoz, larva döneminde söz konusudur ve mücadelesi en zor olan dönem de budur. Ayrıca bu türler, karantinaya tabi olmayan ve aynı gene sahip olan diğer akraba türlerden kolaylıkla ayırt edilemeyen bir morfolojiye sahiptir. Bu sebeple, doğru tanılanması daha fazla önem kazanmıştır.

Kanada, ABD ve Avustralya ile birçok ülkede karantinaya tabi tutulan bu tür dünya genelinde "Khapra böceği" olarak bilinmektedir. *T. granarium*, dünya genelinde hasat sonrasında karantinaya tabi tutulan en önemli zararlıdır (Hagstrum vd. 2012). Hindistan bölgesinden yayıldığı bilinen bu zararlı, şu anda Afrika ve Ortadoğu'nun dışında Asya ve Avrupa'daki bazı ülkelerde de görülmektedir (EPPO 2021). Daha geniş coğrafi alanlarda gözlenmeye başlanması Khapra böceğinin önemli bir zararlı olarak ortaya çıkmakta olduğunu göstermektedir. Bu zararlı, dünya çapında 100 önemli istilacı tür listesine dahil edilmiştir (Lowe vd. 2000).

Son raporlar, Avrupa ve Ortadoğu Bitki Koruma Organizasyonu bölgesi içinde bu türün önemli endemik alanların bulunduğunu göstermektedir (EPPO 2021). Bu bölge, doğuda İsrail'den başlayıp batıda Fas'a kadar devam ederek Tunus, Mısır, Kıbrıs ve Türkiye'yi de kapsamaktadır. Bu zararlının istilacı ve kendine özgü yapısı ile birlikte küresel sıcaklıklardaki artışa da bağlı olan dayanıklı gıdaların uluslararası ticaretindeki artış, bu böceğin önümüzdeki süreçte daha kuzeye yayılması ihtimalini artırmaktadır.

Khapra böceği, geniş bir konukçu tercihine sahip olan çok başarılı istilacı bir türdür. Yapılan araştırmada bu türün *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) ve *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) gibi diğer önemli tahıl istilacılarıyla ciddi şekilde rekabet edebildiğini ortaya koyulmuştur (Kavallieratos vd. 2017). Bununla birlikte, çevre koşulları uygun olmasa bile bu böceğin popülasyonu yok olmayıp düşük seviyelerde devam etmektedir. Sıcaklığın 30 derecenin üzerine çıkması durumunda zararlının populasyonu hızlı bir şekilde artmakta ve diğer depo zararlısı türlere rahatlıkla üstün gelmektedirler (Kavallieratos vd. 2017). Elverişli olmayan besinler ve ortamda az sayıda da olsa bulunabilmeleri sayesinde Khapra böceği, coğrafi olarak yayılma bakımından büyük bir avantaja sahiptir. Bu tür ayrıca düşük nem oranına sahip ürünlerle (%2'ye kadar) beslenebilme avantajına sahiptir. Çünkü depolanan ürünlere gelen birçok zararlı tür, en az %8'lik bir nem oranına ihtiyaç duymaktadır. *T. granarium*, sahip olduğu bu avantajla diğer ortak konukçu tercihine sahip zararlılarla düşük rutubet şartlarında başarılı şekilde rekabet edebilir ve genellikle de bu şartlar altında varlık gösteren tek tür olarak kalabilirler.

Trogoderma granarium, çok yüksek populasyon yoğunluğuna sahip olabildiği için ürünü tamamen kullanılmaz hale getirebilmektedir. Öncelikli tercihleri buğday ve arpa olsa da bazı ülkelerde, pek tercih etmedikleri pirinç gibi ürünlerde de bulunabilmektedirler. Ürünü istila etmekle kalmayıp dışkı ve deri döküntüleriyle kaliteyi ciddi şekilde düşürmektedirler. Bunun yanında, larvaların vücut parçaları; ciddi alerjik reaksiyonlar ve solunum problemlerine de sebep olabilmektedir.

Buğday ve pirinç gibi ithal edilen ürünlerde *T. granarium*'un bulunması, bitki korumayla ilgili düzenleme ve işlemlerin başlatılmasını gerektirir. Ancak bu zararlı,

ilginç bir şekilde, hem soğuk hem de sıcağa karşı oldukça fazla tolerans göstermektedir (Wilches 2016). Ayrıca, söz konusu türün birçok insektisitin yanı sıra kimyasal olmayan yöntemlere karşı da yüksek derecede direnç gösterdiğine dair sonuçlar bulunmaktadır (Athanassiou 2019). Ülkemizde depo tahıllarında bulunan zararlılarla mücadelede en fazla alüminyum fosfin fumigasyonu kullanılmaktadır. Ancak, Sağlam ve diğerlerinin bildirdiğine göre (2015) Opit ve diğerleri (2012) tahıl depo zararlılarının fumigasyonda kullanılan fosfine karşı dünya genelinde yüksek düzeyde direnç geliştirdiği bilinmektedir.

Bu zararlı ile kimyasal olmayan yöntemlerle mücadele kapsamında şimdiye kadar kapsamlı bir çalışma yapılmamıştır. Bu türün biyolojik mücadele ile kontrol altına alınması için kullanılabilecek parazitoidler ya da predatörler konusunda da çok az veri mevcuttur. Nitrojen ve karbondioksit gibi değiştirilen hava şartları ile kontrol altına almadan yararlanılmasıyla ilgili de nispeten az bilgiye rastlanmıştır. Yapılan araştırmaların sonucuna göre, bu yöntemlerin birçoğunda ergin böcekler diğer yaşam evrelerine göre daha fazla direnç göstermektedirler (Athanassiou 2019). Bu nedenle, Khapra böceği türünün temel biyolojik özelliklerinin bilinmesiyle birlikte bu türle mücadele için etkili stratejilerin geliştirilmesi konuları acil bir gereksinim olarak karşımıza çıkmaktadır.

Diyapoz sırasında çoğu gen baskılanmış olsa da aslında birçok genin bu dönemde ifade edildiği tespit edilmiştir. Gen ifadesi modelleri daha yakından incelendiğinde, bazı genlerin sadece erken diyapozda, bazılarının geç diyapozda ve aralıklı olarak ifade edildiğini gösterilmiştir. Bu tür farklılıklar, diyapozun karmaşıklığının altını çizmekte ve diyapozun dinamiklerini yansıtmaktadır. Metabolik hızdaki değişiklikler, metabolik rezervlerin kullanım şekilleri ve diyapoz sonlandırıcı çevresel sinyallere ve hormonlara karşı duyarlılıkların tümü, diyapoz sırasında böcek içinde meydana gelen iç değişikliklerin araştırılmasını gerektirir.

Bu tez çalışmasına veri oluşturmak üzere yeni nesil sekanslama platformu kullanılarak *T. granarium* larvalarına ait cDNA kütüphaneleri oluşturulmuştur. Elde edilen transkriptom verilerinden homoloji taramaları ve gen ontoloji analizleri yapılmıştır. Bu

tez çalışması kapsamında böceğin diyapozuna bağlı olarak artan ve azalan genlerden seçilmiş olan farklı genlerin ifade düzeylerinin analizi amaçlanmıştır. Aynı çalışmada *T. granarium* larvalarının diyapozla ilişkili olan genlerinin ifade düzeylerinin analiz edilerek diyapozda olmayan dönemlerle kıyaslanması hedeflenmiştir. Bununla birlikte belirlenen hedef genlerin *T. granarium*'un farklı biyolojik dönemlerindeki ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu sayede zararlının diyapoz fizyolojisine ilişkin temel veriler elde edilmiştir. Zararlıya karşı alternatif mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi açısından zararlının sahip olduğu diyopoz aşamasının genetik parametreleri ele alınarak bu dönemi etkileyen genetik ifadelerinin değerlendirilmesinin sürece katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Trogoderma Granarium*'un Taksonomik Sınıflandırılması ve Tanımı

Trogoderma granarium, taksonomik sınıflandırmaya göre; Hayvanlar (Animalia) aleminin Eklem bacaklılar (Arthropoda) şubesinin Kınkanatlılar (Coleoptera) takımında ve Dermestidea familyasında yer almaktadır.

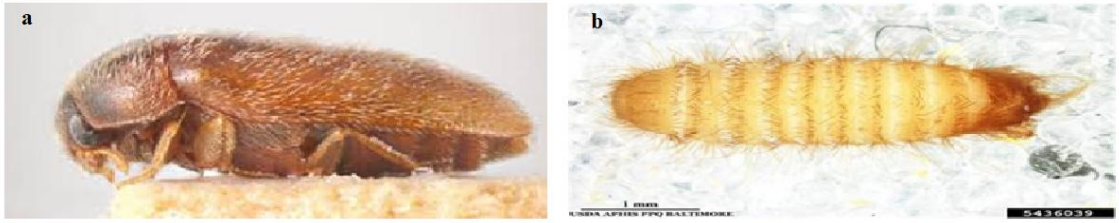
Ergin: Küçük, boyu genişliğinden uzun, 1.8–3.0 mm uzunluğunda ve 0.9 ile 1.7 mm genişliğinde, kırmızımsı-kahverengi toraksa sahip genellikle ergin bireyler koyu kahverengidir. Tahrip edilmiş tahıl tozlarını kaplayan tüyler, kirli bir görüntü verir.

Dişilerin rengi daha açık, erkekten daha geniş, küçük başlı, antenleri 11 segmentli, anten ucu 3-5 segmentten oluşmuş ve çok belirgindir. Antenler, protoraxtaki karınsal çizgiye bağlıdır. Görseli Şekil 2.1'de verilmiştir.

Larva: İlk evrede, sarımsıdan parlak kahverengiye, son evrede kırmızımsı kahverengi ya da altın rengine dönüşür. Vücut kıllarla kaplı, püsküller bölgesel abdominal segmentlerin her bir tarafında kuyruk şeklinde dikenli kıl demetleri bulunur. İlk evrelerde boyu 1.6 mm'den son evrelerde 6 mm'ye ulaşır. Larvalar beslenebilir. Görseli Şekil 2.1'de verilmiştir.

Pupa: Soluk esmer renkli, sırt kısmı hariç diğer kısımları tüylüdür.

Yumurta: Süt beyazından soluk sarımsıya dönüşür. Silindirik, 0.7 mm ile 0.22 mm uzunluğunda, bir ucu yuvarlak diğer ucu sivridir.



Şekil 2.1 *T. granarium* görselleri a) ergini b) larvası (Hoenisch 2014)

Trogoderma granarium gelişimi için en uygun sıcaklıklar 20 ile 35°C arasıdır (Lingren vd. 1959). Yumurtadan ergine gelişme süresi 30°C'de 39-45 gün ve 21°C'de 220 gün olarak bildirilmiştir (Athanassiou vd. 2019). Larvalar sıcaklığa bağlı olarak 4-8 dönem geçirebilirler, gelişimlerini 35°C'de 15 gün kadar kısa sürede tamamlayabilirler. Dişileri pupa döneminden önce, erkeklerden daha az ve bir kere deri değiştiriler (Hadaway 1956, Burges 1963). Kavallieratos ve arkadaşları 35°C'de *T. granarium*'un popülasyon büyümesinin, diğer depolanmış ürün böcekleri için olandan 10 ila 250 kat daha yüksek olduğunu göstermiştir (Kavallieratos vd. 2016). *T. granarium*'un tanımlanması ve diğer *Trogoderma* türlerinden tanısal ayrımı için kullanılan morfolojik karakterlerden bazıları Şekil 2.3 'te verilmiştir.

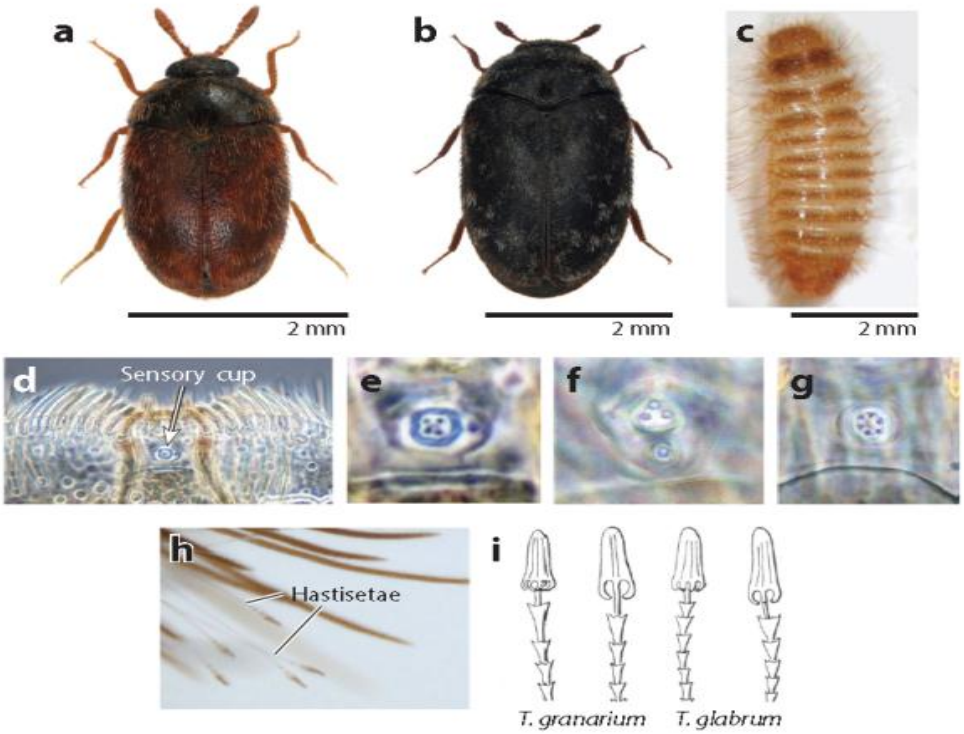
Trogoderma granarium, art arda dört ay boyunca bağıl nem (RH) %50'nin altında ortalama aylık sıcaklıklar en az 20°C ile iken zararlı seviyeye ulaşabilir (Howe vd. 1957, Howe 1958), 2 ay boyunca ortalama aylık sıcaklıklar 27°C'nin üzerinde ve nem %75 olduğunda zararlı popülasyonu en yüksek seviyeye ulaşabilir (Sinha vd. 1967). 20°C'nin altında yumurtlama yoktur. Belirgin bir değişiklik göstermese de yumurtlama 27°C ile 35°C arasında nem artarsa azalır (Odeyemi 1993). Bu nedenle, düşük bağıl nem ve yüksek sıcaklık, bu türün hızlı gelişimi için temel koşullardır (Banks 1977). *T. granarium* optimum sıcaklıklarda ve düşük bağıl nemde üreme başarısına ek olarak, depolanan ürün zararlıları arasında nadir görülen çok yüksek ve çok düşük sıcaklıklara toleranslıdır (Wilches 2016, Wilches vd. 2017).

Trogoderma granarium erginleri beslenmez ve optimal koşullarda 10 güne kadar yaşar. Her iki cinsiyette de kanatlar tam olarak gelişmiş olmasına rağmen, ikisi de uçamaz (Banks 1977, Hadaway 1955). Yapılan pek çok çalışmada; ergin dişilerin kısa

ömürlerinde (Burges 1957, Karnavar 1972), 26 ila 66 yumurta bıraktığını bildirmektedir bu durum diğer kısa ömürlü depo zararlıları için de yaygındır. Ancak ideal laboratuvar koşullarında, diyapoz halindeki larvalardan ortaya çıkan *T. granarium*'un dişileri birden fazla kere çiftleşebilir ve dişi başına 130'dan fazla yumurta bırakabildiği görülmüştür (Karnavar 1972).

Diyapoz, *T. granarium* biyolojisinin uzun ömürlü olmasına ve popülasyon yoğunluğuna katkıda bulunan anahtar özelliktir (Banks 1977). Beşinci dönem larvalar altı yıl sürebilen fakültatif bir diyapoza girebilir (Bell 1994, Burges 1962). Diyapoz halindeki larvalar beslenmeden uzun süre hayatta kalabilirler ve ek deri değiştirme yapabilirler (Athanassiou 2019). Ayrıca beslenmek için besin arama gezileri için aktif hale gelebilirler ve daha sonra hareketsiz durumlarına geri dönebilirler (Bell 1994, Correal 2016).

Sıcaklık 30°C'nin altına düştüğünde ve besin azaltıldığında kalabalık baskısında tipik olarak diyapoz meydana gelir. Fotoperiyot, diğer böceklere kıyasla küçük bir rol oynar (Karnavar 1972, Wilches 2016). Bu nedenle *T. granarium*'un diyapozu yoğunluğa bağlı olarak sınıflandırılabilir (Nair 1973). Diyapozun sona ermesi artan sıcaklıkla birlikte meydana gelir, gıda mevcudiyeti çok daha az önemlidir veya yalnızca izolasyon koşulları altında bir rol oynar (Burges 1962). Diyapozda olan larvalar belirgin değildir ve sığınaklarda hareketsizdir. Bu durum türün varlığının tespiti için bir zorluktur ve karantina mevzuatına sahip ülkelerdeki girişlerin sıklığını arttıran bir durumdur (Bell 1994).



Şekil 2.2 *T. granarium*'un tanımlanması ve diğer *Trogoderma* türlerinden tanısal ayrımı için kullanılan morfolojik karakterlerden bazıları

(a) Kırmızımsı-kahverengi bir kitini olan ancak koyu kahverengiden siyaha bir pronotumu olan ergin *T. granarium*; (b) siyah bir kitin ile *T. glabrum*; ve (c) *T. granarium*'un olgun larvası. (d) Hem *T. granarium* hem de *T. glabrum* larvaları için tipik olan, dört duyusal papillaya sahip (Şekil e'de büyütülmüş) distal duyusal kap (ok işaretli) içeren larva epifarinksi. ( ) Bazı *T. granarium*'larda bulunan biri üç duyu papillalı, diğeri ise sadece bir papillalı iki duyusal kap. (g) *T. granarium* ve *T. glabrum* dışındaki *Trogoderma* türleri için yaygın olan altı duyu papillalı duyusal kabın ventral görünümü. Altı papilla genellikle sadece bir kapta bulunur, ancak bazı örneklerde iki kap arasında dağılmış dörtlü bir grup ve iki papilla bir grup altı papilla olabilir. (h) *Trogoderma* larvalarının koyu kılları arasında Hastisetae. (i) Hastisetae'nin dört morfolojik formu: apikal kulüplü iki son segment formuna sahip *T. granarium* ve *T. glarum*'un apikal kulüp formuna sahip iki son segment formu (Athanassiou 2019).

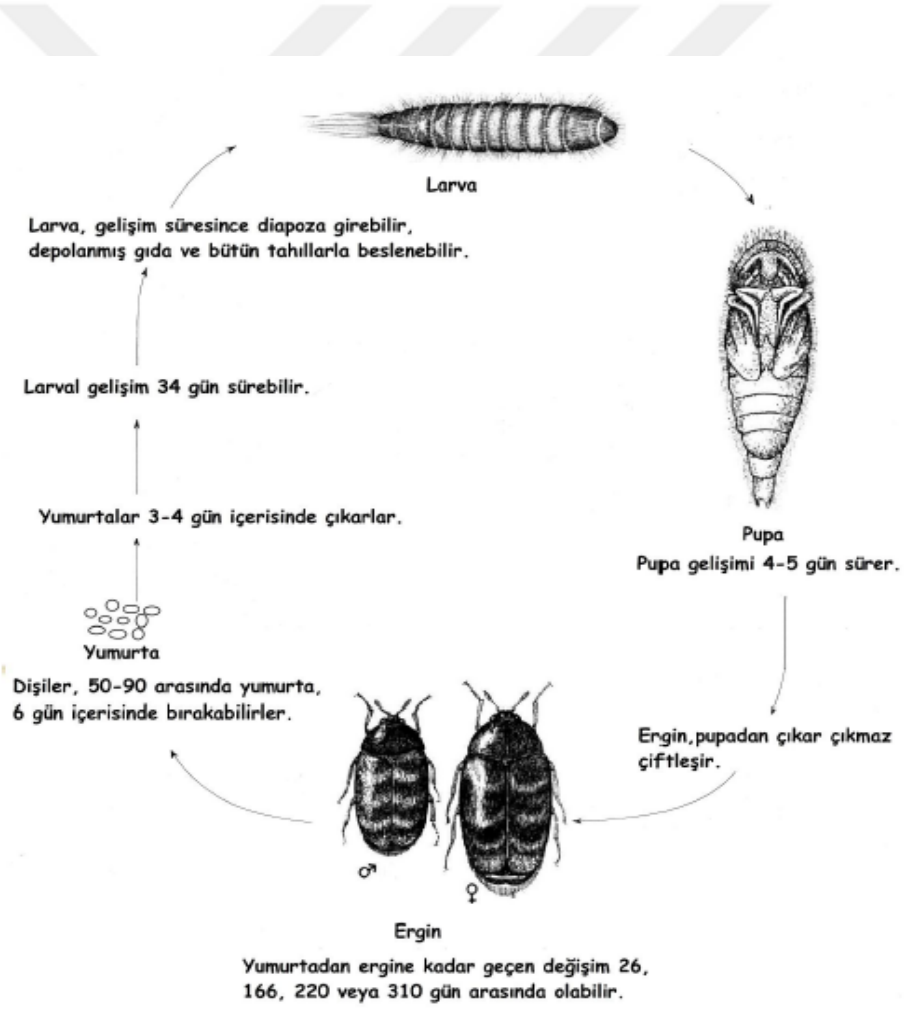
2.2 *Trogoderma Granarium*'un Yaşam Döngüsü

Trogoderma granarium'un yaşam döngüsü 26, 166, 220 veya 310 gün arasında değişir. Bu böceğin gelişimi ideal sıcaklıkta (35°C) ve nem koşullarında hızlanır. Ancak yüksek ve artan nemden olumsuz yönde etkilenir. Bu zararlının gelişiminin süresi, ışık yoğunluğuna ve depodaki tahılın çeşidine bağlıdır.

Trogoderma granarium, yıldan yıla değişmekle birlikte 1 ile 9 arasında döl verebilirler. Besin materyalinde bulunan yumurtalar, 3-4 gün içerisinde yumurtadan çıkarlar. Dişiler

(40°C'de) 50 ile 90 arasında yumurta bırakabiliyorken 20°C'nin altında yumurtalar gelişimini devam ettiremez. Larval gelişim ortalama 34 günde olsa da 35°C'de ve %73 bağıl nemde 18 gün sürdüğü belirtilmiştir. Larva 4 ile 8 arasında deri değiştirebilir. Larvalar 21°C'nin altında gelişmezler (Çelik 2011).

Pupanın gelişim dönemi 4-5 gündür. Çiftleşme, ergin böcek pupadan çıktığında hemen gerçekleşir. Çiftleşme sonucunda 6 gün içerisinde yumurtalar bırakılır. Uygun olmayan hava ve şartlarda, larva diyapoza girer. Çiftleşmemiş dişiler 20-30 gün yaşarken çiftleşmiş dişiler 4-7 gün yaşar ve erkekler 7-12 gün yaşarlar (Harris 1984). *T. granarium*'un yaşam döngüsü şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3 *T. granarium*'un yaşam döngüsü (Çelik 2011)

2.3 Trogoderma Granarium Zararı ve Kayıplar

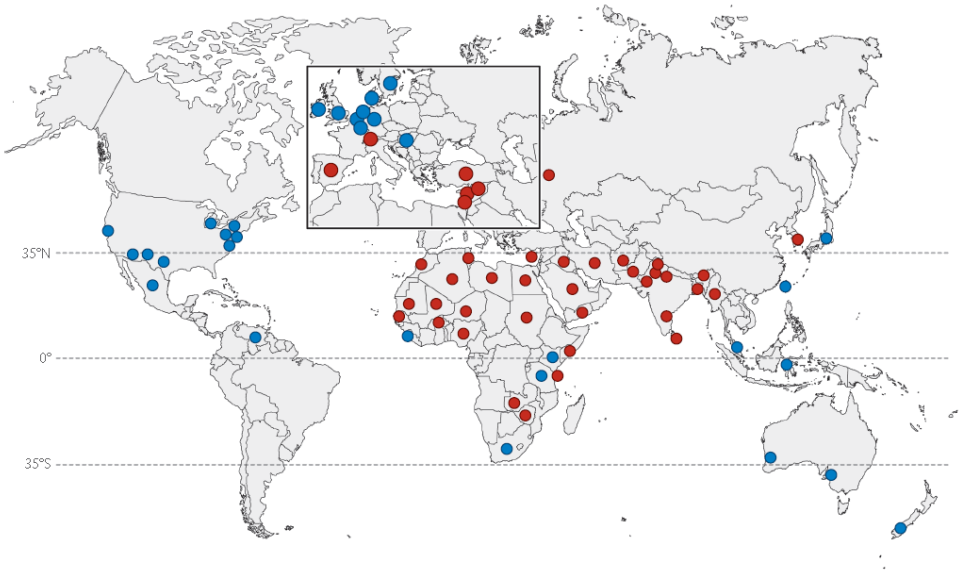
Trogoderma granarium larvalarının tahıl tanelerinde zararı, mineral kalitesini, mevcut karbonhidratları, proteini, nişasta sindirilebilirliğini ve besin yararlılığını olumsuz etkiler (Chavan 1985, Jood 1993). Yumurtadan yeni çıkan larvalar, tahıl tozu veya kırık taneler ile beslenirken, bütün daneli tahıllar dördüncü dönem veya daha yaşlı larvalar tarafından zarara uğrar (Dillon 1968). Enfekte olmuş tahılın kilo kaybı satıştaki karı azaltarak ve onu hızla pazarlanamaz hale getirmektedir. Buğday, mısır ve sorgumda %75'lik zarar seviyesi, ham yağ, toplam karbonhidrat, şeker ve gerçek protein içeriğinde önemli bir azalma ile sonuçlanır (Jood 1996). *T. granarium* tükettiğinden çok daha fazla taneye zarar vererek dökülen vücut ve deri parçaları ürünün kirlenmesine neden olur (Stibick 2007, Myers vd. 2012). Bu kirleticilerin bazılarının gıdalarda tüketilmesi ciddi sağlık tehlikelerine neden olabilir (Pasek, 1998). *T. granarium*'un zararı, diğer büyük depolanmış ürün böceği türlerinin ürettiğinden çok daha yüksek miktarda hasar ile sonuçlanır (Kavallieratos 2017). İyi durumdaki (yani düşük böcek dışkısı seviyelerine sahip) tahıllar, *T. granarium* popülasyonlarının hızlı gelişimi için yüksek miktarda dışkı içerenlere göre daha az uygun olabilir (Athanassiou vd. 2016). Tane sertliği ve tane boyutu gibi belirli tane özellikleri, *T. granarium* popülasyonunun büyümesi için önemlidir (Rao vd. 2004). Popülasyon artışı ile tane boyutu arasında negatif ilişkili bulunmuştur (Rajput vd. 2015). Tahıl tanelerinin ruşeymi üzerindeki larva zararı, ciddi çimlenme kayıplarına yol açar (Pingale vd. 1954, Rajput vd. 2015), hastalıklı tanelerde varlığının ise popülasyon artışını arttırdığı görülmüştür (Athanassiou vd. 2016).

2.4 Trogoderma Granarium'un Yayılışı

Trogoderma granarium, ilk kez 1894'te bir zararlı olarak rapor edildiği Hindistan'a özgüdür (Paini ve Yemshanov 2012). Bu tür, sıcak ve kuru iklimleri tercih eder ve 35° kuzey enlemleri ile 35° güney enlemleri arasındaki habitatlarda bulunur (Day ve White 2016). Bu koşullar, türün meydana geldiği Orta Doğu, Afrika ve Güney Asya'nın belirli bölgelerinde hüküm sürmekle birlikte, daha ılıman ülkelerde özel sıcak habitatlarda (örneğin, Birleşik Krallık'ta depolanmış tahıl maltı istilası) bulunmuştur (Banks 1977).

Önceki popülasyon modelleme, gözetim ve risk değerlendirme çalışmaları, *T. granarium*'un Kanada'da veya diğer soğuk ülkelerde yerleşme olasılığının ortam sıcaklıkları nedeniyle düşük olarak kabul edildiğini, ancak çoğu depolanan ürün böceğinde olduğu gibi, ısıtılan binaların istila edilme potansiyelinin olduğunu göstermiştir (Ameen 2012). Tersine, güneybatı Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya ve Brezilya'daki alanların çoğunluğu, geçen yüzyılda kanıtlandığı gibi, *T. granarium* istilası ve yayılışı için oldukça uygun kabul edilmektedir (Day ve White 2016). *T. granarium* yayılışı Şekil 2.5'te verilmiştir.

Trogoderma granarium, ülkemizde özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesinde depolanmış buğdaylarda önemli oranda ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Mutlu vd. 2019).



Şekil 2.4 *T. granarium* yayılışı

Kırmızı daireler, Khapra böceğinin dünyadaki ülke bazında dağılımını gösterir. Mavi daireler, geçen yüzyıl boyunca giriş limanlarının ötesinde khapra böceği istilasının olduğu ve yok edildiği bilinen ya da şu anda meydana geldiğine dair herhangi bir kayıt bulunmayan ülkeleri göstermektedir. 35° kuzey enlemi ve 35° güney enlemi çizgileri, khapra böceği popülasyonlarına uygun koşullar bulundurma olasılığı en yüksek olan coğrafi bölgeyi kapsar (Athanassiou vd. 2019)

2.5 Trogoderma Granarium'un Mücadelesi

Çoğu laboratuvar tarafından *T. granarium* zararlısının girişini engelleyen karantina kısıtlamaları nedeniyle zararlıyı kontrol etmek için kimyasal ve kimyasal olmayan yöntemler üzerine araştırmalar, diğer depolanmış ürün zararlıları kadar kapsamlı değildir.

Bu nedenle, bazı temel yöntemlerin ve yeni aktif bileşenlerin etkinliği hakkında son zamanlarda bilgi eksikliği vardır. Bununla birlikte araştırmalar, *T. granarium*'un diğer depolanmış ürün böcek türleri için genellikle etkili olan kontrol önlemlerinin çoğuna toleranslı olduğunu göstermektedir.

2.5.1 Kimyasal insektisitler

Yirminci yüzyılın son kırk yılı boyunca yapılan çalışmalar, modern organofosfatların (OP), piretroidlerin ve diğer tahıl koruyucu insektisitlerin kalıntı aktivitesini değerlendirmiştir, ancak bunların çoğu artık birçok ülkede kullanım için izinli değildir. Kayıtlı tahıl koruyucu insektisitlerle yapılan son çalışmalar, OP insektisit pirimifos-metil ve diatomlu toprağın piretroidlerden, böcek büyüme düzenleyicilerinden (IGR'ler) ve spinosaddan daha etkili olduğunu göstererek; *T. granarium* ve *T. variabile*'nin büyük larvaları her ikisine de küçüklere göre daha toleranslı olduğu bulunmuştur (Athannassiou vd. 2015; Ghimire vd. 2017; Kavallieratos vd. 2017). Binalardaki yüzeylere böcek öldürücülerin uygulanması, liman girişlerinde ortaya çıkan *T. granarium*'un yerleşmesini ve yayılmasını önlemeye yardımcı olabilir. Pirol klorfenapir, OP'ler ve piretroidlerin yüzey işlemleri, IGR'ler ve spinosaddan çok daha etkili bulunmuştur (Kavallieratos vd. 2016). Bu sonuçlar, boş konteynerlerin işlenmesi, yükleme ekipmanı ve yükleme yapıları gibi önemli ihracat planları, karantina ve sevkiyat öncesi stratejiler için daha fazla kullanılabilir.

Metil bromür (MB), karantina zararlıları mücadelesi için çok etkili bir fumiganttır ve khapra böceği için önerilen oranlar, karantina güvenliği için diğer depolanmış ürün

zararlılarına (Bond, 1984) kıyasla genellikle iki kat daha yüksektir. Tüm *T. granarium* yaşam aşamalarını kontrol etmek için gereken konsantrasyon, 15°C'ten yüksek sıcaklıklarda 600 g hm−3'lük bir konsantrasyon-zaman ürünü (CTP; saat cinsinden işlem süresi ve işlem boyunca gaz konsantrasyonu) olarak önerilmiştir (Bogs, 1976). Ülkemizde metil bromürün tarımda kullanımının azaltılması hakkında yönetmelik madde sekize göre Montreal Protokolü ve değişiklikleri uyarınca üretimi, tüketimi ve ticareti kontrol altına alınan MeBr'ün 01/01/2007 tarihine kadar zirai karantina ve taşıma öncesi kullanımlar dışındaki tüketimi sıfırlanmış olacağı bildirilmiştir. 2015'te aşamalı olarak sona ermesine rağmen, MB, karantina kullanımları için bir istisna olarak kullanılmaya devam ediyor, ancak bu feragatin geleceğine ilişkin endişeler, MB alternatifleri hakkında daha fazla araştırmayı gerekli kılmıştır. Fosfin, *T. granarium* (Lindgren vd. 1958) için etkili bir fumiganttır, ancak MB'den daha uzun maruz kalma süresi (3 günden fazla) ve ılık sıcaklıklar (25°C'nin üzerinde) gerektirir (Bell ve Wilson 1995).

Champ ve Dyte (1976) *T. granarium*'un malathion, lindan, metil bromür ve fosfine dirençli olduğunu bildirirken, diğerleri deltametrin, diklorvos ve pirmifosmetile direnç bildirmiştir (Kumar vd. 2010). Borah ve Chahal (Borah ve Chahal 1979) khapra böceğinin dirençli ve duyarlı suşlarını farklı uygulamalara maruz bıraktıklarında fosfine karşı sık direnç gelişimi tespit edilmiştir. Hassas Populasyon %84-94 iken dirençli populasyon %5-12 oranında larva ölümü rapor edilmiştir. Pakistan'da yapılan bir araştırmaya göre, khapra böceği, fosfin fümigasyonundan üç ay sonra silolarda bulunan açık ara en yoğun zararlı türü iken; bununla birlikte, işlemden önce popülasyon büyüklüğü, *Rhyzopertha dominica* ve *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)'dan daha düşük bulunmuştur (Mahmood vd. 1996).

2.5.2 Diğer mücadele yöntemleri

Depolanmış ürün böceklerinin birçok türünü kontrol etmek için yüksek sıcaklıklar kullanılabilir. *T. granarium*, subtropikal kökenine rağmen bilinen belki de en soğuğa dayanıklı depolanmış ürün böcek türüdür. -15°C'de probit-9 seviyesinde (%99,9968) diyapozdaki larvaları öldürmek için gereken süre 70 gün olarak belirlenmiştir ve aynı

öldürme oranına ulaşmak için -20°C'de 15 güne kadar devam edebilir (Wilches 2016, 2017). *T. granarium*'un soğuğa toleransı, tipik sıcak ve kuru ortamlarında bir avantaj olan kurumaya adaptasyona bağlanabilir (Sinclair vd. 2013). Larva iklimlendirmesi, dünyanın birçok yerindeki depolama tesislerinde birkaç haftada (Wilches 2016) 4°C ile 15°C arasındaki sıcaklıklara maruz kaldıktan sonra meydana gelir. Bu nedenle *T. granarium* için düşük sıcaklıkta karantina mücadelesi makul olmayan uzun bir maruz kalma süresi gerektirecek ve çok pratik olmayacaktır. *T. granarium* aşırı derecede ısıya toleranslıdır (Wilches 2016, 2017). Çoğu böcek türünün 50°C'ye maruz kalması birkaç saat sonra genellikle %100 öldürücüdür, bu nedenle ısıl işlem protokolleri genellikle saatler ile günler için 45°C olarak belirtişmiştir (Fields 2002). *T. granarium*'u kontrol etmek için önemli ölçüde daha yüksek sıcaklıklara ve daha uzun maruz kalma süresine ihtiyaç vardır (Wilches 2016). Diyapozdaki larvalarının ısıya en dayanıklı yaşam aşaması olduğu belirtilmiştir. Diyapoz halindeki larvaların ölmesini sağlamak için probit-9 analizlerinden tahmin edilen maruz kalma süresi 45°C'de 397 saat, 50°C'de 7 saat ve 60°C'de 1,2 saattir (Wilches 2016). Bu nedenle, kapalı ve yalıtılmış bir odada *T. granarium* için ısıl işlem birkaç saat boyunca 50°C veya daha yüksek olmalıdır, ancak bu aynı minimum sıcaklığın bir deponun tüm bölümlerinde elde edilmesi son derece zor olacaktır. *T. granarium*'un aşırı sıcaklıklara toleransı, standart ısı ve soğuk muamelelerini kullanarak kontrolünde ciddi zorluklar yaratır ve aşırı çevresel koşullarda hayatta kalmak için diyapozdaki larvaların adaptasyonuna olanak sağlar. Kontrollü veya değiştirilmiş atmosfer koşulları, *T. granarium* için geleneksel kontrol yöntemlerine alternatif olabilir. %100 CO_2 uygulamasına kıyasla %60-80 CO_2'nin *T. granarium*'a karşı daha etkili olduğu bulunmuştur (Lindgren ve Vincent 1970). 20°C veya 30°C'de %60 bağıl nem ile %60 CO_2 konsantrasyonu, yumurta, pupa ve erginlerin 6 gün içinde öldürülmesini sağlarken, aynı koşullarda larvaların kontrol için 16 güne ihtiyacı olduğu bulunmuştur (Spratt vd. 1985). *T. granarium*'un kontrolü için düşük oksijen ile mücadele oluşturmak için nitrojenle temizlemenin çok etkili olduğu, yumurtaların en hassas biyolojik dönemi olduğu bunu larva ve pupa dönemleri izlediği kanıtlanmıştır (Athanassiou vd. 2019). Yüksek sıcaklıklarda ya yüksek CO_2 ya da düşük O_2 kullanan mücadeleler, *T. granarium* larvalarına karşı oldukça etkili olabilir (Navarro vd. 2002). Khapra böceğinin biyolojik kontrolü geniş çapta çalışılmamıştır, ancak bir dizi biyolojik kontrol ajanının khapra böceği ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Protozoan *Mattesia*

trogodermae Canning (Protozoa: Neogregarinida), *Trogoderma* (Stibick 2007) cinsindeki türlerin bir paraziti iken, nematod *Steinernema masoodi* (Rhabditida: Steinernematidae) *T. granarium*'a karşı etkili olmuştur (Ali vd. 2011). *Xylocoris flavipes* (Reuter) (Hemiptera: Anthocoridae), *T. granarium* larvalarının (Rahman vd. 2009) kozmopolit bir avcısıdır, avcı akarların ise *T. granarium*'un yumurtaları ile beslendikleri bilinmektedir (Rahman 1942). Bu zararlının en aktif parazitoitlerinden biri *Anisopteromalus calandrae* (Howard) (Hymenoptera: Pteromalidae) olarak bulunmuştur (Ahmed 1996). Birçok İran *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) izolatı, khapra böceği erginleri ve larvaları için patojeniktir (Khashaved vd. 2011). Ayrıca *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacilli: Bacillaceae) khapra böceği larvalarına karşı çok etkili bulunmuştur (Ahmedani vd. 2007). Her ne kadar parazitlerin ve avcı böceklerin popülasyonları, khapra böceği popülasyonlarının düzenlenmesinde küçük bir rol oynayabilse de (Bains vd. 1974), Khapra böceği için doğal düşmanlar ve patojenler hakkındaki bilgiler, bu zararlının IPM sistemlerinde biyolojik kontrolünü teşvik etme potansiyeline sahiptir. Dodanlı ve Mutlu (2020) son yıllarda ülkemizde tarımsal mücadelede önemli hale gelen diyatom toprağının *T. granarium* larvalarına karşı biyolojik etkinliğinin araştırılması maksadıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma kontrollü şartlarda iki farklı nem %50-65 ve sıcaklık (25°C ve 30°C) ortamında, ithal marka SilicoSec® ve yerli (Aydın, Ankara illeri) diyatom toprakları olmak üzere dört farklı dozda (2000, 1500, 1000 ve 0 ppm), dört tekerrürlü olacak şekilde yürütülmüştür. Sonuçta yerli diyatom topraklarımızın SilicoSec®'e göre daha fazla oranda *T. granarium* larvalarını öldürdüğü ve ümit vadettiği ortaya koyulmuştur.

2.6 Diyapoz

Bazı böcek türleri çevrelerindeki mevsim değişikliklerine farklı mekanizmalarla uyum sağlayabilirler. Örneklersek kış aylarında elverişsiz hava şartlarında birçok böcek elverişli hava şartlarının bulunduğu yerlere göç ederek bazı diğer böcek türleri ise gelişmelerinin belirli dönemlerinde metabolizmalarını yavaşlatarak veya diyapoz dönemine girerek bu elverişsiz çevre şartlardan kurtulmayı hedefler (Tunaz 2004).

Diyapozun birçok tanımı yapılmıştır. Bilim insanları tarafından yapılan bazı tanımlar aşağıda verilmiştir:

"Olumsuz çevresel koşullarla eş zamanlı olarak fizyolojik bir mekanizma tarafından böcek gelişmesinin durdurulmasıdır" (Beck vd. 1962).

"Çevresel uyaranlara cevaben genetik olarak belirlenmiş, nörohormonal aracılı, düşük aktiviteli dinamik bir durumdur" (Tauber vd.1986).

"Bazı böceklerin yaşamlarında hayati bir yer tutan ve kelime anlamı ara verme, dinlenme veya duraklama olan diyapoz özellikle, üreme ve gelişim faaliyetlerini yılın belirli bir zamanında gerçekleştiren böcekler için ciddi avantaj sağlamaktadır" (Denlinger 2008).

Diyapoz böceklerde dinamik bir aşamadır bu aşama diyapoz öncesi safha, diyapoz safhası ve diyapoz sonrası safha olmak üzere üç kısımda gerçekleşir (Danks 2000; Kostal 2006). Ergin dönemde diyapoza giren böceklerde diyapoz safhasındaki başlıca besin deposu yağ dokusudur. Bu yağ dokusu aynı zamanda diyapoz sonrası dönemde gerçekleşen üreme ve çoğalma gibi aktiviteler için de enerji kaynağıdır (Hahn ve Denlinger 2007). Yağ dokusundaki besin depolarının gelişmesi ise böceğin beslenme durumu ile yakından ilişkilidir (Fliszkiewicz ve Wilkaniec 2007).

Diyapoz dönemi bazı böcek türlerinde zorunlu iken bazı türlerde zorunlu değildir. Diyapoz dönemini bu açıdan inceleyecek olursak;

Zorunlu (obligatory) diyapoz: Bazı böcek türlerinde diyapoz zorunludur. Her kuşakta, her birey gelişim sürecinde yaşanan çevre koşullarına bakılmaksızın yaşamın bir bölümünde diyapoz dönemine girer. Bu türler yılda bir kuşağa sahiptirler ve univoltin olarak tanımlanırlar (Beck 1980).

Zorunlu olmayan (facultative) diyapoz: Çok sayıda tür ise isteğe bağlı diyapoz gösterir. Bu gruptaki böcekler gelişimlerinin bazı kritik evrelerinde çevre koşullarına (gün uzunluğu, sıcaklık, nem, besin) bağlı olarak diyapoz sürecine girebilir veya girmeyebilir. Bu türler yılda iki veya daha fazla generasyon üretebilirler ve multivoltin olarak adlandırılırlar (Beck 1980).

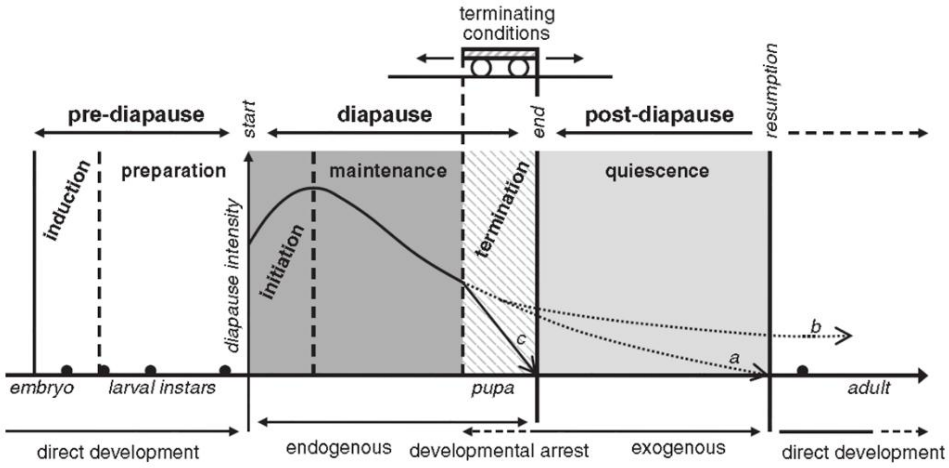
Genetik olarak heterojen bir populasyonu olan *T. granarium*'da beslenmenin, ısının ve populasyon yoğunluğunun diyapoza etkisinin araştırıldığı çalışma; gerçek diyapozun yanında besine dayalı diyapozun olduğunu göstermiştir (Nair ve Desai 1972).

Fizyolojik ve ekolojik mekanizmalarına göre, diyapoz üç tipe ayrılabilir: parapaus (her türde belirli bir dönemde ortaya çıkan zorunlu kalıtsal gelişme veya aktivitenin durdurulması), oligopoz (gelişme veya aktivitenin durdurulması tüm bu periyotlar için benzer şekilde başlatma, koruma ve sonlandırma kontrolü) ve eudiapause (örneğin fotoperyot ve soğutma yoluyla farklı başlatma ve sonlandırma kontrol mekanizmalarına sahip gelişimsel aktivitenin fakültatif olarak durdurulması) (Gill vd. 2017).

2.6.1 Diyapozun aşamaları

Diyapoz üç aşamada gerçekleşmektedir; bu aşamalar ön diyapoz fazı, diyapoz fazı, diyapoz sonrası fazdır. Diyapozun aşamaları Şekil 2.6'da verilmiştir.

Ön diyapoz fazı: Tetikleme fazı (indüksiyon), hazırlık fazı
Diyapoz fazı: Başlama fazı, koruma fazı, sonlandırma fazı
Diyapoz sonrası faz: Durgunluk (quescence) fazı



Şekil 2.5 Diyapozun aşamaları(Koštál 2006)

2.6.2 Diyapozu etkileyen faktörler

Sıcaklık, fotoperiyot, ışık, besin, su veya nem gibi diyapozun tamamlanmasında çok önemli rol oynayabilecek birçok çevresel faktör vardır. Böceklerin mevsimsel ekolojisi üzerine yapılan çalışmaların çoğu sıcaklık ve fotoperiyot üzerine odaklanmaktadır.

2.6.2.1 Fotoperiyot

Diyapozun tetiklenmesi, fotoperiyot fazlarına ve scotophase süresine (ışık ve karanlık döngüsündeki karanlık faz) bağlıdır. Böcekler diyapozu bir süre fotoperiyot ile sürdürler, ancak değişen sıcaklık ve diğer çevresel faktörler diyapoz üzerindeki fotoperiyodik etkileri değiştirir (Tauber ve Tauber 1976).

Böcekler, diyapozun düzenlenmesi için fotoperiyodu kullanmanın birçok yolunu geliştirmişlerdir (Beck vd. 1980). Popülasyonun %50'sinde yanıt uyandıran fotoperyod kritik fotoperyod olarak adlandırılır. Örneğin, *Meleoma signoretti*'nin (Neuroptera: Chrysopidae) fotoperyodik aralığı, diyapoz indüksiyonu için 15 saat ile 16 saat arasında ışık/gün ve diyapozun sonlandırılması için günde 12 saat ile 14 saat arasındadır (Tauber vd. 1984). Uzun gün tipi ve kısa gün tipi olmak üzere iki tür yanıt eğrisi önerilmiştir:

Uzun gün tipi yanıtı, uzun gün koşullarında yetişen, gelişen ve üreyen, kısa günlerde diyapoza giren böceklerin kategorisidir (Beck 1980).

Kısa gün tipi daha az yaygındır ve uzun gün koşullarına yanıt olarak yazlayan böceklerde gösterilmiştir (Beck 1980, Masaki 1980).

Fotoperiyodik değişikliklere dayanarak, böcek tepkileri dört sınıfa ayrılabilir:

(1) Günün uzunluğunun önemli olmadığı türler; Bu türler, yalnızca kritik fotoperyodla ilişkili olarak gün boyu sürebilir. Örneğin, akar *Panonynchus ulmi* (Acarina: Tetranychidae), sabit kısa gün koşulları altında diyapoza girer. Kritik fotoperyodun üstünde gündüz uzunluğundaki bir artışın veya azalmanın diyapoz indüksiyonu üzerinde önemli bir etkisi yoktur (Tauber vd. 1984).

(2) Diyapozun indüksiyonu veya devamı için kritik fotoperiyot boyunca gün boyu yanıt veren türler; Bu türlerde, sabit fotoperiyotlar (sürekli uzun veya kısa günler) diyapoz oranında azalmaya neden olur. Bununla birlikte, hassas evre deneyimleri gün boyu kritik sürenin altına kısa günler düştüğünde, diyapoz başlatılır. Bu tür cevaplara gün boyu kısa gün yanıtı denir ve *Heliothis zea* (Lepidoptera; Noctuidae) (Roach ve Adkisson 1970) ve *Nomadacris septemfasciata*'da (Orthoptera: Acrididae) gösterilmiştir (Norris ve Richards 1965).

(3) Gün uzunluğuna kritik fotoperiyot boyunca diyapozun önlenmesi veya sonlandırılmasıyla tepki veren türler; Hassas evre deneyimleri kısa günlerden (kritik fotoperiyodun altında) kritik sürenin altındaki uzun günlere kadar gün boyu artarsa, diyapoz önlenir veya sonlandırılır. Bu yanıt türü, gün boyu kısa yanıt olarak adlandırılır. Bu tür bir cevap, çeşitli univoltin (yılda tek döl veren) böcek türlerinde bildirilmiştir (Tauber vd. 1984).

(4) Kritik bir fotoperiyot olmadan gün boyu değişikliklere cevap veren türler olarak bildirilmiştir. Yukarıdaki üç kategoride, türlerin yanıt verebilmesi için en az bir kritik fotoperiyot söz konusudur.

Fotoperiyodun, diyapoz öncesi ve diyapoza girmeyen bireylerde gelişimi ve doğurganlığı etkilediği bilinmektedir (Masaki 1978). Kısa gün uzunlukları, ergin *Leptinotarsa decemlineata*'da (Coleoptera: Chrysomelidae) uzun yumurtlama periyodundan sonra diyapozu yeniden indükleyebilir ve bu uzun ömürlü erginler diyapozda ikinci bir kışı geçebilir (De Wilde vd. 1959).

2.6.2.2 Sıcaklık

Fotoperiyotdan sonra sıcaklık, diyapozu çeşitli şekillerde etkileyen önemli bir faktör olarak kabul edilir: (1) sıcaklık, bazı türlerde başlıca bir diyapoz indükleyici faktördür; (2) bazı türlerde, diyapozun korunması için önemlidir; (3) diyapozun sonlandırılmasında aktif bir uyaran olabilir. Diyapoz sonrası popülasyon büyüme oranının düzenlenmesinde büyük rol oynar (Beck vd. 1962).

Kış uykusundaki böcekler, aşırı düşük sıcaklıklara tolerans göstermelerine yardımcı olan birkaç fizyolojik ve davranışsal adaptasyon geliştirmiştir. Bu adaptasyonlar sıfır altı sıcaklıklardan korunmalarına yardımcı olan diyapozlarla ilişkilidir. Böceğin soğuğa genel toleransını belirleyen iki ana fizyolojik mekanizma şunlardır: aşırı soğutma (vücut sıvılarının donma noktasının altındaki sıcaklıklara, vücut sıcaklığını düşürerek donmaya karşı direnç) ve donma toleransıdır (vücut sıvılarının donmasına rağmen hayatta kalma). *Trichiocampus populi* (Hymenoptera: Tenthredinidae) gibi bazı böcekler, süper soğutma noktasının altındaki sıcaklıklarda donmalarını sağlamaya yardımcı olan yüksek soğuma noktalarına sahiptir.

İç Moğol bozkırlarında, altı sabit sıcaklığın (15, 20, 25, 30, 35 ve 40°C), altı çekirge türünde diyapoz sonrası embriyonik gelişme üzerindeki etkilerini belirlemek için bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada *Omocestus hemoidalis* (Orthoptera: Acrididae), *Calliptamus abbreviatus* (Orthoptera: Acrididae) ve *Chorthippus fallax* (Orthoptera: Acrididae) , *O. hemoidalis*'in daha düşük bir sıcaklık aralığında, *C. abbreviatus*'un orta sıcaklık aralığına ve *C. fallax*'a daha yüksek bir sıcaklık aralığında ambarlara adapte olduğu bulunmuştur. Sonuçlar ayrıca *C. fallax* ve *O. hemoidalis*'in *C. abbreviates*'den daha geniş adaptif sıcaklık aralığına sahip olduğunu göstermiştir (Hao

ve Kang 2004). Yüksek sıcaklığın ayrıca, estivasyon sırasında bazı böceklerde diyapoza neden olduğu bildirilmiştir (Masaki vd. 1980).

Diyapozun sona ermesinden sonra, böcekler normal gelişme aşamasına girerler. Bu noktada, böcekler uygun besini buldukları takdirde, sıcaklık genellikle diyapoz özelliklerinin (örn. yağ depoları) kaybedilme oranını ve diyapoz sonrası gelişmenin gerçekleştiği hızı yöneten birincil çevresel faktördür (Tauber vd. 1976).

Fotoperiyot ve sıcaklığın diyapoz üzerine birlikte etkisini incelemek gerekirse:

Bazı böceklerde, sıcaklık kritik fotoperiyodu büyük ölçüde etkiler. Örneğin, *Acronycta rumicis* (Lepidoptera: Noctuidae), yetiştirme sıcaklığının her 5°C düşmesinde kritik fotoperiyot süresinin 1.5 saat uzadığı için kısa günde diyapoza giren böceklerdir. Bu yüzden daha uzun günlerde diyapozun engellenmesi için daha düşük sıcaklık gereklidir (Danilevskii 1965). Uzun gün böceklerinde, düşük sıcaklık diyapozu artırma eğilimindedir, yüksek sıcaklık ise bunu önleme eğilimindedir.

Sarcophaga argyrostomata (Diptera: Sarcophagidae), kritik gün uzunluğu 15°C ve 20°C'de 14 saat ışıktır, oysa ki sıcaklık 25°C'ye yükselirken herhangi bir fotoperiyotta diyapoz bulunmaz (Saunders 1976).

2.6.2.3 Nem

Yüksek ve sıfırın altındaki sıcaklıklarda hem kışlama hem de yazlama sırasında böcekler su stresine maruz kalırlar. Kuraklık sırasında iki ana fizyolojik mekanizma devreye girer: kurumaya direnç ve su kaybına tolerans. Örneğin, yazlama sırasında çekirge yumurtaları (*Austroicetes cruciata*) (Orthoptera: Acrididae) her iki mekanizmayı da göstermiştir.

Kuraklık koşullarında diyapoz; baskılanmış metabolizma, düşük su içeriği, diyapoz sırasında yüksek yağ birikimi ve mum salgılarının salgılanmasıyla sağlanan kurumaya

karşı direnci gerektirir. *Margarodes viitiumis* (Hemiptera: Margarodidae), balmumu kaplı gizlenmiş nimfinin kurak koşullarda 10 yıldan uzun süre dayanabileceğine önemli bir örnektir (Ferris 1919).

Bir araştırma sonucunda neme bağlı stimülasyonun, nemli yüzeyle sürekli temastan ziyade, içme yoluyla üretildiğini bulunmuştur (Okuda, 1990). Hem nemli hem de kurak koşullar diyapoz işleminde önemli rol oynar. Diyapoz sonrası morfogenezi devam ettirmek için su içeriği kritik bir seviyeye veya üstüne tekrar ulaşması gerekir. Sıcaklığa bağlı diyapozdan sonra, *Contarinia tritici* (Diptera: Cecidomyiidae) *ve Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae) larvalarının pupa dönemine geçiş için yüksek neme ihtiyacı vardır (Gehrken ve Doumbia 1996). *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae) yumurtalarında, diyapoz aşamasından morfolojik olarak ayırt edilemeyen "ikinci pasif aşamanın" gelişimi, diyapoz sırasında kaybedilen %10 neme tekrar ulaşmadan başlayamaz (Wardhaugh 1988).

2.6.2.4 Besin

Doğada besinin bulunması, böcekler için önemli bir mevsimsel işaret olabilir. Böcekler, kışlama kalitesini yöneten faktörler olarak gıda kalitesi ve miktarındaki değişiklikleri kullanmanın farklı yollarını geliştirmişlerdir (Masaki 1980). Besinler, çoğunlukla diyapoza giren böceklerde, önemli diyapoz düzenleyici faktör olarak gözlenmiştir. Birincil diyapoz düzenleyici faktör olabileceği gibi sıcaklık ve fotoperiyot ile birlikte rol oynayabilir. *Sminthurus viridis* (Collembola: Sminthuridae) *ve Halotydeus destructor* (Acarida: Penthaleidae) türlerinde konukçu bitkinin olgunluğunun diyapoz dönemini etkilediğini ortaya koymuştur (Wallace 1970).

Besinler, diyapozun süresi ve sıklığını değiştirerek böceklerdeki fotoperiyodik yanıtı değiştirebilir (Andrewartha 1952). *Panonynchus ulmi*, sadece kurumuş bitkilere uygun sıcaklık ve fotoperiyot koşulları altında yumurtalarını bırakırlar. Benzer şekilde *Leptinotarsa decemlineata*'da yaşlı patates yaprakları, normal uzun gün koşulları altında diyapoza neden olmuştur.

2.6.3 Diyapozun genetik regülasyonu

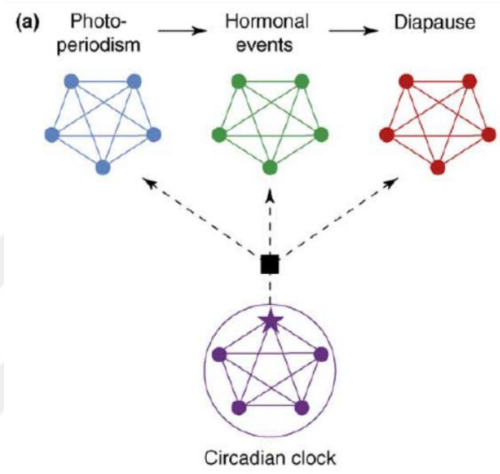
Diyapozun çevresel ve hormonel düzenleyicileri tanımlanmış olsa da diyapoz dönemi genetik regülasyonu konusunda araştırmalar başlangıç aşamasındadır. Birçok gen diyapoz sırasında kapatılmış olsa da, bazı genler özellikle bu dönemde ifade edilmektedir (Denlinger 2002). Analitik biyokimyada ve moleküler genetikte modern tekniklerin kullanılması diyapozun düzenleyici mekanizmalarını gizleyen kara kutuyu açmak için imkanlar sağlamıştır (Saunders vd. 2004).

Böcekler fotoperiyodu, diyapoz ile sonuçlanan hormonel olayları kademeli olarak başlatmak için kullanırlar. Fotoperiyodik yanıt, ışığın girişini, gündüz veya gecenin uzunluğunu değerlendiren bir zamanlayıcı, alınan uzun veya kısa günlük sinyallerin sayısını toplayan bir sayaç ve diyapozun hormonel kontrolüne giden bir sinyali içerir. Işığın girişinden çıkış sinyaline bu işlemlerin herbiri onları kontrol eden genlerde fotoperiyodik tepkiye neden olmak için etkileşime girer (Saunders 2002).

Saat genlerinden *per* en çok bilinen ve diyapozla bağlantılı olarak incelenen önemli bir gendir. *Per* tarafından kodlanan protein PER karanlık faz sırasında birikir ve *tim* geni tarafından kodlanan protein TIM ile birlikte bir dimer olarak hücre çekirdeğine girer. Hem PER hem de TIM seviyeleri fotofaz sırasında düşerken, TIM'in bozulması fotofazın başlangıcında ani olmasına rağmen, PER daha yavaş azalır. Bu proteinler diğer saat genlerinin ürünleriyle birlikte, sirkadiyen ritmikliğin oluşumuna katkıda bulunurlar. Çünkü diyapoz programlamanın sirkadiyen temelli olduğu düşünülmektedir (Saunders 1982, 2001).

Sirkadiyen saatin diyapozdaki rolüne bakıldığında sirkadiyen ritim; yaklaşık bir günlük süre ile endojen ve biyokimyasal bir salınımdır. Periyot ve salınım genliği ritmi oluşturur. Hücresel, fizyolojik ve davranışsal seviyelerde günlük zamanlamayı kontrol eder.

Hem sirkadiyen ritim hem de fotoperiyot ışık tarafından tetiklenir ve sirkadiyen saati ayarlayan ışık, TIM ve cryptochrome (CRY) proteinlerinin etkileşimini tetikler. Işık varlığında; CRY, TIM'i bağlar TIM bunun üzerine fosforile edilir ve bozulur. Işık yokluğunda; TIM birikmeye devam eder. Bu nedenle sirkadiyen saatin yokluğunda bile, TIM proteini gün boyu döngülenmeye devam eder. TIM daha sonra bir aralık sayacı olarak işlev görebilir ve diyapozun hormonel kontrolü için işaret sağlayabilir (Peschel 2009). Diyapoza neden olan genetik olayların şematik gösterimi Şekil 2.7'de verilmiştir.



Şekil 2.6 Diyapoza neden olan genetik olayların şematik gösterimi (Emerson vd. 2009)

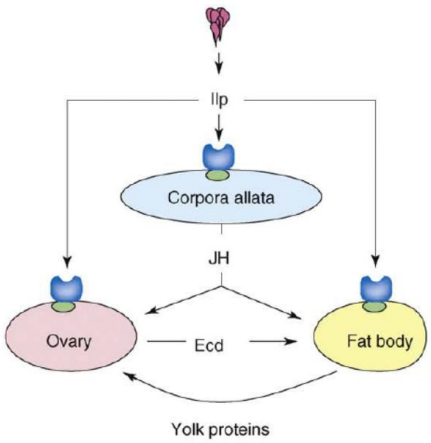
Diyapoz döneminde hazırlık fazı ilave yağ rezervlerinin ayrılmasını, kütikulanın su geçirmez hale getirilmesi için fazladan hidrokarbon tabakalarının biriktirilmesini veya diyapoz boyunca hemolenfte kalan depo proteinlerinin sentezlenmesini içeren fazdır. Bu evredeki olaylar son derece önemlidir, çünkü diyapoz için yeterince hazırlıklı olmamak diyapoz sonuna kadar hayatta kalma olasılığını azaltacaktır (Denlinger 2002).

Bir çalışmada yağ asitlerinin diyapoza olan etkileri araştırılmıştır. Khapra böceğinin stearik, oleik, palmitik ve linoleik asitleri içeren larvanın yağ asidi fonksiyonunun aynı türdeki larvada diyapozu sağladığını ve devamını gerçekleştirdiğini bulmuştur. Bunlardan en etkilisinin linoleik asit olduğunu belirtmiştir. Diyapoz dönemindeki ve henüz diyapoza girmemiş larvalarının yağ asidi bileşenleri karşılaştırdığında diyapozdaki larvaların palmitoleik, linoleik ve miristoleik asitlerce yoğun, palmitik asit içeriği bakımından ise yoğun olmadığı tespit edilmiştir (Ikan 1970).

Hazırlık fazında depolama proteinleri diyapozun başlamasından kısa bir süre önce meydana gelen, hemolenf içine salınan ve diyapoz boyunca bol miktarda kalan spesifik proteinlerin sentezidir. Diyapoz sonlandırıldığında hızla hemolenften kaybolurlar. Bu proteinler, depolama proteinleri olarak adlandırılan hekzamerik proteinlerdir.

Proteinler diyapoz sonlandırmanın hemen arkasından ortaya çıkan geniş doku gelişimi için önemlidir. Proteinler gelişimin diğer aşamalarında bulunabilirler, diyapoz olmayan bireyler de bulunabilirler. Buradaki fark, diyapoza giren böceklerin hemolenfinde bol miktarda bulunmalarıdır.

Diyapozda bazı hormonlar, diyapozun düzenleyicileri olarak hizmet eder, ancak tam olarak hangi hormonların dahil olduğu, türlere ve diyapozun gerçekleştiği gelişim aşamasına bağlıdır. *Bombyx mori*'de (Lepidoptera: Bombycidae) embriyonik diyapoz; dişi suboesophageal ganglionundan salgılanan bir nöropeptid olan diyapoz hormonunun etkisiyle indüklenir. Larva diyapozu sırasında sabit deri değiştiren Lepidoptera türlerinde JH titresi yüksek kalmıştır. JH tarafından diyapoz; yumurta olgunlaşmasının kesilmesi, yardımcı bezlerin körelmesi, uçuş kaslarının dejenerasyonu ve çiftleşme aktivitesindeki durma ile düzenlenir. Corpus allatumun salgısının aktivasyonu diyapozu sonlandırır; uçuş kasları yenilenir, çiftleşme aktivitesi artar ve yumurta olgunlaşması başlar (Denlinger 1985). Başlıca hormonel olaylar Şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.7 Başlıca hormonel olaylar(Emerson vd. 2009**)**

Bombyx mori'deki embriyonik diyapozun düzenleyicisi olan diyapoz hormonu (DH) dişinin suboesophageal ganglionundan dişinin soyundaki embriyonik diyapozu ortaya çıkarmak için salınan 24-aminoasit bir peptittir.

DH, gelişen yumurtalıklardaki trehalase aktivitesini uyararak diyapozu teşvik eder. Hızlı bir enjeksiyon, trehalase mRNA'sını arttırır ve trehalase aktivitesinde ortaya çıkan artış, olgun yumurtalarda diyapoz için ön şart olan yüksek seviyelerde glikojen üretir. Daha sonra glikojen, gliserol ve sorbitole dönüştürülür; bunlar diyapoza girmeyen yumurtalarda bulunmayan poliollerdir (Denlinger 2002).

Sarcophaga crassipalpis (Diptera: Sarcophagidae) pupa olmadan önce ekdisteroid titresi yüksektir ve ön hazırlık aralığı boyunca hem *Ecdysone receptor*'ü (*EcR*) hemde *Ultraspiracle'*ı (*USP*) kodlayan genler yüksek oranda eksprese edilir. Diyapozun başlangıcında, ekdisteroid titresi yoğun şekilde düşer ve diyapoz sona erene kadar tekrar yükselmez. İlginç şekilde *EcR*'nin ifadesi diyapoz boyunca devam eder fakat diyapoz sona erdiğinde daha da artar. Buna karşılık, *USP* ifadesi diyapoz başlangıcında yavaş yavaş azalır (Rinehart vd. 2001).

2.6.3.1 Gen ifadesi modelleri

Bazı genlerin diyapozdan etkilenmediği bildirilmiştir. Birçok genin bu kategoride olduğu düşünülmektedir. Diyapoza giren ve girmeyen bireylerin beyinlerinden elde edilen örneğin ifade seviyelerini karşılaştırmak için Northern blot analizi kullanılarak klonlar değerlendirildiğinde, klonların büyük çoğunluğunun her iki beyin tipinde de eşit şekilde ifade edidiği belirlenmiştir (Denlinger 2002).

Diyapoz sırasında kapatılan genlerin çoğu, düzenleyici olarak ilgi çekmektedir, çünkü bu genler durgunluğun veya metobolizmanın yavaşlamasının bir sonucu olarak ortaya çıkan olayları temsil eder (Denlinger 2002). Bazı genler diyapoz boyunca regüle edilir. Diyapoza girmeyen sineklerde transkript; ısı şoku ve soğuk şoku gibi çevresel streslere cevap olarak yüksek oranda ifade edilir ancak; diyapoza giren sineklerde, gen ifadesi

diyapozun başlamasıyla kolayca düzenlenir. İfade diyapozun başlangıcında yükselir ve 20°C gibi strese sebep olmayan sıcaklıklarda bile devam eder. Diyapozun sonlandırılmasından sonra 6 saat içinde, *Hsp23* azalarak ifade edilir. Böylece *Hsp23* diyapoz başlangıcında ve sonunda hızlı bir şekilde açılır ve kapatılır.

Diyapoz boyunca artan genler arasında erken diyapoz genleri bulunmaktadır. Erken diyapoz genleri, birkaç nedenden dolayı ilginç olabilir. Gelişimi durdurma süreçlerinde yer alan genleri temsil edebilir veya ekspresyondaki düşüşlerinin zamanlaması, yeni bir diyapoz fazına geçişi işaretleyebilir. Örneğin, *S. crassipalpis*'te diyapoz döneminin yarısını geçiren pupa, enerji kullanımı için lipidden lipit olmayan rezervlere geçiş yapar. Diyapozun ilk evresinde yer alan genler, pupadan sonraki evreye geçerken kapatılabilir.

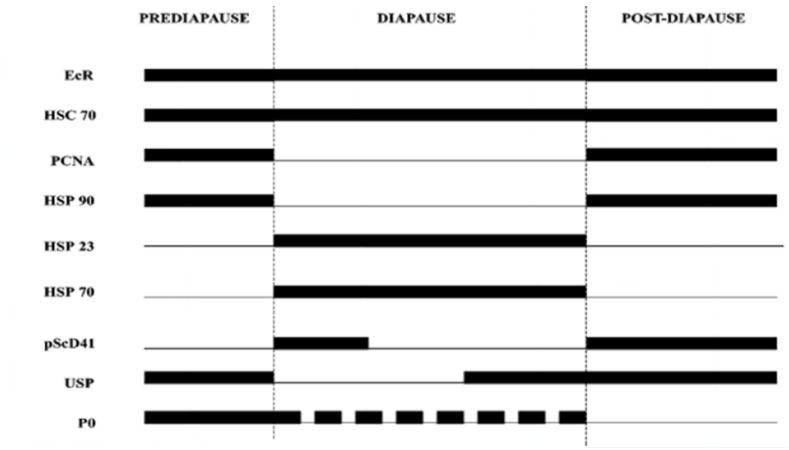
B. mori'de soğukta indüklenen bir gen olan *Samui*, erken diyapoz geninin bir örneğidir. Bu türlerde diyapozu sonlandırmak için 5°C'da iki aylık bir soğutma periyodu gerekir. Soğutmanın başlamasından birkaç gün sonra, ilk önce *Samui* ifadesi not edilir; yaklaşık 30 gün boyunca devam eder ve sonra diyapozun geri kalan kısmı için azalır. Bu gen tarafından kodlanan protein, bir BAG-domaini içerir ve muhtemelen *sorbitol dehidrojenaz* genini (*SDH*) aktive etmede rol oynar. *SDH,* embriyogenezin tamamlanması için diyapozun sonunda gerekli olan enerji rezervi sorbitolün glikojene dönüştürülmesi için kullanılır (Denlinger 2002).

Diyapozda geç olarak ifade edilen genler, diyapozun sonlandırılmasını sağlayan olaylara ve gelişimin sürdürülmesine veya diyapozun geç fazlarına özgü olaylara katkıda bulunmaktadır. *Ultraspiracle* (*USP*) bu tür bir gendir. *USP* ekspresyonu, *S. crassipalpis*'te erken pupa diyapozunda düşüktür, ancak geç diyapozda artmaktadır. Bu gen, bir ekdizon reseptörü olarak işlev gören proteinlerden birini kodlar ve ilginç bir şekilde, *USP* ifadesindeki artış, pupanın ekdisteroidlere karşı artan tepkisi ile çakışır. *USP*'nin geç diyapozdaki artışı, belki de pupanın diyapozun sonunda salınan, ekdisteroidlere cevap vermesini sağlayan hazırlık aşamasını temsil eder (Rinehart vd. 2001).

Diyapoz boyunca artan genler arasında aralıklı ifade edilen genler bulunmaktadır. Diyapoz sırasında belli metabolik olaylar periyodiktir. 25°C'de, bu infradian (sirkadiyen ritmden daha uzun) döngüleri yaklaşık 4 günlük bir periyodikliğe sahiptir, ancak düşük sıcaklıklarda döngü uzunluğu artar. Döngüsel periyodiklik erken diyapozda düşer, diyapozun ortasında artar ve diyapozun sonuna doğru tekrar düşer. Metabolizmanın bu şekilde açılıp kapanmasının temeli belirsizliğini korumaktadır, ancak muhtemelen metabolik mekanizmaların periyodik olarak ATP üretmek için aktif hale getirilmesi, metabolik işlemlerin sürekli olarak daha düzgün, fakat daha düşük bir seviyede çalışmasını sağlamaktan daha etkilidir. Oksijen tüketiminin döngüleri (JH) tarafından yönlendiriliyor gibi görünmektedir. JH titresi, döngü sırasında oksijen tüketiminde bir sonraki yükselmeyi tetikleyen bir eşiğe ulaşılana kadar artar (Denlinger ve Tanaka 1989).

Diyapozda stresten sorumlu genler diyapoz sırasında normal olarak ifade edilmezler, ancak bir tür çevresel stres kaynaklı zorluğa cevaben ifade edilebilir. Muhtemelen, çoğu savunma mekanizması diyapoz sırasında bozulmadan kalmaktadır. Örneğin, uzun süredir diyapozdaki böceklerin fiziksel yaralanmalara cevap olarak metabolik hızlarını hızla arttıracağı bilinmektedir ve bu yara iyileşme mekanizması tepkisi büyük olasılıkla söz konusu genlerin ifadesine yansır.

Sarcophaga crassipalpis diyapozu sırasında soğuk şoka maruz kaldığında regüle edilmiş olan bir ısı şoku proteini geni olan *Hsp90*, artan ifadeyle düzenlenir (Rinehart vd. 2000). *S. crassipalpis*'te pupa diyapozu dönemi için, temsili gen ifadesi kalıpları Şekil 2.9'da verilmiştir.



Şekil 2.8 Pupa diyapozu dönemi için, *Sarcophaga crassipalpis*'te temsili gen ifadesi kalıpları (Denlinger 2002)

Genlerin kodladığı proteinler diyagramın solunda belirtilmiştir. Kategoriler arasında, diyapozdan etkilenmeyen genler (*EcR* ve *Hsc70*), azalan genler (*PCNA* ve *Hsp90*), artan genler (*Hsp23* ve *Hsp70*), erken diyapoz genleri (*pScD41*), geç diyapoz genleri (*USP*) ve diyapoz sırasında aralıklarla ifade edilen genler (*PO*)

Diyapoz sona erdiğinde, gen ifadelerinde büyük değişiklikler göstermesi beklenir. Böcek, metabolizma hızını hızla arttırır ve hemen gelişimini başlatır. Böylece, gelişmeyi engelleyen mekanizmalara dahil olan genler kapatılır ve gelişmeyi başlatmaya katılan yeni gen kümeleri açılır.

Schotland ve Sehgal 2001 yaptıkları çalışmada, diyapozu kırma aracı olarak hekzan kullanılarak, seçili genlerin *Sarcophaga bullata*'daki (Diptera: Sarcophagidae) ifadeleri diyapoz sonlandırıldıktan sonra aralıklarla izlenmiştir. *Isı şoku protein* genleri, *Hsp23* ve *Hsp70*, her ikisi de hekzan muamelesinden 6 saat sonra azalarak ifade edilir. Diyapozda azalarak ifade edilen *Hsp90*, diyapozun sonlandırılmasından 12 saat sonra tekrar artan seviyelerde ifade edilir. Hücre döngüsü düzenleyicisinin ifadesi, diyapoz sırasında azaltılmış bir gen olan *PCNA*, hekzan uygulamasından sonraki 12 saat içinde 15 kat artar ve kısa bir süre sonra beynin bloke edilen hücrelerinin hücre döngüsüne yeniden girdiği görülebilir.

EcR için mRNA, hekzan uygulamasından 1 saat sonra yükselir, *USP* için mRNA hekzan uygulanmasından 9 saat sonra artar. *ECR* ve *USP* mRNA'ların ifadesindeki bu

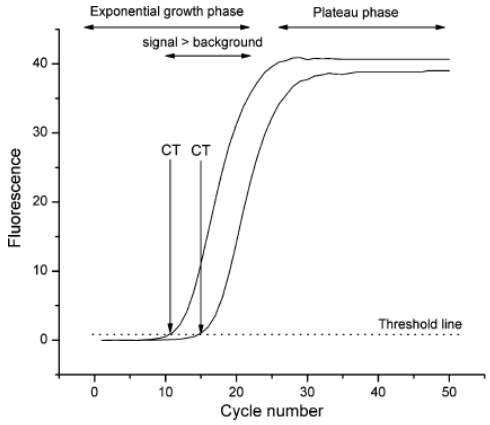
artış, hekzan uygulamasını takip eden ekdisteroid titresindeki yükselme ile ilişkilidir (Rinehart vd. 2001).

Diyapozun sona ermesini sağlayan moleküler olaylar bu noktada çok az bilinmektedir, ancak morfogenezi veya üremeyi başlatmak için gereken gen setlerinin aktivasyonuna yol açan sinyalleme sisteminin araştırılması önem kazanmıştır.

2.7 PCR [Quantitative PCR (qPCR)]

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Henry A. Erlich, Kary Mullis, Randall K. Saiki tarafından 1986 yılında; belirli DNA parçalarının, sıcaklık döngüsü boyunca *in vitro* olarak çoğaltılması için geliştirilmiştir. Real-time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonuyla paralel olarak artış gösteren floresan sinyalinin değerlendirilmesiyle, kantitatif sonuç elde edilebilen bir yöntemdir **(Şekil 2.10)**. Floresan okunması ve sıcaklık döngüleri aynı tüp ve aynı cihaz içinde gerçekleşmektedir. Böylelikle hedeflenen bölge, elektroforez cihazına gerek kalmadan kısa bir süre içinde belirlenebilmektedir.

Aynı cihaz içerisinde eş zamanlı olarak hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünleri tayin etme işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi avantajlı bir yöntem haline getirmiştir. Bunanla beraber test tamamlanana kadar tüpler açılmadığı için kontaminasyon riski azalmaktadır. Amplifikasyon sonrasında elde edilen ürün varlığının belirlenmesi Real-time PCR'da çeşitli şekillerde gerçekleştirilebilir. Bunlardan bir tanesi de özgül olmayan bir yöntem olan çift zincirli DNA florasan boyalarının kullanılmasıdır. Bu maksatla sıklıkla tercih edilen boya SYBR Green I'dir. Bu yöntemde çoğaltılan hedef bölgenin özgül olarak saptanması amacıyla işaretli problar kullanılır. Prob formatları arasında sıklıkla FRET (Fluorescens Resonance Energy Transfer), Taqman ve "Molecular Beacons" bulunmaktadır. SYBR Green I yöntemine ilerleyen bölümlerde değinilmiştir.

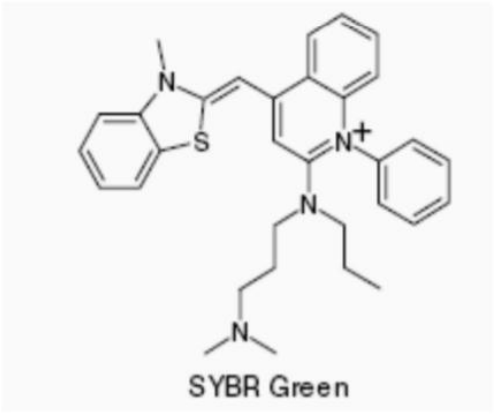


Şekil 2.9 qPCR amplifikasyonlarında kantitasyon döngüsü (quantification cycle, Cq)

qPCR yöntemi; mRNA seviyesinin sayısal veri olarak tespiti, patojenleri, tek nokta mutasyonlarını, DNA hasarını tespit edebilme, metilasyon tespiti, Tek nükleotit polimorfizmi (SNP analizleri) ve kromozom bozukluklarının saptanması gibi amaçlar için kullanılmaktadır (Logan ve Edwards 2009).

Bazı kantitatif PCR yöntemlerinde çift sarmallı DNA'nın miktar tayini için bir boya olarak kullanılır. Jel elektroforezinde DNA'yı görselleştirmek için de kullanılır. Mevcut DNA'yı görselleştirmek için agaroz jelleri boyamak için daha yüksek SYBR Green konsantrasyonları kullanılabilir.

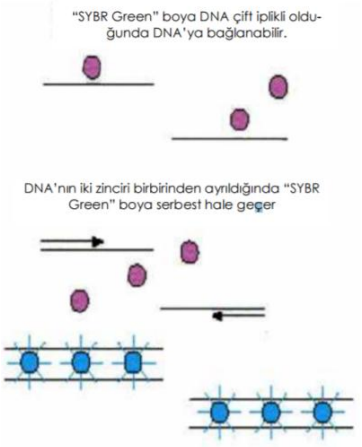
DNA'nın spesifik olmadığı durumlarda çoğaltımında "SYBR Green I" yöntemi kullanılır. Bu yöntemde floresan boya yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandığı için çoğalan DNA miktarındaki artışla birlikte realtime PCR cihazında okunan floresanın miktarı da artar. En fazla kullanılan boya türü olan "SYBR Green I" 520 nm dalga boyunda indirgenir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluğuna bağlanan boyanın 30 amplifikasyon döngüsünün ardından aktivitesinin sadece %6'sı düşer. SYBR Green I'in kimyasal yapısı Şekil 2.11'de verilmiştir.



Şekil 2.10 Asimetrik siyanin boya SYBR Green I'in kimyasal yapısı (Günel 2007)

Çoğaltımın başında reaksiyonda "SYBR Green I" boyası, çift zincirli DNA molekülü ve primerler bulunmaktadır. Henüz bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az miktarda floresan ışıma gerçekleştirir (Şekil 2.12). Primerler DNA'ya bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ardından floresan ışıma başlar. Başlangıçta ürün miktarı az olduğu için döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı da artar ve bu artış paralel olarak "real-time PCR" cihazının monitöründen gözlenebilir. Bu yöntem iyi tasarlanmış primerler ve doğru optimize edilmiş PCR şartlarında çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak sağlar. Maliyeti yüksek floresan işaretli problara ihtiyaç olmadığı için maliyet açısından avantajlıdır. Elbette bu yöntemin dezavantajları da bulunmaktadır. İstemediğimiz PCR ürünlerin çoğalmasıyla yine floresan ışıma meydana geleceğinden her zaman beklediğimiz DNA'nın çoğaldığını işaret etmez buna bağlı olarak yanlış pozitif sonuç almak mümkündür. Bunun dışında hedef DNA dizisi ortamda olmadığında primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda "primer dimer"leri olarak nitelendirilen çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ışıma gözlenebilir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlamak önemli olduğu için DNA'ların erime eğrisi analizleri ("melting curve", "dissociation") yapılması gerekmektedir. Bu amaçla erime eğrisi analizi başladığında PCR cihazı tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrıldığında floresan boya serbest kalır. Buna bağlı olarak okunan floresan miktarı düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı (Tm) derecesi vardır. Erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlı olarak değişmektedir. Primer dimerleri gibi spesifik olmayan ürünlerin

çoğalması durumunda aradığımız DNA parçasının Tm (erime sıcaklığı) derecesi arasında farklılık beklenmektedir. Tm derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü gen dizisi içermesi ve uzunluğu olmasındandır. Bu nedenle Tm derecesi her bir ürün için özeldir. Büyük oranda, bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde bu yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilmektedir.



Şekil 2.11 SYBR Green I yöntemi (Günel 2007)

3. MATERYAL VE YÖNTEM:

3.1 Materyal

Çalışmanın ana materyali *T. granarium*'dur. Böcekler Diyarbakır Zirai Mücadele Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Moleküler çalışmalar Ankara Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Entomoloji Labaratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.1 Araç ve gereçler

Bu çalışmada kullanılan araç ve gereçlerin listesi, bunların hangi amaçla kullanıldıkları Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1 Deney materyalleri

Adı	Kullanım amacı
Saf su cihazı	DNA izolasyonu ve PCR reaksiyonları için tampon çözeltilerin hazırlanması
Nanodrop	İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık derecelerinin belirlenmesi
Sıcak su banyosu cihazı	DNA izolasyonunun gerçekleşmesi
Çalkalayıcı (Vortex)	Tampon çözeltilerin hazırlanması ve DNA izolasyonu
Santrifüj	DNA izolasyonu ve PCR aşamalarında örneklerin kısa süreliğine çöktürülmesi
Hassas terazi	Tampon çözeltilerin hazırlanmasında sarf malzemelerin tartılması
Agaroz jel elektroforezi	DNA izolasyonu ve PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif tayini
Güç kaynakları	Agaroz jel elektroforezi
Jel görüntüleme sistemleri	DNA izolasyonu ve PCR ürünlerinin jelde görüntülenmesi ve bilgisayar ortamına aktarılması
Derin dondurucu (+4, -20, -80)	Örnek ve çeşitli sarf malzemlerinin saklanması
Steril DNA izolasyon kabini	Çeşitli tampon çözeltilerin hazırlanması, DNA ve PCR işlemlerinin steril ortamda yapılması
Otaklav	Deneylerde kullanılan malzemelerin izolasyonu
qPCR cihazları	RNA fragmanlarının polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye edilmesi

3.1.2 Tampon çözeltiler

Çalışmada agaroz jel elektroforezi jellerinin hazırlanmasında kullanılan tampon çözeltilerin içeriği ve miktarı çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Agaroz jel elektroforezi jellerinin hazırlanmasında kullanılan stok ve tampon çözeltiler

Tampon çözelti	**Molerite/miktar**	**İçerik**
TE Tampon Çözeltisi	10 mM 1mM	Tris EDTA
10X TBE Elektroforez/Jel Stok Tampon Çözeltisi	108.0 g 55.0 g 40.0 ml 1 lt'ye tamamlanır	Tris Borik asit 0.5 M EDTA (Ph: 8.0) Deiyonize ddH_2O
1X TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi	100 ml 1 lt'ye tamamlanır	10xTBE Deiyonize ddH_20

3.2 Yöntem

3.2.1 *Trogoderma granarium*'un yetiştirilmesi

Trogoderma granarium kültürünün yetiştirilme aşaması böcek yetiştirme odalarında pehlivan çeşidi ekmeklik buğday *(Triticum aest. var. aest.* L.*)* üzerinde, ortalama 32°C sıcaklık; %60 nem; 16/8 ışık koşullarında gerçekleştirilmiştir. Diyapozla ilişkili olduğu belirlenen genlerin *T. granarium*'un farklı biyolojik dönemlerindeki ifade analizleri de gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında ayrıca *T. granarium* bireyleri dönemlerine göre 1., 2. ve 3. dönem larva; ergin dişi ve erkek olarak elde edilmiştir. Ayrıca örnekler koşullarına göre soğuk baskısı, açlık baskısı, feces baskısı ve kalabalık baskısı altında yetiştirilerek elde edilmiştir. Kontrol grubunu 4. dönem diyapozsuz larvaları oluşturmuştur.

3.2.1.1 *Trogoderma granarium* bireylerinde soğuk baskısı uygulaması

Trogoderma granarium bireyleri %40 kırık dane içeren pehlivan çeşidi buğday üzerinde kültüre alınmıştır. Kültür açılmadan önce besi ortamı 55°C'de 3 gün etüvde tutularak olası zararlı bulaşıklığına karşı sterilize edilmiştir. Daha sonra 3 tekerrürlü olmak üzere her bir kaba 500 g besi ortamı ve 50 adet son dönem larva konularak 35±1°C sıcaklık %65±5 neme ayarlı iklim kabinine bırakılmıştır. Larvalardan ergin çıkışı gözlenmiş yumurta bırakmaları için erginler 7 gün süreyle kültür ortamında bırakılmıştır. Daha sonra erginler uzaklaştırılarak kültür oluşturulmuştur. Kültürdeki larvalar günlük olarak kontrol edilmiş ve 4. döneme ulaştıklarında sıcaklık 30°C'ye düşürülmüştür. Daha sonra haftada 5°C olmak üzere sıcaklık kademeli olarak düşürülmeye devam edilmiş, bu arada larvalar bir kısmı 4. dönemde bir kısmı ise 5. döneme geçerek gelişimleri durmuş ve diyapoza girmeye başlamışlardır. Elde edilen larvalarda soğuklatma işlemi +4°C kadar indirilmiş ve 6 hafta bu sıcaklıkta tutulmuştur.

3.2.1.2 *Trogoderma granarium* bireylerinde açlık baskısı uygulaması

Trogoderma granarium bireyleri %40 kırık dane içeren pehlivan çeşidi buğday üzerinde kültüre alınmıştır. Kültür açılmadan önce besi ortamı 55°C'de 3 gün etüvde tutularak olası zararlı bulaşıklığına karşı sterilize edilmiştir. Daha sonra 3 tekerrürlü olmak üzere her bir kaba 500 g besi ortamı ve 50 adet son dönem larva konularak 35±1°C sıcaklık %65±5 neme ayarlı iklim kabinine bırakılmıştır. Larvalardan ergin çıkışı gözlenmiş yumurta bırakmaları için erginler 7 gün süreyle kültür ortamında bırakılmıştır. Daha sonra erginler uzaklaştırılarak kültür oluşturulmuştur. Kültürdeki larvalar günlük olarak kontrol edilmiş ve 4. döneme ulaştıklarında besi ortamından alınarak içinde besin olmayan kaplara 3 tekerrürlü aktarılmış açlık stresine girmeleri için ilk hafta 2.5 g besin/25 larva ikinci hafta 1g besin/25 larva daha sonra hiç besin olmayan ortamda 6 hafta tutulmuşlardır.

3.2.1.3 *Trogoderma granarium* bireylerinde feces baskısı uygulaması

Trogoderma granarium bireyleri %40 kırık dane içeren pehlivan çeşidi buğday üzerinde kültüre alınmıştır. Kültür açılmadan önce besi ortamı 55°C'de 3 gün etüvde tutularak olası zararlı bulaşıklığına karşı sterilize edilmiştir. Daha sonra 3 tekerrürlü olmak üzere her bir kaba 500 g besi ortamı ve 50 adet son dönem larva konularak 35±1°C sıcaklık %65±5 neme ayarlı iklim kabinine bırakılmıştır. Larvalardan ergin çıkışı gözlenmiş yumurta bırakmaları için erginler 7 gün süreyle kültür ortamında bırakılmıştır. Daha sonra erginler uzaklaştırılarak kültür oluşturulmuştur. Kültürdeki larvalar günlük olarak kontrol edilmiş ve 4. döneme ulaştıklarında altına 1cm kapra dışkı ve gömlek artıkları serilmiş kültür ortamına 3 tekerrürlü alınarak burada 6 hafta beslenmişlerdir.

3.2.1.4 *Trogoderma granarium* bireylerinde kalabalık baskısı uygulaması

Trogoderma granarium bireyleri %40 kırık dane içeren pehlivan çeşidi buğday üzerinde kültüre alınmıştır. Kültür açılmadan önce besi ortamı 55°C'de 3 gün etüvde tutularak olası zararlı bulaşıklığına karşı sterilize edilmiştir. Daha sonra 3 tekerrürlü olmak üzere her bir kaba 500 g besi ortamı ve 50 adet son dönem larva konularak 35±1°C sıcaklık %65±5 neme ayarlı iklim kabinine bırakılmıştır. Larvalardan ergin çıkışı gözlenmiş yumurta bırakmaları için erginler 7 gün süreyle kültür ortamında bırakılmıştır. Daha sonra erginler uzaklaştırılarak kültür oluşturulmuştur. Kültürdeki larvalar günlük olarak kontrol edilmiş ve 4. döneme ulaştıklarında standart yetiştirme kabından alınarak 3.5 cm/6 cm'lik plastik kaplara aktarılıp her kapta 50 birey olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak kültüre alınmıştır. Bu şekilde 6 hafta beslenmişlerdir.

3.2.2 RNA İzolasyonu

Tez konusu olan diyapoz ile ilişkili olduğu bilinen 6 aday genin *T. granarium* örneklerindeki ifade miktarlarını belirlemek için SYBR Green floresan boya ve özgün primerler kullanılak qPCR çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla önce baskıda tutulan herbir örneğin total RNA ekstraksiyonu, daha sonra cDNA sentezi ve son olarak

kantitasyon çalışmaları için önce -80°C dondurucuda depolanan örneklerden total RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu amaçla, örnekler derin dondurucudan alınır alınmaz üzerlerine soğuk azot dökülerek steril çubuklarla ezilip total RNA ekstraksiyonuna geçilmiştir. RNA örnekleri qPCR çalışmalarında kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

Total RNA ekstraksiyon aşamaları:

Trizol Reagent (Invitrogen) kiti kullanılarak larvalardan RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

1) Mikrosantrifüj tüplerinde -80°C'de muhafaza edilen larva örneklerinin üzerine 200 µl Trizol Reagent eklenerek mikrosantrifüj tüpüne uyumlu steril ezici çubuk yardımıyla sıvı içerisinde homojenize edilmiştir.

2) Üzerine 800 µl Trizol daha eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra nükleoprotein yapılarının tamamıyla ayrışması için 15 ile 30°C'de 5 dakika bekletilmiştir.

3) 1 mL Trizol için 200 µl kloroform eklenerek kloroformun iyice karışması sağlanmış 15 ile 30°C'de 3 dakika bekletildikten sonra 4°C'de 15 dakika 12,000xg devirde santrifüj edilmiştir.

4) Santrifüj sonrasında en altta kırmızı, ortada fenol kloroform fazı ve en üstte renksiz faz olmak üzere 3 faza ayrılmıştır.

5) En üstteki renksiz sıvı yani RNA'nın bulunduğu kısım temiz bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine 0,5 ml izopropil alkol eklenerek örnekler 15 ile 30°C'de 10 dakika bekletilerek ardından 4°C'de 10 dakika 12,000xg devirde santrifüj edilmiştir.

6) Üstteki supernatan uzaklaştırılarak RNA peleti 75% ethanol ile yıkanmıştır. 4°C'de 5 dakika 7,500xg devirde santrifüj edilen pelet kurutulduktan sonra DNAse ile muamale edilmiş su ile çözülmüştür.

7) Elde edilen RNA'nın kalitesi ve miktarı spektrofotometre ve agaroz jel elektroforezi yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.3 Agaroz jel elektroforezi

Bu amaçla hassas terazide 1 g agaroz tartılarak 100 ml TBE tamponu içerisinde karıştırılıp, mikrodalga fırını kullanılarak ısıtılıp çözünmesi sağlanmıştır. Oda sıcaklığında soğumaya bırakılan karışıma pronasafe boyası eklendikten sonra, jel kasetine dökülüp, taraklar yerleştirilerek donması sağlanmıştır. Jel donduktan sonra, taraklar çıkartılarak, jel kaseti TBE tamponu içeren jel tankı içerisine yerleştirilmiştir. RNA örnekleri yükleme boyası ve marker ile jel kuyularına yüklendikten sonra, elektroforez 80 V'a ayarlanıp örneklerin 30 dk kadar yürütülmesi sağlanmıştır. 30 dk sonra jel translüminatör cihazında UV ışığında görüntülenerek fotoğraf alınmıştır.

3.2.4 cDNA sentezi

RNA örneklerinden yapılan cDNA sentezinin ilk aşamasında 1 µg RNA üzerine 1 µl oligo-dT primer eklenip, hacim ddH_2O ile 13 µl'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımı 65°C'de 10 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir. Denatüre örnek üzerine eklenen reaktifler aşağıda sunulan miktarlarda hazırlanmıştır. cDNA sentezi reaksiyon hazırlığı çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3 cDNA sentezi reaksiyon hazırlığı

Reaktif	**Hacim**
5x Transcriptor Reverse Transcriptase Reaksiyon Tamponu	4 µl
Protector RNase İnhibitör 40 u/µl	0,5 µl
Deoksinükleotid Karışımı (10 mM)	2 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase Enzimi (20u/µl)	0,5 µl
Toplam hacim	20 µl

Hazırlanan reaksiyonlar 55°C'de 30 dakika, 85°C'de 5 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi tamamlanmıştır. Sentezlenen cDNA ürünleri -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5 Kullanılacak genlerin seçimi

Trogoderma granarim larvalarına ait transkriptom veri analizi hizmet alımı yoluyla elde edilmiştir. Transkriptom veri analizine göre diyapozla ilişkili olan 6 gen bölgesi seçilmiştir (**Çizelge 3.4**). Seçilen bu 6 gen bölgesine göre primerler tasarlanmıştır. Housekeeping gen olarak *Alpha tubulin* kullanılmıştır.

Primerlerin seyreltilmesi:

1) qPCR'da kullanılacak primerlerin seyreltilmesi amacıyla başlangıçta kullanılacak primerler 10 saniye santrifüj edilmiştir.
2) 6 farklı gen için forward ve reverse olmak üzere toplamda 12 adet primer Data Sheet'te belirtilen oranlara göre saf su eklenerek seyreltilmiştir.
3) Seyreltme işleminin ardından primerler önce vortekslenip sonra santrifüj edilmiştir.
4) 10 µM derişim için ana stoktan 10 µl alınarak 90 µl saf su eklenmiştir. Primerler vortekslenip santrifüj işlemi yapıldıktan sonra muhafaza edilmek üzere -20°C'ye kaldırılmıştır. Kullanılan primerlerin bilgileri çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4 Kullanılan primerler

Primer sembolü	**Gen adı**	**Forward Primer (5'-3')**	**Reverse Primer (5'-3')**
PM	*peritrophic matrix protein 14 precursor*	AGTCGCACTCGTGTGGGTACTT	TGCGACTGGAGACACAACGTAAA
SP	*spidroin-1-like*	TGTTAGCGTGAGCGAAGGTTAC	TTGGGCGTAGTATGGGTATCTG
EC	*endochitinase A-like*	TTGGTGGTGTTGTCCGCTCTT	CAGGAACACTTCCTACGACACT
AP	*A-kinase anchor protein 14-like [Ceratitis capitata]*	TGGATAAGATGGGCGGAATGGT	TCGTACTCTTCTTCGGTGTTGC
ADH	*anti-diruetic peptide precursor*	GTCCGTAGATGTGTGGCTTGTAA	CTCCTTTGGCTGTCATTCCTCCA
TUB	*Alpha tubulin*	CACGGTTGGTGGTTGGTAGTTGA	TGGAGACGTAGTACCGAAAGATGT

3.2.6 qPCR analizi

Diyapozla ilişkili belirlenen hedef genlere spesifik primerler yardımıyla SYBR enzimi kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. qPCR analizlerinde hedef gen bölgelerinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek üzere, biyolojik ve teknik üçlü tekrarlar hâlinde reaksiyonlar hazırlanmıştır. qPCR analizi sonucunda farklı dönemlerden elde edilen CT değerleri, housekeeping genlere ait CT değerleri ile karşılaştırılmak üzere, $2^{-\Delta CT}$ formülü kullanılarak normalize edilmiştir. Farklı koşullardan elde elde edilen CT değerleri, housekeeping genlere ait CT değerleri ile karşılaştırılmak üzere, $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak normalize edilmiştir.

qPCR'da elde edilen verilerin analizinde mutlak ölçüm (absolute quantification) ve göreceli ölçüm (relative quantification) yöntemleri kullanılmaktadır. Mutlak ölçüm yönteminin analizinde ilgili transkriptin kopya sayısı genellikle bir standart eğri hazırlanarak belirlenir ve hesaplamalarda $2^{-\Delta CT}$ formülü kullanılır (Schmittgen ve Livak 2008, Dağeri 2016).

Göreceli ölçüm yöntemi ise çoğunlukla muamele çalışmalarında kullanılırken, analizin yapılmasında muamele edilmiş örneklerle birlikte, muamele edilmemiş bir kontrol grubu bulunmaktadır. Kontrol grubu referans alınarak gen ifadesinde meydana gelen değişimler tespit edilirken hesaplamalarda $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılmaktadır (Livak ve Schmittgen 2001, Dağeri 2016).

qPCR mix hazırlığı:

1) *Trogoderma granarium* örneklerinde ifadesi ölçülecek olan 6 gen için ayrı ayrı hazırlanmış olan primerler, diğer deney bileşenleri il 500 µl'lik mikrosantrifüj tüplerine aynı oranda eklenmiştir.
2) Tüplere öncelikle saf su eklenip sırasıyla; reaction buffer, primer, enzim, su koyularak, her bir bileşen eklendiğinde pipetaj işlemi yapıldıktan sonra vortex cihazıyla karıştırılmıştır.

3) Son solüsyon hazır olduğunda A1 kuyucuğundan başlanıp yukarıdan aşağıya doğru kuyucuklara hazırlanan mixten 7,5'ar µl koyulmuştur.
4) Kuyucuklara mixler koyulduktan sonra üzerlerine 2,5 µl cDNA örnekleri eklenmiştir. PCR plakasının en sağında yer alan A12 kuyucuğuna gelinerek negatif kontrol için yukarıdan aşağıya 6 gen için qPCR mixi eklenmiştir (cDNA eklenmemiştir). Kullanılan kimyasallar ve miktarları aşağıda çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5 qPCR mix hazırlığında kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	**1X**
H_2O	1,5 µl
SYBR Green Master	5 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
Toplam	7,5 µl
Örnek cDNA	2,5 µl
Toplam Hacim	10 µl

qPCR cihaz koşulları, ilk denatürasyon 95°C de 8 dk, daha sonra 55 döngü olacak şekilde denatürasyon 95°C'de 10 sn, bağlanma 63°C 20 sn, uzama 72°C'de 30 sn olacak şekilde ayarlanmıştır. Referans gen (housekeeping) olarak *Alpha tubulin* kullanılmıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 qPCR cihaz protokolü

Denaturasyon		**Amplifikasyon**			**Erime eğrisi**			**Soğutma**
Parametre								
Analiz modu	Yok	Kontifikasyon modu			Erime eğrisi modu			Yok
Döngü	1	55			1			1
Hedef **(°C)**	95	95	63	72	95	63	95	40
Süre	8dk	10sn	20sn	30sn	5sn	1dk	00	10sn

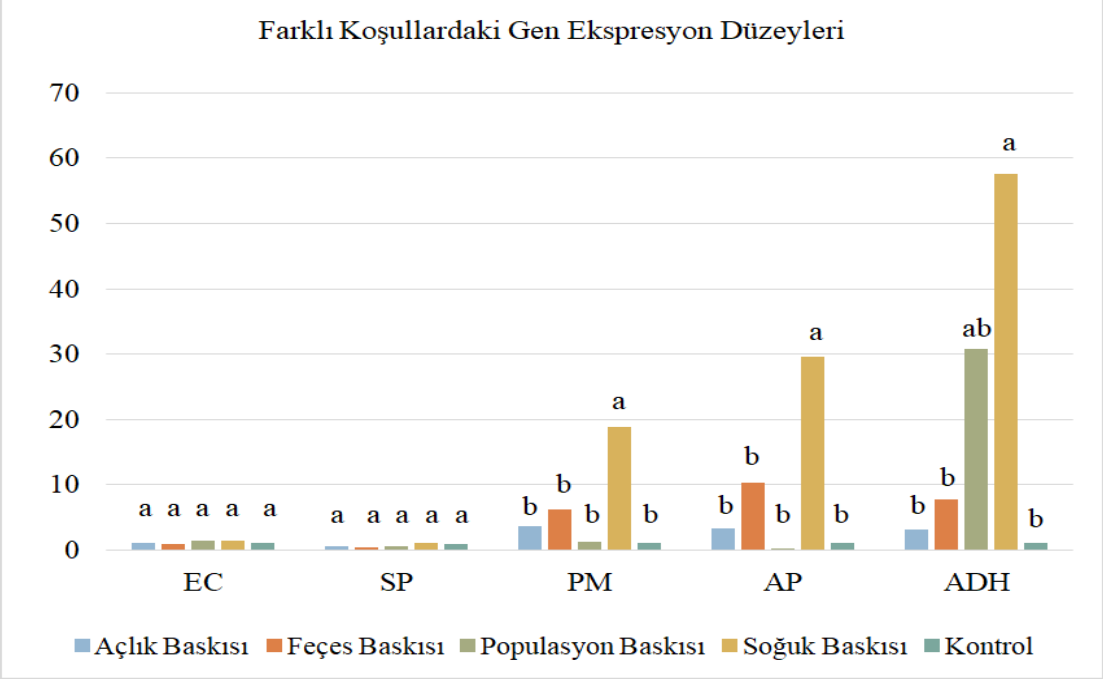
3.2.7 Veri analizi

Tez kapsamında q-pcr analizinden elde edilen normalizasyon sonuçlarındaki değerler ile istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. Değerler 3 biyolojik tekrar ve 3 teknik tekrar olacak şekilde elde edilmiştir. İstatistiksel analizler Minitab 16.0 (Minitab Ltd, Brandon Court, Birleşik Krallık) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Örnekler arasındaki istatistiksel anlamlılık, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey's Honest Significant Difference (HSD) testi ile belirlenmiştir. Kabul edilen anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak belirlenmiştir.

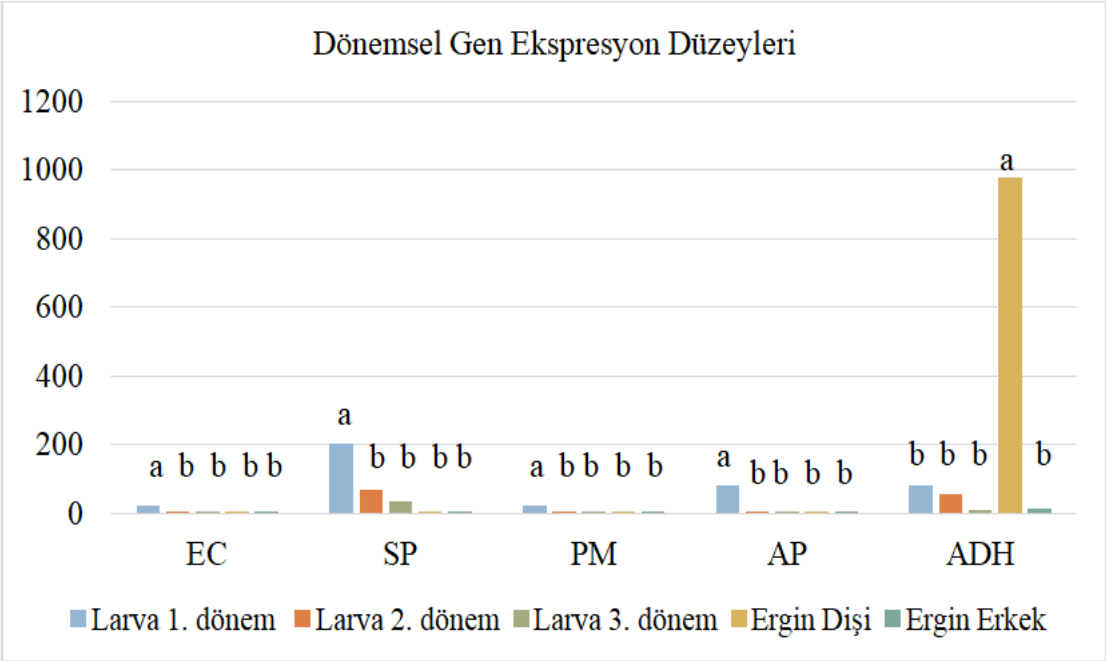
4. BULGULAR

4.1 Diyapozla İlişkili Genlerin Ekspresyon Analizleri

Trogoderma granarium'a ait *Endochitinase A-like, Peritrophic matrix protein 14 precursor, Anchor Protein, Spidroin, Antidiuretic hormone* genleri spesifik primerlerle qPCR tekniği kullanılarak ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin analizinde mutlak ve göreceli ölçüm yöntemi kullanılarak, ifade profilleri oluşturulmuştur (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Ekspresyon analizleri her gen için ayrı olarak değerlendirilmiştir. Çalışılan genlerin qPCR sonuçları şekil 4.3, şekil 4.8, şekil 4.11, şekil 4.14'te verilmiştir. Referans gen olarak kullanılan *Alpha tubulin*'in qPCR sonuçları Ek 1'de verilmiştir.

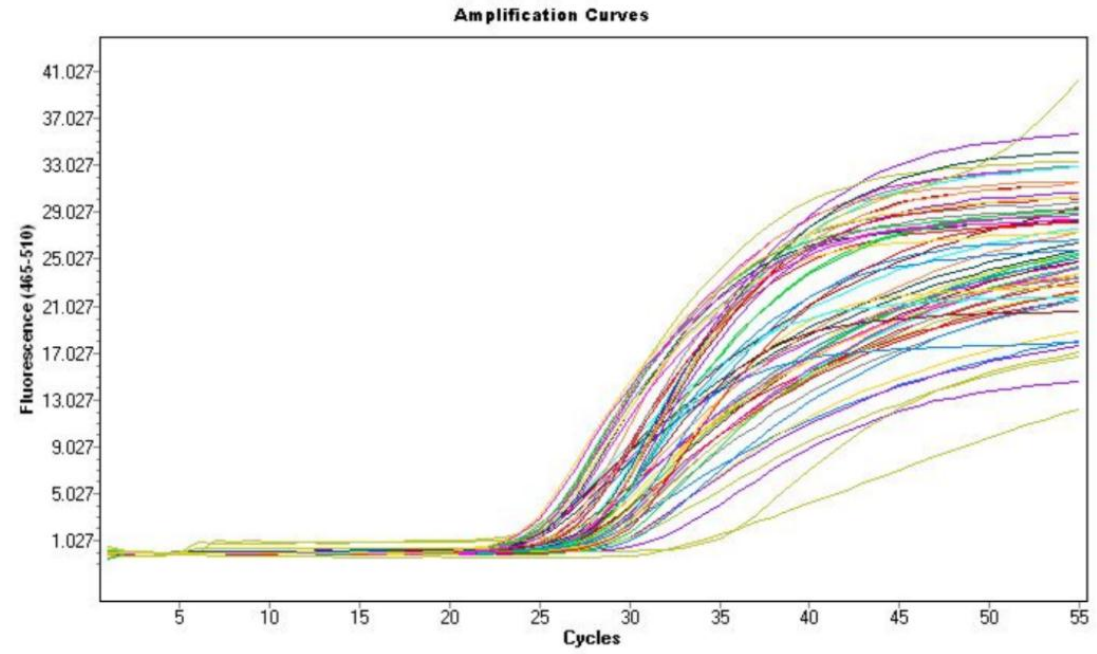


Şekil 4.1 *T. granarium*'un diyapozla ilişkili genlerinin farklı koşullardaki ekspresyon düzeyleri



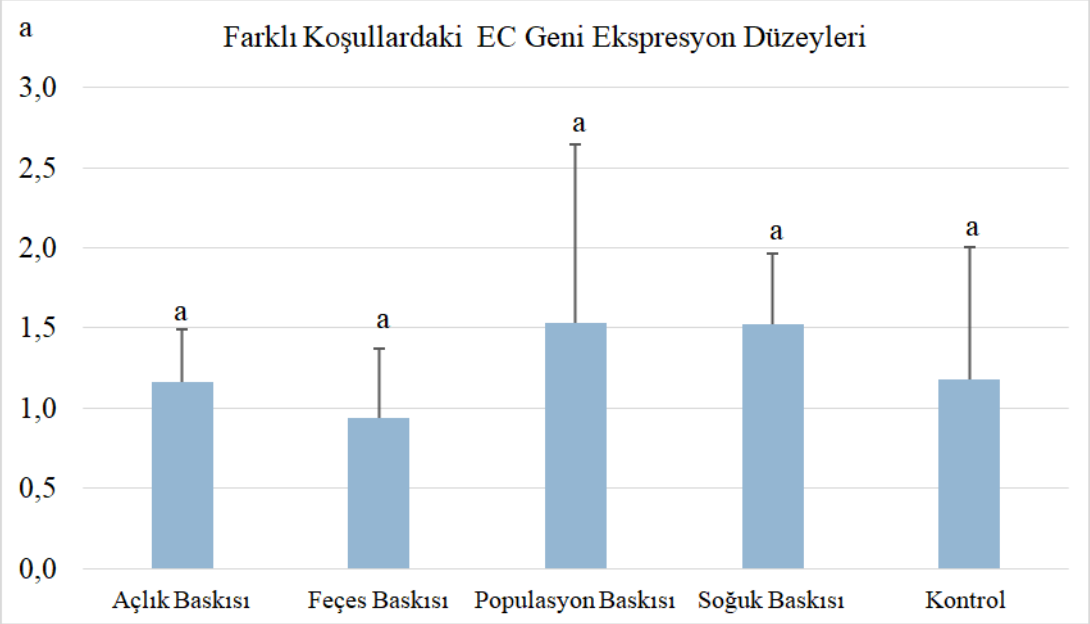
Şekil 4.2 *T. granarium*'un diyapozla ilişkili genlerinin dönemsel ekspresyon düzeyleri

4.1.1 *Endochitinase A-like* geninin ekspresyon analizi



Şekil 4.3 *T. granarium*'da *Endochitinase A-like* ve *Peritrophic matrix protein 14 precursor* genlerinin qPCR sonuçları

(Melting curves ve melting peaks sonuçları EK 2'de verilmiştir)

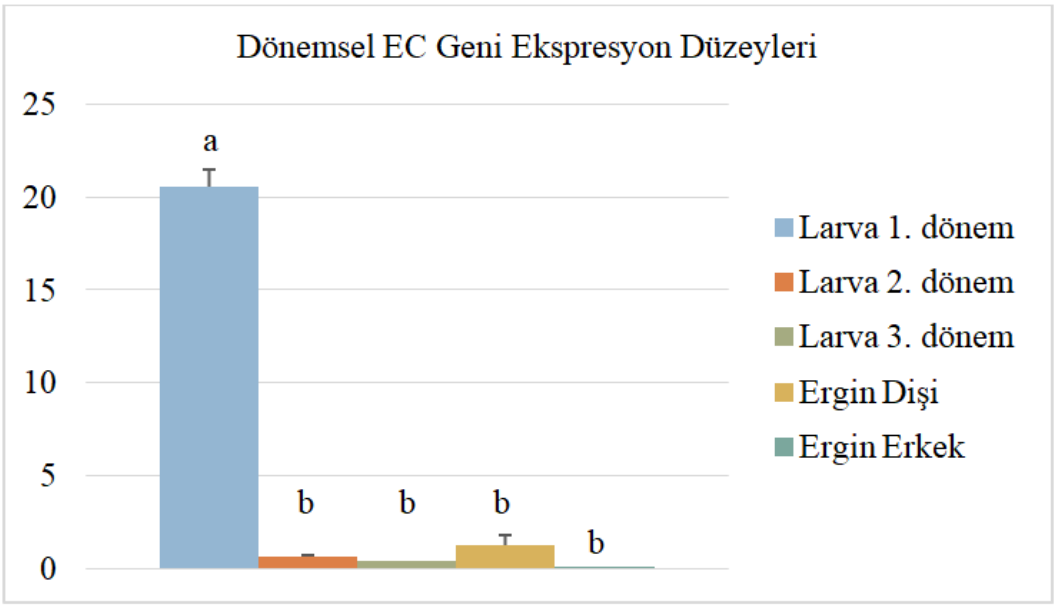


Şekil 4.4 *EC* geninin farklı koşullardaki ekspresyon düzeyleri

Özellikle soğuk baskısı ile beslenmeyen böceğin fizyolojisi açısından önemli olduğu düşünülen bu genin analiz sonuçları incelenmiştir (Şekil 4.4).

EC geninin koşullara göre karşılaştırmalı analizi incelendiğinde popülasyon baskısında diyapoza giren böceğin ifade düzeyi diğer koşullara göre daha yüksek bulunmuştur. Popülasyon baskısına göre açlık, feçes ve soğuk baskısında diyapoza giren böceğin ifade düzeyleri yaklaşık olarak sırasıyla 1.32, 1.63, 1.01 kat daha az bulunmuştur. Popülasyon baskısına göre kontrol grubunun ifade düzeyi yaklaşık olarak 1.29 kat daha az bulunmuştur. Popülasyon ve soğuk baskısı koşullarının ifade seviyesinin kontrol grubuna göre daha fazla açlık ve feçes baskısı koşulları ifadesinin ise daha az olduğu bulunmuştur.

Koşullara göre sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p<0.05$ olduğu için koşullar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tüm koşullar arasındaki fark anlamlı bulunmayarak istatistiksel açıdan aynı grupta yer almıştır.

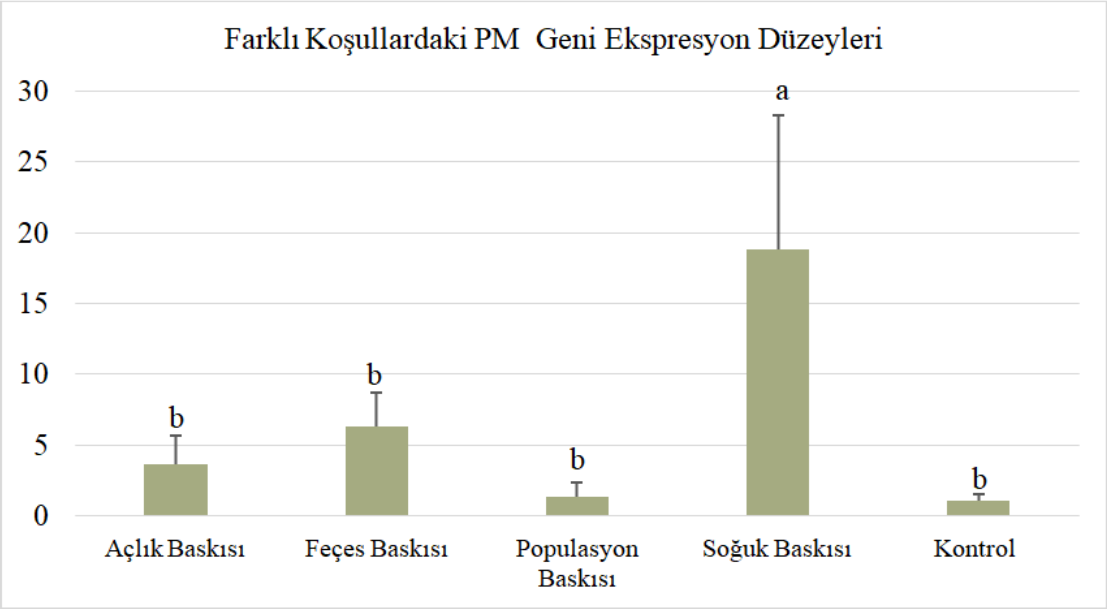


Şekil 4.5 *EC* geninin farklı dönemlerdeki ekspresyon düzeyleri

Şekil 4. 5'te *EC* geninin dönemlere göre karşılaştırmalı analizi incelendiğinde 1. dönem larvanın ifade düzeyi diğer dönemlere göre daha fazla bulunmuştur. Birinci dönem larvaya göre 2. dönem larva, 3. dönem larva, ergin dişi ve ergin erkeğin ifade düzeyleri yaklaşık olarak sırasıyla 31.62, 57.08, 16, 31, 685 kat daha az bulunmuştur.

Dönemlere göre sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p<0.05$ olduğu için koşullar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Dönemler arasında 1. dönem larva ile diğer dönemler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunarak 1. dönem larva farklı grupta yer almıştır. Diğer dönemlerin kendi aralarındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmayarak aynı grupta yer almıştır.

4.1.2 Peritrophic matrix protein 14 precursor geninin ekspresyon analizi

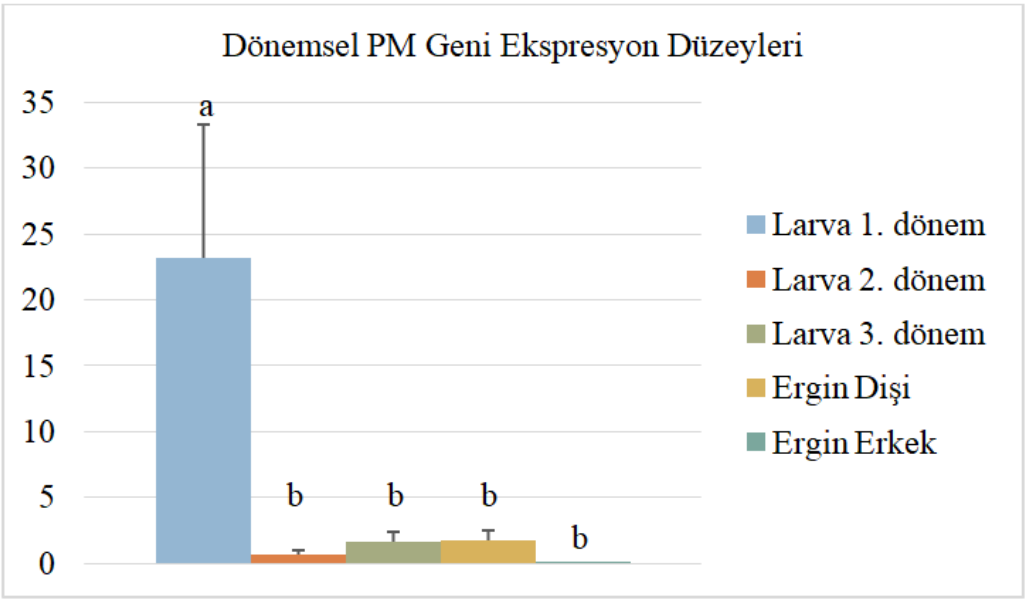


Şekil 4.6 *PM* geninin farklı koşullardaki ekspresyon düzeyleri

Soğuk baskısı ile beslenmeyen böceğin fizyolojisi açısından önemli olduğu düşünülen *PM* geninin analiz sonuçları incelenmiştir (Şekil 4.6).

PM geninin koşullara göre karşılaştırmalı analizi incelendiğinde soğuk baskısında diyapoza giren böceğin ifade düzeyi diğer koşullara göre daha yüksek bulunmuştur. Soğuk baskısına göre açlık, feçes ve popülasyon baskısında diyapoza giren böceğin ifade düzeyleri yaklaşık olarak sırasıyla 5.21, 2.99, 13.94 kat daha az bulunmuştur. Soğuk baskısına göre kontrol grubunun ifade düzeyi yaklaşık olarak 17.75 kat daha az bulunmuştur. Tüm koşulların ifade seviyesinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Koşullara göre sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p<0.05$ olduğu için koşullar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Soğuk baskısı ile diğer tüm baskı koşulları arasındaki fark anlamlı bulunarak soğuk baskısı koşulu farklı grupta yer almıştır. Diğer koşulların kendi aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmayarak aynı grupta yer almıştır.

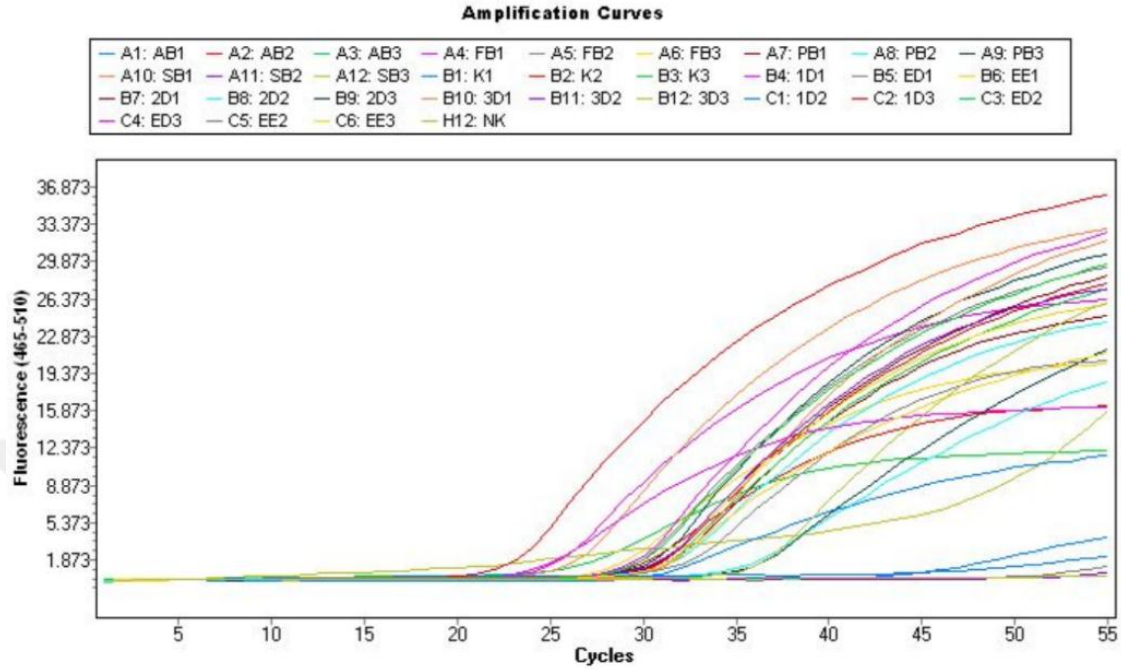


Şekil 4.7 *PM* geninin farklı dönemlerdeki ekspresyon düzeyleri

Şekil 4.7'de *PM* geninin dönemlere göre karşılaştırmalı analizi incelendiğinde 1. dönem larvanın ifade düzeyi diğer dönemlere göre daha fazla bulunmuştur. Birinci dönem larvaya göre 2. dönem larva, 3. dönem larva, ergin dişi ve ergin erkeğin ifade düzeyleri yaklaşık olarak sırasıyla 37.45, 14.51, 13.57, 464.4 kat daha az bulunmuştur.

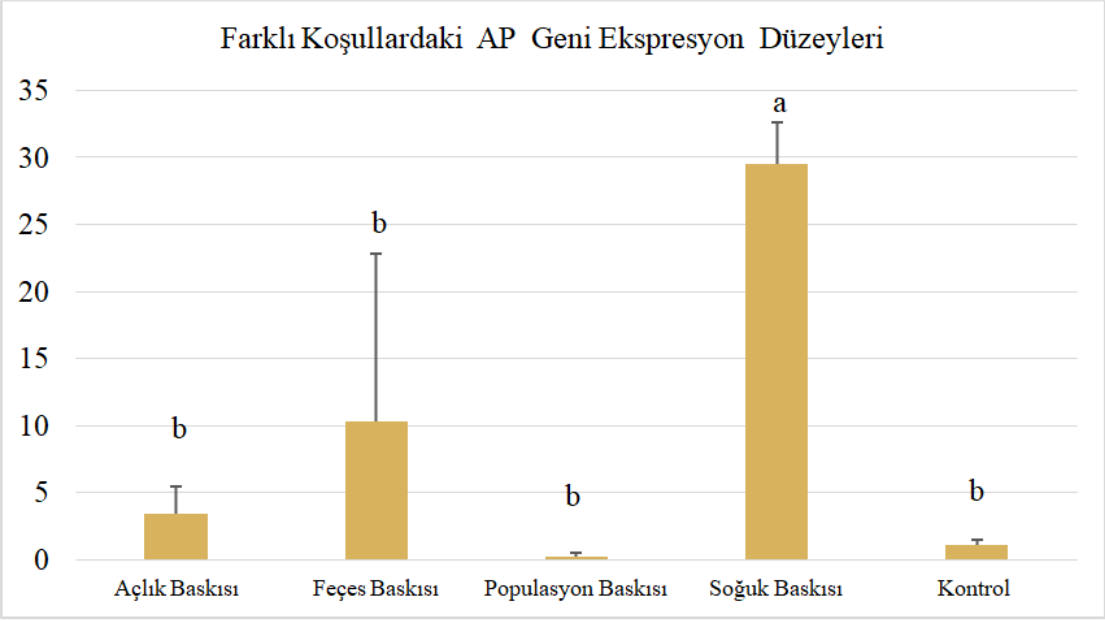
Dönemlere göre sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p<0.05$ olduğu için koşullar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Dönemler arasında 1. dönem larva ile diğer dönemler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunarak 1. dönem larva farklı grupta yer almıştır. Diğer dönemlerin kendi aralarındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmayarak aynı grupta yer almıştır.

4.1.3 *A-kinase Anchor Protein 14-like* geninin ekspresyon analizi



Şekil 4.8 *T. granarium*'da *A-kinase Anchor Protein 14-like* geninin qPCR sonuçları

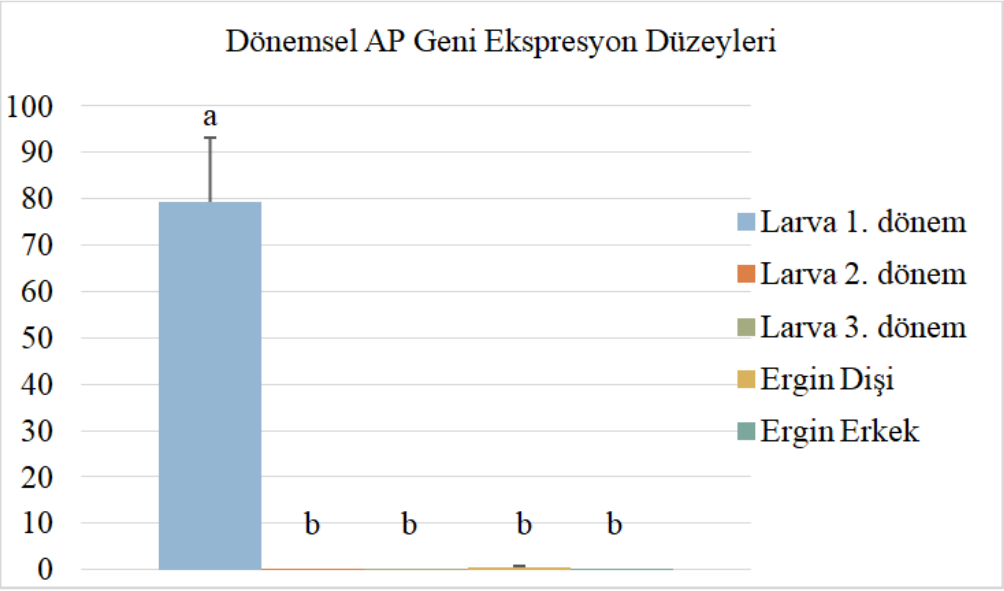
(Melting curves ve melting peaks sonuçları EK 3'te verilmiştir)



Şekil 4.9 *AP* geninin farklı koşullardaki ekspresyon düzeyleri

Şekil 4.9'da *AP* geninin koşullara göre karşılaştırmalı analizi incelendiğinde soğuk baskısında diyapoza giren böceğin ifade düzeyi diğer koşullara göre daha yüksek bulunmuştur. Soğuk baskısına göre açlık, feçes ve popülasyon baskısında diyapoza giren böceğin ifade düzeyleri yaklaşık olarak sırasıyla 8.67, 2.86, 105.54 kat daha az bulunmuştur. Soğuk baskısına göre kontrol grubunun ifade düzeyi yaklaşık olarak 17.75 kat daha az bulunmuştur. Kontrol grubuna göre açlık, feçes ve soğuk baskısı koşullarının ifade seviyeleri daha fazla iken popülasyon baskısının ki daha az bulunmuştur.

Koşullara göre sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p<0.05$ olduğu için koşullar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Soğuk baskısı ile diğer tüm baskı koşulları arasındaki fark anlamlı bulunarak soğuk baskısı koşulu farklı grupta yer almıştır. Diğer koşulların kendi aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmayarak aynı grupta yer almıştır.



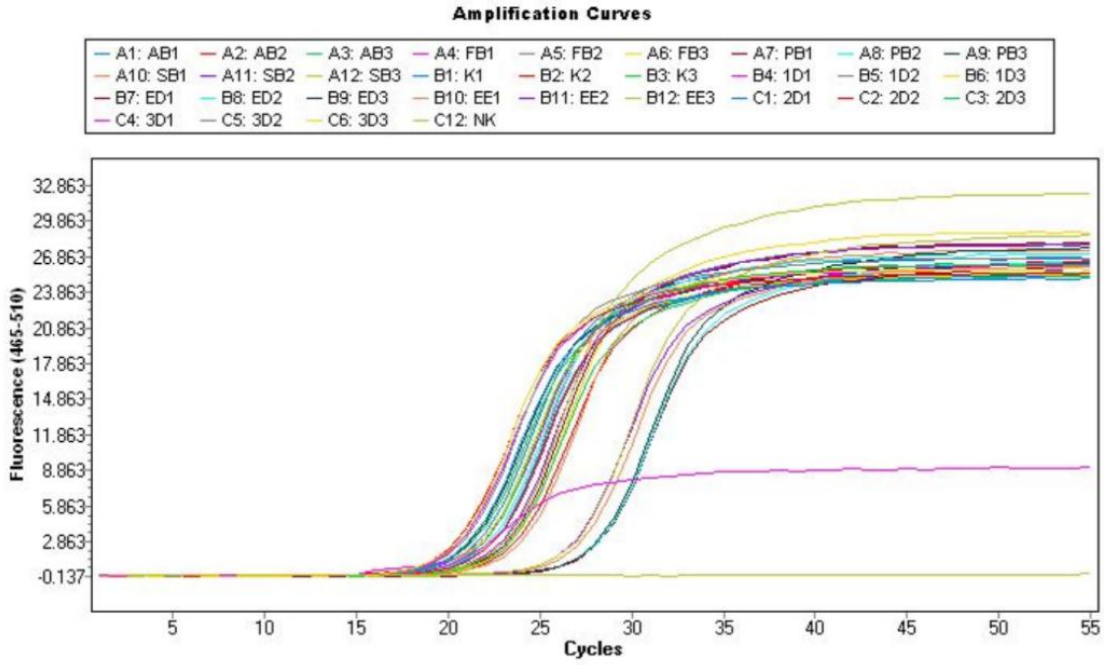
Şekil 4.10 *AP* geninin farklı dönemlerdeki ekspresyon düzeyleri

Şekil 4.10'da *AP* geninin dönemlere göre karşılaştırmalı analizi incelendiğinde 1. dönem larvanın ifade düzeyi diğer dönemlere göre daha fazla bulunmuştur. Birinci

dönem larvaya göre 2. dönem larva, 3. dönem larva, ergin dişi ve ergin erkeğin ifade düzeyleri yaklaşık olarak sırasıyla 397332, 4276, 163, 10772 kat daha az bulunmuştur.

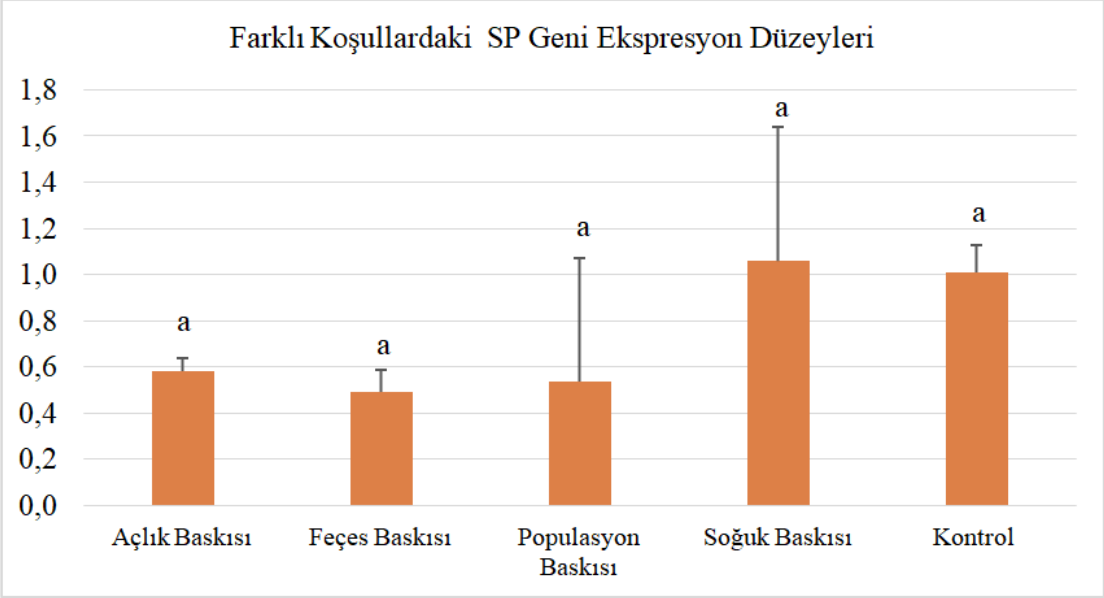
Dönemlere göre sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p<0.05$ olduğu için koşullar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Dönemler arasında 1. dönem larva ile diğer dönemler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunarak 1. dönem larva farklı grupta yer almıştır. Diğer dönemlerin kendi aralarındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmayarak aynı grupta yer almıştır.

4.1.4 *Spidroin* geninin ekspresyon analizi



Şekil 4.11 *T. granarium*'da *Spidroin* geninin qPCR sonuçları

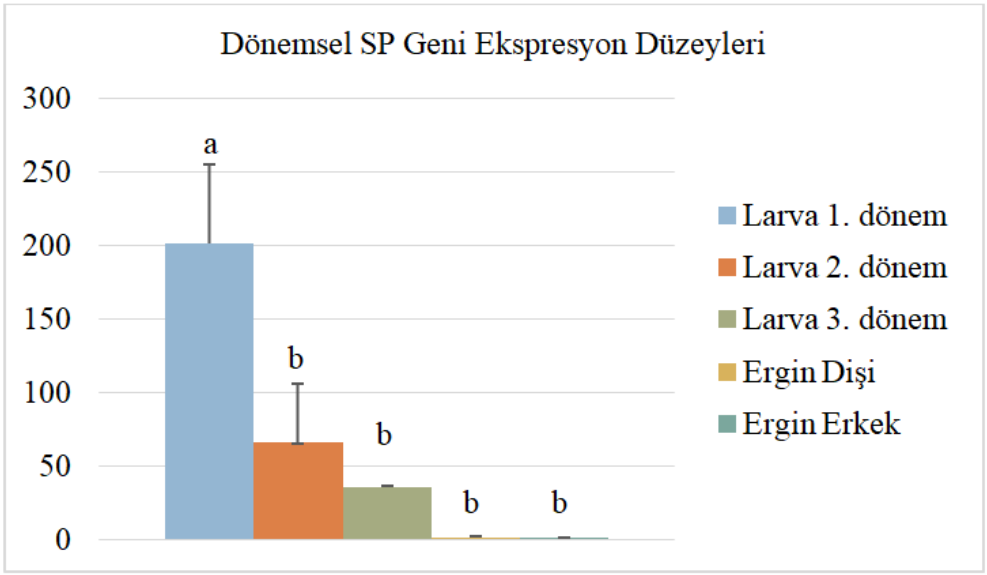
(Melting curves ve melting peaks sonuçları EK 4'te verilmiştir)



Şekil 4.12 *SP* geninin farklı koşullardaki ekspresyon düzeyleri

Şekil 4.12'de *SP* geninin koşullara göre karşılaştırmalı analizi incelendiğinde soğuk baskısında diyapoza giren böceğin ifade düzeyi diğer koşullara göre daha yüksek bulunmuştur. Soğuk baskısına göre açlık, feçes ve popülasyon baskısında diyapoza giren böceğin ifade düzeyleri yaklaşık olarak sırasıyla 1.83, 2.16, 1.96 kat daha az bulunmuştur. Soğuk baskısına göre kontrol grubunun ifade düzeyi yaklaşık olarak 1.04 kat daha az bulunmuştur. Soğuk baskısı hariç tüm koşulların ifade seviyesinin kontrol grubuna göre daha az olduğu tespit edilmiştir.

Koşullara göre sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p<0.05$ olduğu için koşullar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tüm koşullar arasındaki fark anlamlı bulunmayarak istatistiksel açıdan aynı grupta yer almıştır.

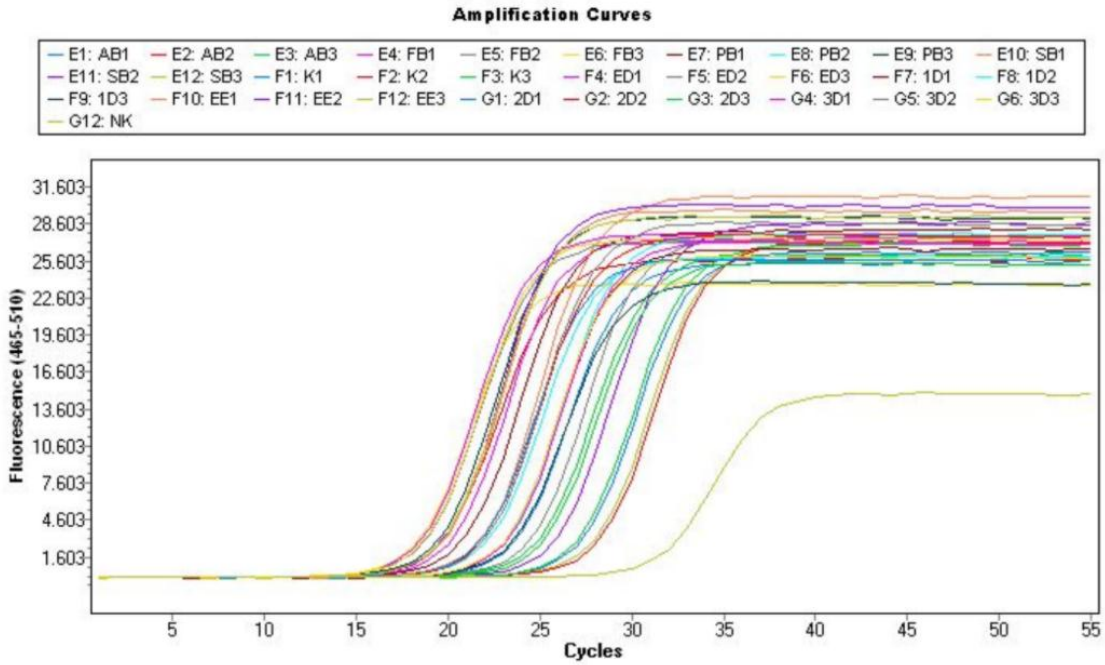


Şekil 4.13 *SP* geninin farklı dönemlerdeki ekspresyon düzeyleri

Şekil 4.13'de *SP* geninin dönemlere göre karşılaştırmalı analizi incelendiğinde 1. dönem larvanın ifade düzeyi diğer dönemlere göre daha fazla bulunmuştur. Birinci dönem larvaya göre 2. dönem larva, 3. dönem larva, ergin dişi ve ergin erkeğin ifade düzeyleri yaklaşık olarak sırasıyla 3.06, 5.68, 132, 1830 kat daha az bulunmuştur.

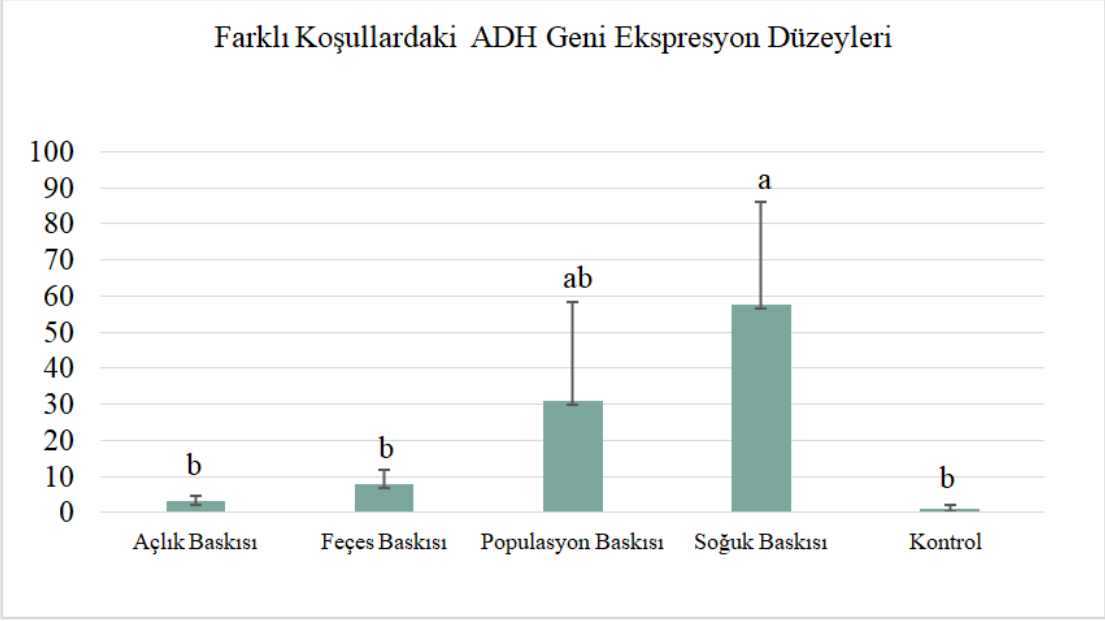
Dönemlere göre sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p<0.05$ olduğu için koşullar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Dönemler arasında 1. dönem larva ile diğer dönemler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunarak 1. dönem larva farklı grupta yer almıştır. Diğer dönemlerin kendi aralarındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmayarak aynı grupta yer almıştır.

4.1.5 *Antidiuretic hormone* geninin ekspresyon analizi



Şekil 4.14 *T. granarium*'da *Antidiuretic hormone* geninin qPCR sonuçları

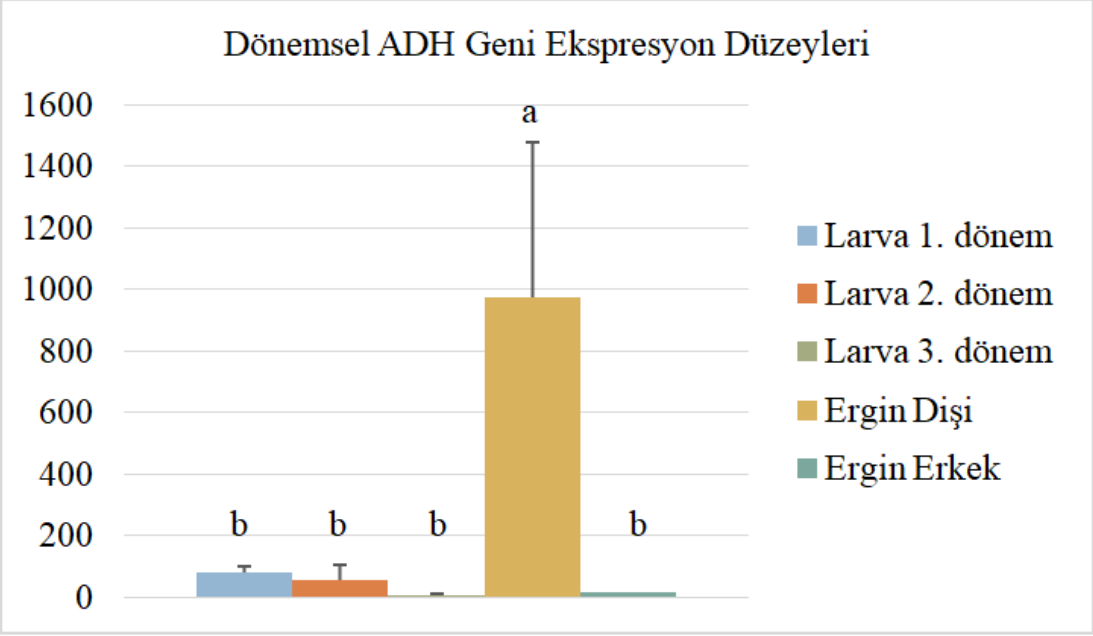
(Melting curves ve melting peaks sonuçları EK 5'te verilmiştir)



Şekil 4 15 *ADH* geninin farklı koşullardaki ekspresyon düzeyleri

Şekil 4.15'de *ADH* geninin koşullara göre karşılaştırmalı analizine bakıldığında soğuk baskısında diyapoza giren böceğin ifade düzeyi diğer koşullara göre daha yüksek bulunmuştur. Soğuk baskısına göre açlık, feçes ve popülasyon baskısında diyapoza giren böceğin ifade düzeyleri yaklaşık olarak sırasıyla 18.16, 7.34, 1.87 kat daha az bulunmuştur. Soğuk baskısına göre kontrol grubunun ifade düzeyi yaklaşık olarak 48.38 kat daha az bulunmuştur. Tüm koşulların ifade seviyesinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu bulunmuştur.

Koşullara göre sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p<0.05$ olduğu için koşullar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Soğuk baskısı ve popülasyon baskısının kendi içlerinde ayrıca diğer koşullar ile aralarındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunarak farklı grupta yer almışlardır. Açlık baskısı ve feçes baskısı koşulları arasında fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmayarak aynı grupta yer almıştır.



Şekil 4.16 *ADH* geninin farklı dönemlerdeki ekspresyon düzeyleri

Şekil 4.16'da *ADH* geninin dönemlere göre karşılaştırmalı analizine bakıldığında ergin dişinin ifade düzeyi diğer dönemlere göre daha fazla bulunmuştur. Ergin dişiye göre 1.

dönem larva, 2. dönem larva, 3. dönem larva ve ergin erkeğin ifade düzeyleri yaklaşık olarak sırasıyla 12.26, 17.37, 129.65, 67.14 kat daha az bulunmuştur.

Dönemlere göre sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p<0.05$ olduğu için koşullar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Dönemler arasında ergin dişi ile diğer dönemler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunarak ergin dişi dönemi farklı grupta yer almıştır. Diğer dönemlerin kendi aralarındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmayarak aynı grupta yer almıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Diyapoz sırasında pek çok gen gerçekten ifade edilmese de, birçok genin bu zamanda benzersiz bir şekilde ifade edildiği açıktır. Gen ifadesi modellerine daha yakından bakıldığında, bazı genlerin sadece erken diyapozda, bazılarının geç diyapozda ve aralıklı olarak ifade edildiği gözlenmiştir. Bu tür farklılıklar, diyapozun karmaşıklığının altını çizmekte aynı zamanda diyapozun dinamiklerini yansıtmaktadır. Metabolik hızdaki değişiklikler, metabolik rezervlerin kullanım şekilleri ve diyapoz sonlandırıcı çevresel sinyallere ve hormonlara karşı duyarlılıkların tümü, diyapoz sırasında böcek içinde meydana gelen iç değişikliklerin iyi bir şekilde anlaşılmasını gerektirir.

Bu tez çalışması ile diyapozla ilişkili olduğu düşünülen *peritrophic matrix protein 14 precursor, spidroin-1-like, endochitinase A-like, A-kinase anchor protein 14-like [Ceratitis capitata], anti-diruetic peptide precursor* genlerinin ifade düzeyleri incelenmiştir. Gen ifadeleri analiz edilirken farklı koşullar ve farklı dönemler olmak üzere iki farklı parametre oluşturulmuştur. Çalışmada *T. garanarium* bireylerinin farklı koşullardaki baskılar altında diyapoz halindeyken gen ifadesi düzeyinde nasıl bir tepki verdiğini öğrenmek hedeflenmiştir. Ayrıca böceğin farklı dönemlerinde diyapozla ilişkili olduğu düşünülen genlerin ifade düzeyleri tespit edilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla *T. granarium*'un diyapozla ilişkili genleri hakkında daha önce çalışma yapılmamıştır.

Kitinazlar, b-1,4-bağlı N-asetilglukozaminlerden oluşan kitin lineer polimerini hidrolize eden enzimlerdir. Amino asit dizilerinin korunmasına, çeşitli korunmuş motiflere ve protein katlanmasına dayalı olarak, kitinazlar 18. aile ve 19. aile glikosilhidrolazlar olarak sınıflandırılmıştır (Arakane ve Muthukrishnan 2010). Aile 18 kitinazlar, bakteriler, bitkiler ve hayvanlar da dahil olmak üzere tüm alemlere yaygın olarak dağılmıştır. Çoğunlukla bitkilerde bulunan 19 kitinaz ailesi ile hiçbir dizi benzerliği paylaşmazlar. Bununla birlikte, bakteri, bir kene türü, virüsler ve bir nematod dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan 19 kitinaz ailesi hakkında oldukça az sayıda rapor bulunmaktadır (Arakane ve Muthukrishnan 2010). 18 kitinaz ailesi protistlerden memelilere kadar kapsamlı bir evrimsel modifikasyona uğramış olsa da kitinazları kodlayan genlerin sayısındaki en kapsamlı dağılım Insecta sınıfında meydana geldiği

görülmüştür (Zhu vd. 2008, Karisson ve Stenlid 2009). 18 böcek kitinaz familyası neredeyse sadece endokitinazlardır ve ürünlerin indirgeyici uçlarında b-anomerler veren polimerik kitin iç pozisyonlarındaki b-1,4-bağlarını sindirmeyi tercih ederler. Aile 18 ve aile 20 kitinolitik enzimlerin birleşik etkisi sinerjiktir ve kitin polimerinin böceklerde hızlı depolimerizasyonuna yol açar (Fukamizo ve Kramer, 1985). Bazı durumlarda, kitin bağlama alanlarına sahip ancak katalitik aktiviteden yoksun ek proteinler, kitin yıkımına yardımcı olur (Vaaje-Kolstad vd. 2005). Böcek kitinazlarının ana işlevi, deri değiştirme sırasında böcek kütikülü ve peritrofik matris gibi kitin içeren hücre dışı matrislerin devrindedir. Ek olarak, kitinazlar, konukçuları kitin içeriyorsa böceklerde sindirim işlevine sahip olabilir. Enzimatik aktiviteden yoksun olan kitinaz benzeri proteinlerin, bağışıklıkta veya büyüme faktörleri olarak rolleri olabilir.

Yapmış olduğumuz çalışmada *EC* geninin ifade seviyesi popülasyon baskısı altında en yüksek bulunsa da tüm koşullar altında ifade seviyesi benzer şekilde bulunmuş kayda değer bir fark belirlenmemiştir. Bu genin soğuk baskısı altında ifade seviyesinin yüksek olması larvanın bu dönemi daha rahat atlatmasına katkı sağlayacağını düşündürmüştür. *EC* geninin dönemler arasında ifade seviyesine baktığımızda 1. dönem larvada ifade seviyesinin diğer dönemlere göre daha yüksek olduğu ancak diğer dönemler arasında ciddi bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Bu genin 1. dönem larvada ifade seviyesinin yüksek bulunması henüz gelişim döneminin başlangıcında olan larvanın gelişimine katkı için ifadesinin artmış olabileceğini akla getirmiştir. Ayrıca zorlu diyapoz sürecinin atlatılması için bağışıklığın, dayanıklılığın arttırılması için ifade seviyesinin arttığı düşünülmüştür.

Kim ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmada *Culex pipiens L.*'den (Diptera: Culicidae) (*Cx pipiens*) klonlanan iki aktin geninin, ergin diyapozu sırasında artarak ifade edildiği bulunmuştur. Aktin 1 ve 2, diyapoz boyunca ifade edilmiş olsa da, her iki gen de en yüksek oranda diyapozun başlarında ifade edilmiştir. Gen ifadesindeki bu değişikliklere, düşük sıcaklığa maruz kalan diyapozlu sivrisineklerin orta bağırsaklarında en belirgin olan polimerize aktin dağılımı eşlik etmiştir. Erginlerler eklozyondan 7-10 gün sonra düşük sıcaklığa (12 saat boyunca -5°C) maruz bırakıldıklarında, polimerize aktin hem diyapozsuz hem de diyapozlu sivrisineklerde

kas lifleri boyunca eşit olarak dağılmıştır. Daha olgun erginlerin (eklozyondan 1 ay sonra) düşük sıcaklığa (12 saat boyunca -5°C) maruz kalması, polimerize aktin dağılımının daha da fazla olmasına neden olmuştur, bu etki özellikle diyapozda olan sivrisineklerde belirgin bulunmuştur. Gen ifadesi ve aktin dağılımındaki bu değişiklikler, aktinlerin, hücre iskeletini güçlendirerek kışın düşük sıcaklıklarında diyapoz yapan erginlerin hayatta kalmasını arttırmada bir rolü olduğunu düşündürmüştür (Kim vd. 2006).

Peritrofik matris (PM), kitinden ve proteinlerden oluşan, böceğin orta bağırsağını kaplayan, hücresiz, yarı geçirgen bir yapıdır. PM, bağırsak lümenini yemek borusunu içeren endoperitrofik boşluğa ve PM ile orta bağırsak epiteli arasındaki ektoperitrofik boşluğa ayırır. Epiteli aşındırıcı gıda partiküllerinden, patojenlerden ve alınan toksinlerden korur ve sindirim süreçlerini bölümlere ayırır. Büyük makromoleküller, endoperitrofik boşlukta, sindirimin ve besin alımının son aşamalarının gerçekleştiği ektoperitrofik boşluğa PM'den geçen ürünlere (esas olarak peptitler, kısa sakkaritler ve yağ asitleri) hidrolize edilir (Toprak vd. 2008).

Protein, PM'nin ana bileşenidir ve dört sınıf PM proteini, peritrofik matristen serbest bırakılma biçimlerine göre tanınır. Sınıf I proteinler, fizyolojik tamponlarla basit bir durulama ile uzaklaştırılır. Sınıf II proteinler, zayıf iyonik etkileşimleri bozan hafif deterjanlarla ekstrakte edilebilirken, Sınıf III proteinler yalnızca üre gibi güçlü denatüre edici maddelerle muamele edildiğinde salınır. Sınıf IV, hiçbir şekilde uzaklaştırılamayan ve muhtemelen diğer proteinlere veya kitine kovalent olarak bağlı proteinleri içerir (Toprak vd. 2008).

Çalışmamızda *PM* geninin soğuk baskısı altında en fazla şekilde ifade edildiği bulunmuştur. Diğer koşullar altında ifade seviyelerinde ciddi bir farklılık bulunmamıştır. *PM* ifade seviyesinin açlık ve popülasyon baskısı koşullarındaki ifade seviyelerinden daha düşük çıkması bu koşullar altında beslenmenin daha az olmasına atfedilmiştir. Ayrıca açlık baskısı koşulunda diğer genler arasında en fazla ifade edilen gen olmuştur. *PM* geninin dönemler arasındaki ifadesine bakıldığında en fazla 1. dönem larvada ifade edilerek diğer dönemlerdeki ifade seviyeleri arasında ciddi bir farklılık

bulunmamıştır. *PM* seviyesinin 1. dönem larvada ifade seviyesinin daha yüksek olmasının *T. granarium* bireylerinin beslenmesi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.

Yüksek düzeyde organize olmuş moleküler kompleksler, hücre yüzeyi reseptör aktivasyonunun akışı yönünde meydana gelen sinyal iletim olaylarının kesin konumunu ve zamanlamasını belirler. Bu tür kompleksleri organize eden bir dizi yapı molekülü, A-kinaz bağlayıcı proteinler (AKAP'ler) olarak bilinen bir protein ailesidir. AKAP'ler, protein kinazlar ve fosfatazlar gibi enzimleri uygun substratlarla ayırarak fosforilasyon ve fosforilasyon olaylarının koordinasyonu için bir çerçeve sağlar. AKAP'ler ayrıca sinyal iletimi ve sinyal sonlandırma moleküllerini sinyal yollarının yakınsamasında bir araya getirir (Langeberg ve Scoot 2005).

AKAP'ler ilk olarak protein kinaz A'yı (PKA) bağlama kapasitesini paylaşan, yapısal olarak çeşitli fakat işlevsel olarak ilişkili proteinlerin bir ailesi olarak tanımlanmıştır. Ek olarak, AKAP'ın bir bölgesi, kompleksi belirli bir hücre altı bölmeye bağlamaya hizmet eden bir hedefleme dizisi içerir. Önemli olarak, AKAP'lerin PKA'nın hareketini yönlendirmenin yanı sıra diğer sinyal moleküllerini de devreye soktuğu birçok laboratuvar tarafından gösterilmiştir (Tasken ve Aandahl 2004). Bu, hücre içindeki belirli bölgelerde bilginin entegrasyonu ve yayılması için enzim komplekslerinin oluşturulmasını sağlar. Bu kompleksler, yukarı akış sinyallerine dinamik yanıt olarak birleştirilir ve genellikle spesifik substrat proteinlerine yakın bağlanır. Kombine olarak, bu faktörler, AKAP aracılı sinyalleşme olaylarına uzamsal ve zamansal düzenleme sağlar (Langeberg ve Scoot 2005).

Çalışmamızda *AP* geninin en fazla soğuk baskısı koşulu altında ifade edildiği diğer koşullar arasında kayda değer bir ifade farklılığı olmadığı belirlenmiştir. *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)'da diyapozun başlamasıyla ilişkili genlerin ifadesi hakkında yapılan çalışmaya göre Guanilil siklaz yolu, TGFβ-benzeri yol, insülin-benzeri yol ve steroid hormon yolu gibi birkaç sinyal yolunun gelişimsel arrestin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, *Akt* geninin (*HarDP-C672*) transkripsiyonunda artış gözlenmiştir. *Akt*, insülin benzeri yolda önemli bir proteindir. Buna karşılık, *kalmodulin protein kinaz II* (*CaMK II*) ve *arginin kinaz* (*ArgK*) diyapoz

başlatma sırasında azaldığı tespit edilmiştir (Bao ve Xu 2011). Bizim çalışmamızda tüm dönemler arasında *AP* geni en fazla 1. dönem larvada ifade edilmiştir. Diğer dönemlerin ifade seviyesi düşük olmakla birlikte aralarında ciddi bir farklılık bulunmamıştır. Bu genin 1. dönem larvada ifade seviyesinin yüksek olması sinyal iletim, sinyal sonlandırma ve hücre içi bilginin entegrasyonu gibi olaylarının bu dönemde daha yoğun gerçekleştiğini akla getirmiştir.

Spidroinler, örümcek ipeğindeki ana proteinlerdir. Farklı örümcek ipeği türleri, hepsi tek bir protein ailesinin üyesi olan farklı spidroinler içerir (Ayoub vd. 2013). En çok araştırılan spidroin türü, örümcek ipeğinin en güçlü türü olan dragline ipeğin yapımında kullanılan başlıca ampullate ipek proteinleridir (MaSp). Dragline ipek lifi, *spidroin-1* (*MaSp1*) ve *spidroin-2* (*MaSp2*) geni olmak üzere iki tür spidroin'den oluşur (Motriuk-Smith vd. 2005). Spidroin, skleroproteinler adı verilen büyük bir protein grubunun parçasıdır. Bu grup, kolajen ve keratin gibi diğer çözünmeyen yapısal proteinleri içerir.

Başlıca ampullat spidroinler, ortalama 3500 amino asit ile 250-350 kDa'lık bir uzantıya sahip büyük proteinlerdir. Çoğunlukla yüksek oranda homojenize edilmiş tandem tekrarlarına dayanan polimerik bir organizasyonu temsil ederler (Xu ve Lewis 1990).

Çalışmamızda *spidroin* (*Sp*) geninin ifade düzeylerine bakıldığında koşullar arasında en fazla soğuk baskısı koşulunda ifade edildiği tespit edilmiştir. Tüm koşullarda ifade düzeyleri birbirine yakın bulunarak kayda değer bir fark bulunmamıştır. Dönemler arasında ifade seviyelerine bakıldığında bu genin en fazla 1. dönem larvada ifade edildiği bulunmuştur. Diğer larva dönemleri arasındaki ifade seviyeleri de birbirine yakın bulunmuştur. Yine ergin erkek ve ergin dişi dönemlerinde ifade seviyeleri birbine yakın bulunmuştur. Tez kapsamında elde edilen bulgular ışında bu genin diyapozla ilişkili olabileceği ve bu ilişkinin daha kapsamlı araştırılması gerektiği düşünülmüştür.

Odorant binding protein (*OBP*) genlerinin işlevi tam olarak iyi belirlenmemiş olsa da, koku verici molekülleri duyu nöronlarının hücre zarındaki koku alma reseptörlerine ileterek koku verici taşıyıcılar olarak hareket ettiklerine inanılmaktadır. *Drosophila melanogaster*'de (Diptera: Drosophilidae), *OBP* genleri ile yapılan çalışma *Obp19d*'nin

ergin yanlı ifadeye sahip olduğunu, *Obp56a*'nın ise larva yanlı ifadeye sahip olduğunu göstermiştir. *Obp99c*'ye gelince, *D. melanogaster*'in hem larvalarında hem de erginlerinde yüksek ifade seviyeleri gözlenmiştir (Nakamura vd. 2016). Çalışmamızda *Sp* genini ifadesine genel olarak baktığımızda larva dönemlerinde ifade seviyesinin ergin dönemlere kıyasla çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. Yine ifade seviyesinin larva dönemleri arasında 1. dönemden 3. döneme kadar giderek azaldığı görülmüştür.

Böceklerin boşaltım sistemi, işlevleri diüretik ve antidiüretik hormonlar (*ADH*) tarafından kontrol edilen malpigi tübüllerini ve arka bağırsağı (ileum ve rektum) içerir. Böceklerde malpigi tübülünün ve arka bağırsak fonksiyonunun kontrolünde çeşitli peptit grupları yer alır. Bunlar beyin ve ventral sinir kordonu gangliyonlarındaki nörosekreter hücrelerin ürünleridir ve diüretik ve/veya antidiüretik hormonlar olarak işlev görmek üzere dolaşıma salınabilecekleri tanımlanmış nörohemal yapılarda bulunurlar. Reseptörler bazıları tarafından bilinir ve çeşitli taşıma proseslerini düzenlemek için cAMP, cGMP veya Ca_2 + sinyal yollarıyla birleşirler (Coast 2006).

Çalışmamızda *ADH* geninin ifade seviyesine bakıldığında en fazla soğuk baskısı koşulunda ifade edildiği bulunmuştur. Bunu popülasyon baskısı takip etmiştir. Diğer baskı koşulları altındaki ifade seviyelerinde ciddi bir farklılık bulunmamıştır. Yapılan analizlerde dönemlere göre değerlendirme yapıldığında *ADH* geni hariç diğer tüm genlerin 1. dönem larvada ifade düzeyinin en fazla olduğu bulunmuştur. *ADH* geni tüm dönemler arasında en fazla ergin dişide ifade edilmiştir. Bu durum bu genin ergin dişiye özel bir fonksiyonu olduğunu akla getirmiştir. Bu genin tüm dönemler arasında ifade seviyeleri arasında kayda değer farklılıklar olduğu belirlenmiştir.

Helicoverpa armigera pupa döneminde diyapoza girmekte olup diyapoz hedefli bireylerde erken pupa gelişimi sırasında genlerin daha yüksek ifade edildiği tespit edilmiştir. Özellikle 1. günden 2. güne kadar *SUMO*, 0. günden 2. güne kadar *MnSOD*, 0. günden 1. güne kadar *serikotropin* ve 1. günden 5. güne kadar *TCTP* yukarı ifade edilmiştir. Bu genlerin erken pupa evresinde yüksek ifadesi pupa diyapozunun başlamasıyla ilişkili olabileceğini akla getirmiştir (Bao ve Xu 2011). Bizim çalışmamızda da birçok genin özellikle 1. dönem larvada yukarı ifade edildiği

görülmüştür. *T. granarium* larvası her ne kadar 4. ve 5. dönemde diyapoza giriyor olsada bu durum erken dönemde bu genlerin diyapoza hazırlık için ifade edildiğini akla getirmiştir.

Anastrepha obliqua'da gelişiminin farklı aşamaları boyunca üç *OBP* geninin *Obp19d_2*, *Obp56a* ve *Obp99c*'nin genlerinin ifadeleri analiz edilmiştir. *Obp99c* erkeklerde özel bir ifadeye sahipken *Obp56a* çiftleşmemiş dişilerde yüksek ifade göstermiştir. *A. obliqua*'da ifade dişi erginlerde çok düşük bulunmuştur. Genel olarak, *A. obliqua*'nın ergin öncesi dönemlerinde *OBP*'lerin ifade seviyeleri, bu genlerin larvalarda besin algılama gibi bazı temel biyolojik ihtiyaçlarla ilgili görünmediğini tahmin etmelerine yol açmıştır. Ayrıca, *A. obliqua*'da bu *OBP* genleri için gözlemlenen ergin yanlı ifadesi, eşlerin ve yumurtlama bölgelerinin aranmasıyla ilgili olabileceği düşünülmüştür (Nakamura vd. 2016).

Drosophila virilis grubu türlerinde (*Drosophila montana*, *D. littoralis* ve *D. ezoana*) diyapoz fazları arasındaki gen ifadesi kinetiğine ayrıca diyapoza giren ve girmeyen dişiler arasındaki kışlama farklılıklarına bakılmıştır. Çalışılan genlerin çoğunun fazla ifade edilmesinin faza özgü olduğu belirlenmiştir. *Act42A*, *Mhc*, *Jon25Bi*, *Thor*, *per*, *CG6785*, *draper* (*drpr*), Ecdysone ile indüklenen protein 28/29kD (*Eip71CD*) ve *Hsc70*, diyapozun farklı aşamalarında yukarı doğru ifade edilmiştir. Diyapoza giren dişilerde *Katalaz* (*Cat*), *Act42A*, *per*, *Mhc* ve *Thor* genlerinin fazla ifade edildiği tespit edilmiştir. Diyapoz dönemindeki dişilerde kışı geçirmede bu genlerin önemli bir rolü olduğu düşünülmüştür (Salminen vd. 2015).

Öte yandan böceklerde üreme başarısını etkileyen ovarilere besin sağlayan *vitellogenin* geni ile yapılan çalışmaya göre beyazsinekte *Vg1* ve *Vg2* genlerinin ergin dönemde yüksek miktarda ifade oldukları rapor edilmiştir. Pupa fazında her iki gen az miktarda ifade olurken, *Vg2* ifadesinin ise sadece yumurta-nimf aşamasında gözlendiği tespit edilmiştir (Wang vd. 2010). Bizim çalışmamızda *ADH* geni her dönemde ifade edilmiştir. Benzer şekilde *ADH* geni ergin dişi döneminde en fazla şekilde ifade edilmiştir. Ancak 3. dönem larva da diğer dönemlere kıyasla çok daha az ifade edildiği görülmüştür.

Farklı böceklerde diyapoz sırasında ifade edilen genler ve farklı dönemlerdeki ifadeleri hakkında yapılan çalışmaların sonuçlarının incelemesi genel bir bakış ile aşağıda verilmiştir.

Rinehart ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmada et sineğinde, sineğin ısı şoku proteinlerinin (*Hsp*s) tümü olmasa da çoğu yüksek seviyede ifade edildiği belirlenmiştir. *Hsp*'lerin yüksek seviyede ifade edilmesi, diyapozun başlangıcında başlamış, kışlama dönemi boyunca devam ederek sineğin gelişimi yeniden başlatmak için sinyali almasından sonraki saatler içinde sona erdiği saptanmıştır. *Hsp*'nin yüksek ifadesi, Diptera, Lepidoptera, Coleoptera ve Hymenoptera dahil olmak üzere çeşitli böcek takımlarını temsil eden türlerin yanı sıra farklı gelişim aşamalarında (embriyo, larva, pupa, ergin) meydana gelen diyapozlarda ortak görünmektedir. Sineklerde *Hsp23* ve *Hsp70* ekspresyonunun RNAi kullanılarak baskılanması, diyapoza girmesini veya diyapozun süresini değiştirmemiştir, ancak pupanın düşük sıcaklıklarda hayatta kalma yeteneği üzerinde derin bir etkisi olduğu bildirilmiştir. Diyapoz sırasında *Hsp*'lerin yüksek ifadesinin, kışı geçiren böceklerin soğuğa dayanıklılığına katkıda bulunan önemli bir faktör olduğu önerilmiştir (Rinehart vd. 2007). Bu tez kapsamında yapılan çalışmadaki tüm genlerin ifade seviyelerinin soğuk baskısı koşulu altında yüksek ifade edildiği bulunmuştur. Bu genlerin yüksek ifadesi düşük sıcaklıklarda diyapoza giren *T. garanrium* bireylerinin hayatta kalma şansını arttıracağı düşünülmüştür.

Palli ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmada *Choristoneura fumiferana*'da *Hsp70* için mRNA'ların, diyapozdan önce, diyapozda ve diyapoz sonrasında ifade edilirken (Palli vd. 2001); *T. granarium* analiz edilen genlerin bazı dönemlerinde düşük ifade edilmiş olsada, tüm dönemlerinde ifade edildiği bulunmuştur.

Yine *Drosophila virilis* grubu türlerinde (*Drosophila montana, D. littoralis* ve *D. ezoana*) diyapoz fazları arasındaki gen ifadesi kinetiğine bakılan çalışmada *Jon25Bi*, diyapozun başlangıç, bakım ve sonlandırma dönemleri boyunca yukarı doğru düzenlenmiştir. Diğer yandan *Thor* diyapozun bakım ve kışlama aşamalarında yukarı doğru düzenlenmiştir. *Per*, diyapozun yaşam döngüsü boyunca yukarı doğru düzenlenmiştir (Salminen vd. 2015).

Helicoverpa armigera ile diyapozun başlamasıyla ilişkili genlerin ifadesine bakılmıştır. Genlerin metabolizma ve enerji kategorisinde diyapoz başlangıcında fazla ifade edilen iki enzim, *aldolaz* (*HarDP-C349*) ve *enolaz* (*HarDP-A209*) glikolize katılır. Ek olarak, ATP oluşumunda yer alan proteinleri kodlayan bir dizi transkript (*HarDP-B843, HarDP-B170* ve *HarDP-B1356*), diyapoz başlangıcında fazla ifade edilmiştir. Stres direnci kategorisine sekiz gen atanmış tümü diyapoz başlangıcında yüksek ifade edilmiştir. Hücre döngüsü kategorisinde transkripsiyonel baskılayıcı aktiviteye sahip olduğu tahmin edilen *CG8378* (*HarDP-C1098*) ve transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini her zaman baskılayan *SUMO* (*HarDP-A589*), diyapoz başlangıcında yüksek ifade edilmiştir (Bao ve Xu 2010).

Culex pipiens'in diyapozla ilişkili genleri fonksiyonlarına göre gruplara ayrılmıştır. Düzenleyici genler grubunda ribozomal protein (*rp*) *S3A, rpS6* ve *rpS24*'ün tümü, translasyonun başlatılmasında yer almış ve üçü de diyapoz sonlandırılmadan kısa bir süre önce geç diyapozda yüksek düzeyde ifade edilmiştir. *rpS3A*'nın geç diyapozdaki yüksek ifadesi, diyapoz sonlandırılmadan önce yumurta üretimi için yeniden yetkinliğe işaret edebilir. Gıda kullanımı grubunda erken diyapozda kan sindirim enzimleri *tripsin* ve *kimotripsin* benzeri *serin proteaz*'ı kodlayan iki gen düşük ifade edilirken, şekerlerin lipit depolarına dönüştürülmesinde rol oynayan enzimi kodlayan gen, yağ asidi sentazı bu zamanda yüksek oranda yüksek ifade edildiği bulunmuştur. Stres tepkisi grubunda geç diyapozda tanımlanan stres tepkisi geni olan *aldehit oksidaz Cx pipiens*'e karşı insektisit direncinde önemli bir rol oynamaktadır. *Aldehit oksidaz*'ın diyaporasyondaki işlevi bilinmemekle birlikte, muhtemelen diyapoz sırasında çalışan yüksek bir stres-tepki sisteminin bir bileşeni olduğu düşünülmüştür. Ek bir stres-tepki geni olan *selenoprotein, Cx pipiens*'de yüksek ifade edilerek çevresel strese karşı koruma sağladığı düşünülmüştür. Diyapoz sırasında metabolik işlevleri olan dört gen mitokondriyal *malat dehidrojenaz, metilmalonat-semialdehit dehidrojenaz, sitokrom c oksidaz* (*CO*) alt birimi *COI* ve *COIII* yüksek ifade edilmiştir. *Malat dehidrojenaz* (*MDH*), *metilmalonat-semialdehit dehidrojenaz*'ın eşzamanlı yukarı ifadesi, diyapoz ile bağlantılı spesifik metabolik olaylarda da rol oynayabilir. *MDH*, artan soğuğa toleransla ilişkilendirilmiştir. Hücre iskeleti genlerinden *aktin*'in erken diyapozda artışı, diyapoza hazırlanan dişilerin artan uçuş aktivitesini yansıtıyor olabilir (Robich vd. 2007),

Ostrinia nubilalis (Lepidoptera: Pyralidae) larva döneminde diyapoza girmektedir. Stresle ilgili proteinleri kodlayan seçilmiş genlerin ifadesinde diyapozun başlangıç fazı sırasında, *Grx, Hsp90, Hsc70* ve *Hsp20.1* önemli ölçüde yukarı ifade edilmiştir. Daha sonra, diyapozun erken evresinde, çoğu genin ifadesi (*Trx* ve *Hsp20.1* hariç) sıcak iklime alışmış larvalarda ifadesini fazla iken, soğuk iklime alışmış larvalarda sadece *Trx* ve *Hsp90* genlerinin regüle olduğu saptanmıştır. Ayrıca, tüm genlerin (*Trx* hariç) ifadesi soğuğa alışmış larvalarda diyapoz boyunca kademeli olarak artmıştır. Hem diyapoz programlamasının hem de sıcaklıkların O. *nubilalis*'te stresle ilgili genlerin ekspresyonunu etkilediği düşünülmüştür (Popović vd. 2015).

Galleria melonella'da (Lepidoptera: Pyralidae) 82-kDa'lık bir depolama proteinini kodlayan bir gen sadece diyapoz sırasında ifade edilirken 76-kDa proteini kodlayan diğer gen 4. dönemden itibaren larvalarda tespit edilmiştir. Bu genlerin sadece yağ dokuda ifade edildiği belirlenmiştir (Godlewski 2001). Çalışmamız her ne kadar farklı dokulara yönelik olmasa da ifade edilen genlerin burada olduğu gibi belli dönemlere özgü olarak ifade edilmediği bulunmuştur. Tüm genler her dönem için düşük seviyede olsa da ifade edilmiştir. Bu durum bu genlerin sadece diyapoz dönemine özgü olmadığını düşündürmüştür.

Tez kapsamında yapılan analizlere göre tüm genlerin soğuk baskısı koşulunda fazla ifade edildiği bulunmuştur. Bu sonuç diğer birçok çalışmada yapılan deneyleri destekler nitelikte bulunmuştur. Yapılan çalışmaların çoğunda diyapoz üzerine soğuk hava ya da ortam şartlarının etkililiği vurgulanmıştır. *T. granarium* bireylerinde soğuk baskısının diyapoz fizyolojisini ve genlerini etkilemesi açısından önemli bir parametre olduğu bulunmuştur. Genlerin dönemler arasında ifade seviyelerinin karşılaştırmasına göre genlerin her dönemde farklı oranlarda ifade edildiği bulunmuştur. Bu durum çalışılan genlerin sadece belli bir döneme özgü olmadığını düşündürmüştür.

Tez kapsamında çalışılmış olan farklı baskı koşularındaki tüm genlerin ifade ediliyor olması bu koşulların doğada hepsinin ya da bazılarının bir arada olacağı düşünüldüğünde bu genlerin yine ifade edileceğini dolayısıyla böceğin diyapozuna katkı sağlayacağını düşündürmüştür.

Gelişimdeki duraklama dönemi olarak diyapoz, tüm organizmalarda ve hücrelerde gelişmeyi sıralı olarak durduran ve yeniden başlatan düzenleyici mekanizmaları araştırmak için eşsiz bir fırsat sunar. Böylece gelecekteki diyapoz araştırması, sadece böcek mevsimselliğinin moleküler temelinin anlaşılmasına değil, aynı zamanda ziraat ve biyomedikal bilimlerdeki diğer güncel konulara da katkıda bulunmak için zengin bir potansiyel sunmaktadır (Denlinger 2002).

Günümüzde zararlı böceklerle mücadelede uygulanan biyoteknolojik uygulamalar, zararı oluşturan ya da zararlı ile mücadeleyi zorlaştıran böcek mekanizmasındaki hedef genin bilgisine sahip olmayı gerektirmektedir. Böylece hedef genin baskılanması ve susturulmasına olanak sağlanabilmekte, hatta böceğin beslendiği bitki üzerinden bir takım uygulamalarla böceğin gelişiminin, mekanizmalarının sekteye uğratılması ve üremesi engellenebilmesi mümkün olmaktadır. Bu tez çalışmasıyla belirlenen genlerin hangi baskı koşullarında nasıl regüle olduğu, ayrıca genin hangi dönemden itibaren transkribe olmaya başladığı ya da daha fazla ifade edildiği bilgileri sunulmuştur. Elde edilen verilerin zararlının fizyolojisinin tanınması ve buna yönelik mücadele modellerinin geliştirmesinde bir bakış açısı kazandıracağı öngörülmüştür. Ülkemiz açısından önemli bir değere sahip olan hububat ürünlerinde, ciddi kayıplara yol açan söz konusu zararlı *T. granarium*'un diyapoz fizyolojisini etkilediği düşünülen genler hakkında yapılmış olan bu çalışmanın diğer bilimsel çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Ahmed, K. S. 1996. Studies on the ectoparasitoid, *Anisopteromalus calandrae* How. (Hymenoptera: Pteromalidae) as a biocontrol agent against the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Fab.) in Saudi Arabia. Journal of Stored Products Research, 32 (2), 137-140.

Ahmedani, M. S., Shaheen, N., Ahmedani, M. Y., & Aslam, M. 2007. Status of phosphine resistance in khapra beetle, *Trogoderma granarium* (Everts) strains collected from remote villages of Rawalpindi district. Pak. Entomol, 29 (2), 95 102.

Ali, S. S., Asif, M., Sirvastava, S. P., & Shankar, P. 2011. First report on susceptibility of Khapra beetle (*Trogoderma granarium*) against *Steinernema masoodi* (Ali, et al., 2005) and its in vivo production. Trends in Biosciences, 4 (1), 140-141.

Ameen, A. 2012. *Trogoderma granarium* Everts, khapra beetle. IN Division. P-PHS (Ed.) Ottawa, Ontario, Canada., Canada Food Inspection Agency (CFIA).

Andrewartha, H. G. 1952. Diapause in relation to the ecology of insects. Biological Reviews, 27 (1), 50-107.

Anonymous. 2021. Web Sitesi: https://gd.eppo.int/taxon/TROGGA/distribution Erişim Tarihi: 16.12.2021.

Arakane, Y., & Muthukrishnan, S. (2010). Insect chitinase and chitinase-like proteins. Cellular and molecular life sciences, 67 (2), 201-216.

Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G., & Boukouvala, M. C. 2016. Population growth of the khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) on different commodities. Journal of Stored Products Research, 69, 72-77.

Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G., Boukouvala, M. C., Mavroforos, M. E., & Kontodimas, D. C. 2015. Efficacy of alpha-cypermethrin and thiamethoxam against *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) and *Tenebrio molitor* L.(Coleoptera: Tenebrionidae) on concrete. Journal of Stored Products Research, 62, 101-107.

Athanassiou, C. G., Phillips, T. W., & 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.

Ayoub, N. A., Garb, J. E., Kuelbs, A., & Hayashi, C. Y. 2013. Ancient properties of spider silks revealed by the complete gene sequence of the prey-wrapping silk protein (AcSp1). Molecular Biology and Evolution, 30 (3), 589-601.

Bains, S. S., Battu, G. S., & Atwal, A. S. 1974. Population dynaics of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) in rural wheat stores in the Punjab. Indian Journal of Ecology.

Banks, H. J. 1977. Distribution and establishment of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae): climatic and other influences. Journal of Stored Products Research, 13 (4), 183-202.

Bao, B., & Xu, W. H. 2011. Identification of gene expression changes associated with the initiation of diapause in the brain of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. BMC Genomics, 12 (1), 1-14.

Beck, L. C.1980. Insect Photoperiodism. 2nd ed.. New York, USA: Academic Press, 387.

Beck, S. D. 1962. Photoperiodic induction of diapause in an insect. The Biological Bulletin, 122 (1), 1-12.

Beck, S. D. 1962. Photoperiodic induction of diapause in an insect. The Biological Bulletin, 122 (1), 1-12.

Bell, C. H. 1994. A review of diapause in stored-product insects. Journal of Stored Products Research, 30 (2), 99-120.

Bell, C. H., Hole, B. D., & Wilson, S. M. 1985. Fumigant doses for the control of *Trogoderma granarium* 1. EPPO Bulletin, 15 (1), 9-14.

Bogs, D. 1976. Effectiveness of methyl bromide against storage pests at low temperatures. Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR, 30, 221 222.

Bond, E. J., & Monro, H. A. U. 1984. Manual of fumigation for insect control (Vol. 54). Rome: FAO.

Borah, B., & Chahal, B. S. 1979. Development of resistance in [Khapra beetle] *Trogoderma granarium* Everts to phosphine [insecticide] in the Punjab. FAO Plant Protection Bulletin.

Burges HD,1962. Studies on the dermestid beetle *Trogoderma granarium* Everts. V. Reactions of diapause larvae to temperature. Bull. Entomol. Res. 53: 193–213

Burges HD. 1957. Studies on the dermestid beetle *Trogoderma granarium* Everts. I. Identification and duration of the developmental stages. Entomol. Mon. Mag. 93: 105–10

Burges, D. H. 1962. Diapause, pest status and control of the khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts. Annals of Applied Biology, 50 (3), 614-617.

Burges, H. D. 1963. Studies on the dermestid beetle *Trogoderma granarium* Everts. VI.-Factors inducing diapause. Bulletin of Entomological Research, 54 (3), 571-587.

Chavan, J. K. 1985. Postharvest Biotechnology of Cereals. CRC PressI Llc.

Coast, G. M. 2006. Insect diuretic and antidiuretic hormones. In Handbook of Biologically Active Peptides (pp. 157-162). Academic Press.

Correal, D. M. W. 2016. Effects of extreme temperatures on the survival of the quarantine stored-product pest, *Trogoderma granarium* (khapra beetle) and on its associated bacteria. University of Lethbridge (Canada).

Çelik, E. 2011. Farklı besinlerin *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae)'un larva ve ergininin yağ asidi içeriğine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 88, Diyarbakır

Danks, H. V. 2000. Insect cold hardiness: a Canadian perspective. Cryo letters, 21 (5), 297-308.

Day, C., & White, B. 2016. Khapra beetle, *Trogoderma granarium* interceptions and eradications in Australia and around the world (No. 1784-2016-141903).

De Wilde, J., Duintjer, C. S., & Mook, L. 1959. Physiology of diapause in the adult Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say)-I The photoperiod as a controlling factor. Journal of Insect Physiology, 3 (2), 75-85.

Dağeri, A. 2016. Süne (*Eurygaster maura*) vitellogenin genlerinin karakterizasyonu ve ifade düzeylerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 190, Ankara.

Denlinger DL. 1985. Hormonal control of diapause. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, ed. GA Kerkut, LI Gilbert, 8: 353 412. Oxford: Pergamon

Denlinger, D. L. 2002. Regulation of diapause. Annual Review of Entomology, 47 (1), 93-122.

Denlinger, D. L. 2008. Why study diapause?. Entomological Research, 38 (1), 1-9.

Denlinger, D. L., & Tanaka, S. 1989. Cycles of juvenile hormone esterase activity during the juvenile hormone-driven cycles of oxygen consumption in pupal diapause of flesh flies. Experientia, 45 (5), 474-476

Dodanlı, A., & Mutlu, Ç. 2020. Yerli Bazı Diyatom Topraklarının Laboratuvar Koşullarında Khapra, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), Larvalarına Karşı Biyolojik Etkinliği. Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi, 6 (1), 44-54.

Emerson, K. J., Bradshaw, W. E., & Holzapfel, C. M. 2009. Complications of complexity: integrating environmental, genetic and hormonal control of insect diapause. Trends in Genetics, 25 (5), 217-225.

Emerson, K. J., Bradshaw, W. E., & Holzapfel, C. M. 2009. Complications of complexity: integrating environmental, genetic and hormonal control of insect diapause. Trends in Genetics, 25 (5), 217-225.

Ferris, G. F. 1919. A remarkable case of longevity in insects (Hem., Hom.). Entomol. News, 30, 27.

Fields, P. G., & White, N. D. 2002. Alternatives to methyl bromide treatments for stored-product and quarantine insects. Annual Review of Entomology, 47 (1), 331-359.

Fliszkiewicz, M., & Wilkaniec, Z. 2007. Fatty acids and amino acids in the fat body of bumblebee *Bombus terrestris* (L.) in diapausing and non-diapausing queens. J. Apic. Sci, 51, 55-63.

Fukamizo, T., & Kramer, K. J. 1985. Mechanism of chitin oligosaccharide hydrolysis by the binary enzyme chitinase system in insect moulting fluid. Insect Biochemistry, 15 (1), 1-7.

Gehrken, U., & Doumbia, Y. O. 1996. Diapause and quiescence in eggs of a tropical grasshopper *Oedaleus senegalensis* (Krauss). Journal of Insect Physiology, 42 (5), 483-491.

Ghimire, M. N., Myers, S. W., Arthur, F. H., & Phillips, T. W. 2017. Susceptibility of *Trogoderma granarium* Everts and *Trogoderma inclusum* LeConte (Coleoptera: Dermestidae) to residual contact insecticides. Journal of Stored Products Research, 72, 75-82.

Gill, H. K., Goyal, G., & Chahil, G. 2017. Insect diapause: a review. J. Agric. Sci. Technol, 7, 454-473.

Godlewski, J., Kłudkiewicz, B., Grzelak, K., & Cymborowski, B. 2001. Expression of larval hemolymph proteins (Lhp) genes and protein synthesis in the fat body of greater wax moth (*Galleria mellonella*) larvae during diapause. Journal of Insect Physiology, 47 (7), 759-766.

Günel, T. 2007. Gen anlatımının kantitatif analizi "Real-Time PCR". Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 27, 763-767.

Hadaway, A. B. 1956. The biology of the dermestid beetles, *Trogoderma granarium* Everts and Trogoderma versicolor (Creutz.). Bulletin of Entomological Research, 46 (4), 781-796.

Hagstrum, D. W., Phillips, T. W., & Cuperus, G. 2012. Stored product protection. Kansas State University, Manhattan, KS. KSRE Publ

.

Hahn, D. A., & Denlinger, D. L.2007. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. Journal of Insect Physiology, 53 (8), 760-773.

Hoenisch, R. W. 2014. Western Plant Diagnostic Network. First Detector News. A Quarterly Pest Update for WPDN First Detectors, 7 (1), 10.

Howe, R. W. 1957. How much can the khapra beetle apread in the USA?. Journal of Economic Entomology, 50, 374-375.

Howe, R. W. 1958. A theoretical evaluation of the potential range and importance of *Trogoderma granarium* Everts in North America (Col. Dermestidae). In Proceedings of the Tenth International Congress of Entomology (Vol. 4, pp. 23-28).

Ikan, R., Stanić, V., Cohen, E., Shulov, A. 1970. The function of fatty acids in the diapause of the khapra beetle *Trogoderma granarium* Everts. Comp. Biochem. Physiol., 37 (29): 205-216.

Jood, S., & Kapoor, A. C. 1993. Protein and uric acid contents of cereal grains as affected by insect infestation. Food Chemistry, 46 (2), 143-146.

Jood, S., Kapoor, A. C., & Singh, R. 1996. Chemical composition of cereal grains as affected by storage and insect infestation. Tropical Agriculture, 73 (2).

Karlsson, M., & Stenlid, J. 2009. Evolution of family 18 glycoside hydrolases: diversity, domain structures and phylogenetic relationships. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 16 (3-4), 208-223.

Karnavar, G. K. 1972. Mating behaviour and fecundity in *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). Journal of Stored Products Research, 8 (1), 65-69.

Kavallieratos, N. G., Athanassiou, C. G., Barda, M. S., & Boukouvala, M. C. 2016. Efficacy of five insecticides for the control of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) larvae on concrete. Journal of Stored Products Research, 66, 18-24.

Kavallieratos, N. G., Athanassiou, C. G., Diamantis, G. C., Gioukari, H. G., & Boukouvala, M. C. 2017. Evaluation of six insecticides against adults and larvae of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) on wheat, barley, maize and rough rice. Journal of Stored Products Research, 71, 81-92.

Khashaved, A., Safaralizadeh, M. H., & Ghosta, Y. 2011. Pathogenicity of Iranian isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff)(Ascomycota: Hypocreales)

against *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). Biharean Biologist, 5(1), 51-55.

Kim, M., Robich, R. M., Rinehart, J. P., & Denlinger, D. L. 2006. Upregulation of two actin genes and redistribution of actin during diapause and cold stress in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. Journal of Insect Physiology, 52 (11 12), 1226-1233.

Kumar, M. K., Srivastava, C., & Garg, A. K. 2010. In vitro selection of deltamethrin resistant strain of *Trogoderma granarium* and its susceptibility to insecticides. Annals of Plant Protection Sciences, 18 (1), 26-30.

Langeberg, L. K., & Scott, J. D. (2005). A-kinase-anchoring proteins. Journal of Cell Science, 118 (15), 3217-3220.

Lindgren, D. L., & Vincent, L. E. 1970. Effect of atmospheric gases alone or in combination on the mortality of granary and rice weevils. Journal of Economic Entomology, 63 (6), 1926-1929.

Lindgren, D. L., Vincent, L. E., & Strong, R. G. 1958. Studies on hydrogen phosphide as a fumigant. Journal of Economic Entomology, 51 (6), 900-903.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods, 25 (4), 402-408.

Logan, J. M. J. 2009. An Overview of PCR Platforms In: Logan J, Edwards K, Saunders N, editors.

Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., & De Poorter, M. 2000. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database (Vol. 12). Auckland: Invasive Species Specialist Group.

Mahmood, T., Ahmad, M. S., & Ahmad, H. 1996. Dispersion of stored grain insect pests in a wheat- filled silo. International Journal of Pest Management, 42 (4), 321-324.

Masaki, S. 1980. Annual Review of Entomology. Summer diapause, 25, 1-25.

Motriuk-Smith, D., Smith, A., Hayashi, C. Y., & Lewis, R. V. 2005. Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins. Biomacromolecules, 6 (6), 3152-3159.

Mutlu, C., ÖĞRETEN, A., Cahit, K. A. Y. A., & Mamay, M. (2019). Fluence of different grain storage types on Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts, 1898 (Coleoptera: Dermestidae), infestation in southeastern Anatolia (Turkey) and its resistance to malathion and deltamethrin. Turkish Journal of Entomology, 43 (2), 131-142.

Myers, S. W., & Hagstrum, D. W. 2012. Quarantine. In Stored product protection (pp. 297-304). Kansas State University Manhattan, KS.

Nair, K. S. S., & Desai, A. K. 1973. The termination of diapause in *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera, Dermestidae). Journal of Stored Products Research, 8 (4), 275-290.

Nair, K.S.S., Desai, A.K. 1972. Some new findings on factors inducing diapause in *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera, Dermestidae). J. Stored Prod. Res., 8: 27-54.

Nakamura, A. M., Chahad-Ehlers, S., Lima, A. L. A., Taniguti, C. H., Sobrinho Jr, I., Torres, F. R., & de Brito, R. A. 2016. Reference genes for accessing differential expression among developmental stages and analysis of differential expression of OBP genes in *Anastrepha obliqua*. Scientific Reports, 6(1), 1-10.

Navarro, S., Finkelman, S., Sabio, G., Isikber, A., Dias, R., Rindner, M., & Azrieli, A. 2002. Quarantine treatment of storage insect pests under vacuum or CO_2 in transportable systems. In Proceedings of International Conference on Alternatives to Methyl Bromide (p. 375).

Norris, M. J., & Richards, M. O. 1965. The influence of constant and changing photoperiods on imaginal diapause in the red locust (*Nomadacris septemfasciata* Serv.). Journal of Insect Physiology, 11 (8), 1105-1119.

Odeyemi OO, Hassan AT. 1993. Influence of temperature, humidity and photoperiod on oviposition and larval development in *Trogoderma*. Appl. Entomol. Zool. 28 (3):275–81

Okuda, T. 1990. Significance of water contact as a factor terminating larval diapause in a stem borer, *Busseola fusca*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 57 (2), 151-155.

Paini, D. R., & Yemshanov, D. 2012. Modelling the arrival of invasive organisms via the international marine shipping network: a Khapra beetle study.

Palli, S. R., Kothapalli, R., Feng, Q., Ladd, T., Perera, S. C., Zheng, S. C., ... & Retnakaran, A. 2001. Molecular analysis of overwintering diapause. In *Insect timing: circadian rhythmicity to seasonality* (pp. 133-144). Elsevier Science BV.

Peschel, N., Chen, K. F., Szabo, G., & Stanewsky, R. 2009. Light-dependent interactions between the Drosophila circadian clock factors cryptochrome, jetlag, and timeless. Current Biology, 19 (3), 241-247.

Pingale, S. V., Rao, M. N., & Swaminathan, M. 1954. Effect of insect infestation on stored grain. I.—studies on soft wheat. Journal of the Science of Food and Agriculture, 5 (1), 51-54.

Rahman, K. A. 1942. Insect pests of stored grains in the Punjab and their control. Indian Journal of Agricultural Sciences, 12 (4), 564-587.

Rahman, M. M., Islam, W., & Ahmed, K. N. 2009. Functional response of the predator *Xylocoris flavipes* to three stored product insect pests. International Journal of Agriculture and Biology, 11 (3), 316-320.

Rajput, S. A., Khanzad, M. S., Abro, G. H., Khanzada, S. R., Syed, T. S., & Su, W. 2015. Comparative population growth and losses cause by beetle *Trogoderama granarium* (Everts) to selected past and present wheat genotypes. Int. J. Agron. Agric. Res, 6, 66-77.

Rao, N. S., Sharma, K., Samyal, A., & Tomar, S. M. S. 2004. Wheat grain variability to infestation by Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts. Annals of Plant Protection Sciences, 12 (2), 283-287.

Rinehart, J. P., & Denlinger, D. L. 2000. Heat- shock protein 90 is down- regulated during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but remains responsive to thermal stress. Insect Molecular Biology, 9 (6), 641-645.

Rinehart, J. P., Cikra-Ireland, R. A., Flannagan, R. D., & Denlinger, D. L. 2001. Expression of ecdysone receptor is unaffected by pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, while its dimerization partner, USP, is downregulated. Journal of Insect Physiology, 47 (8), 915-921.

Rinehart, J. P., Li, A., Yocum, G. D., Robich, R. M., Hayward, S. A., & 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.

Roach, S. H., & Adkisson, P. L. 1970. Role of photoperiod and temperature in the induction of pupal diapause in the bollworm, *Heliothis zea*. Journal of Insect Physiology, 16 (8), 1591-1597

Robich, R. M., Rinehart, J. P., Kitchen, L. J., & Denlinger, D. L. 2007. Diapausespecific gene expression in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L. identified by suppressive subtractive hybridization. Journal of Insect Physiology, 53 (3), 235-245.

Sağlam, Ö., Edde, P. A., & Phillips, T. W. 2015. Resistance of *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) to fumigation with phosphine. Journal of Economic Entomology, 108 (5), 2489-2495.

Salminen, T. S., Vesala, L., Laiho, A., Merisalo, M., Hoikkala, A., & Kankare, M. 2015. Seasonal gene expression kinetics between diapause phases in *Drosophila virilis* group species and overwintering differences between diapausing and non-diapausing females. Scientific Reports, 5 (1), 1-13.

Saunders, D. S. 1976. *Insect Clocks*. Oxford: Pergamon. 280

Saunders, D. S. 2001. The blow fly *Calliphora vicina*: a "clock-work" insect. In *Insect timing: circadian rhythmicity to seasonality* (pp. 1-14). Elsevier Science BV.

Saunders, D. S. 2002. *Insect clocks*. Elsevier. 576

Saunders, D. S., Lewis, R. D., & Warman, G. R. 2004. Photoperiodic induction of diapause: opening the black box. Physiological Entomology, 29 (1), 1-15.

Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols, 3 (6), 1101-1108.

Schotland, P., & Sehgal, A. 2001. Molecular control of *Drosophila* circadian rhythms. In *Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality* (pp. 15-30). Elsevier Science BV.

Sinclair, B. J., Ferguson, L. V., Salehipour-Shirazi, G., & MacMillan, H. A. 2013. Cross tolerance and cross-talk in the cold: relating low temperatures to desiccation and immune stress in insects. Integrative and Comparative Biology, 53 (4), 545-556.

Sinha RN, Utida S. 1967. Climatic areas potentially vulnerable to stored product insects in Japan. Appl. Entomol. Zool. 2: 124–32.

Spratt, E., Dignan, G., & Banks, H. J. 1985. The effects of high concentrations of carbon dioxide in air on *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). Journal of Stored Products Research, 21 (1), 41-46.

Stibick, J. 2007. New pest response guidelines: khapra beetle. USDA–APHIS–PPQ emergency and domestic programs.

Tasken, K., & Aandahl, E. M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. Physiological Reviews, 84 (1), 137-167.

Tauber, M. J., & Tauber, C. A. 1976. Insect seasonality: diapause maintenance, termination, and postdiapause development. Annual Review of Entomology, 21 (1), 81-107

Tauber, M. J., Tauber, C. A., & Masaki, S. 1984. Adaptations to hazardous seasonal conditions: dormancy, migration, and polyphenism. Ecological entomology/edited by Carl B. Huffaker, Robert L. Rabb; sponsored by the International Center for Integrated and Biological Control, the University of California and North Carolina State University, Raleigh.

Tauber, M. J., Tauber, C. A., & Masaki, S. 1986. Seasonal adaptations of insects. Oxford University Press on Demand. termination, and postdiapause development. Annual Review of Entomology, 21 (1), 81-107.

Toprak, U., Baldwin, D., Erlandson, M., Gillott, C., Hou, X., Coutu, C., & Hegedus, D. D. 2008. A chitin deacetylase and putative insect intestinal lipases are components of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix. Insect Molecular Biology, 17 (5), 573-585.

Tunaz, H. 2004. Böceklerde soğuklamanın neden olduğu normalden fazla deri değiştirme mekanizması. KTÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 7 (1), 86-91.

Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M., Synstad, B., & Eijsink, V. G. 2005. The Non-catalytic Chitin-binding Protein CBP21 from *Serratia marcescens* Is Essential for Chitin Degradation. Journal of Biological Chemistry, 280 (31), 28492-28497.

Wallace, M. M. H. 1970. Diapause in the aestivating egg of *Halotydeus destructor* (Acari: Eupodidae). Australian Journal of Zoology, 18 (3), 295-313.

Wang, X. W., Luan, J. B., Li, J. M., Bao, Y. Y., Zhang, C. X., & Liu, S. S. 2010. De novo characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development. BMC Genomics, 11 (1), 1-11.

Wang, J., Fan, H., Wang, P., & Liu, Y. H. 2019. Expression analysis reveals the association of several genes with pupal diapause in *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae). Insects, 10 (6), 169.

Wardhaugh, K. G. 1986. Diapause strategies in the Australian plague locust (*Chortoicetes terminifera* Walker). In the evolution of insect life cycles (pp. 89 104). Springer, New York, NY.

Wilches Correal, D. M. 2016. Effects of extreme temperatures on the survival of the quarantine stored-product pest, *Trogoderma granarium* (khapra beetle) and on its associated bacteria (Doctoral dissertation, Lethbridge, Alta: University of Lethbridge, Dept. of Biological Sciences).

Wilches, D. M., Laird, R. A., Floate, K. D., & Fields, P. G. 2016. A review of diapause and tolerance to extreme temperatures in dermestids (Coleoptera). Journal of Stored Products Research, 68, 50-62.

Wilches, D. M., Laird, R. A., Floate, K. D., & Fields, P. G. 2017. Effects of acclimation and diapause on the cold tolerance of *Trogoderma granarium*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 165 (2-3), 169-178.

Xu, M., & Lewis, R. V. (1990). Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87 (18), 7120-7124.

Zhu, Q., Arakane, Y., Banerjee, D., Beeman, R. W., Kramer, K. J., & Muthukrishnan, S. 2008. Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 38 (4), 452-466.

EKLER

EK 1 *T. granarium*'da *Tubilin* Geninin RT-qPCR Sonuçları

EK 2 *T. granarium*'da *Endochitinase A-like* ve *Peritrophic Matrix Protein 14 Precursor* Genlerinin RT- qPCR Sonuçları

EK 3 *T. granarium*'da *A-kinase Anchor* Protein 14-like Geninin RT-qPCR Sonuçları

EK 4 *T. granarium*'da *Spidroin* Geninin RT- qPCR Sonuçları

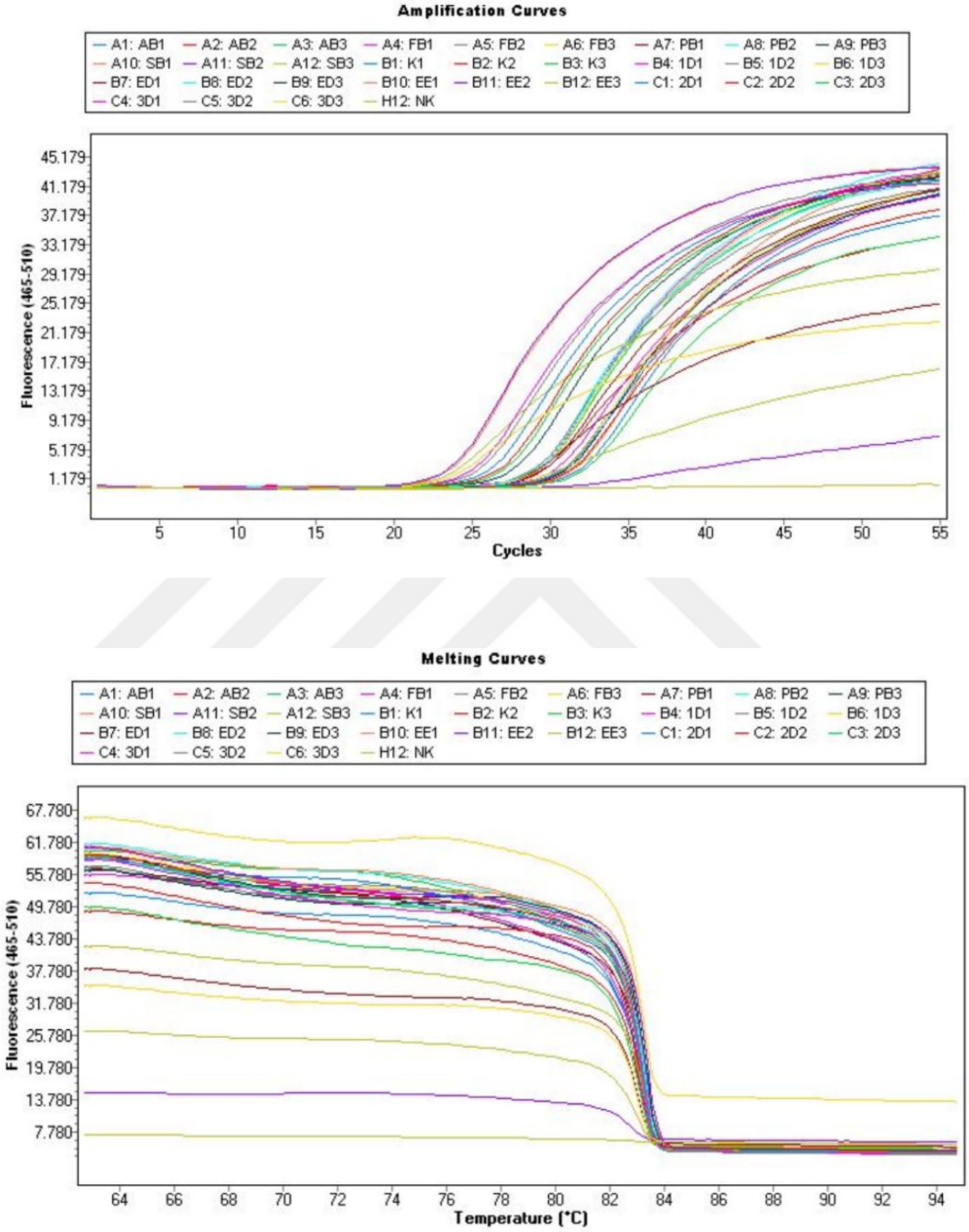
EK 5 *T. granarium*'da *Antidiuretic Hormone* Geninin RT-qPCR Sonuçları

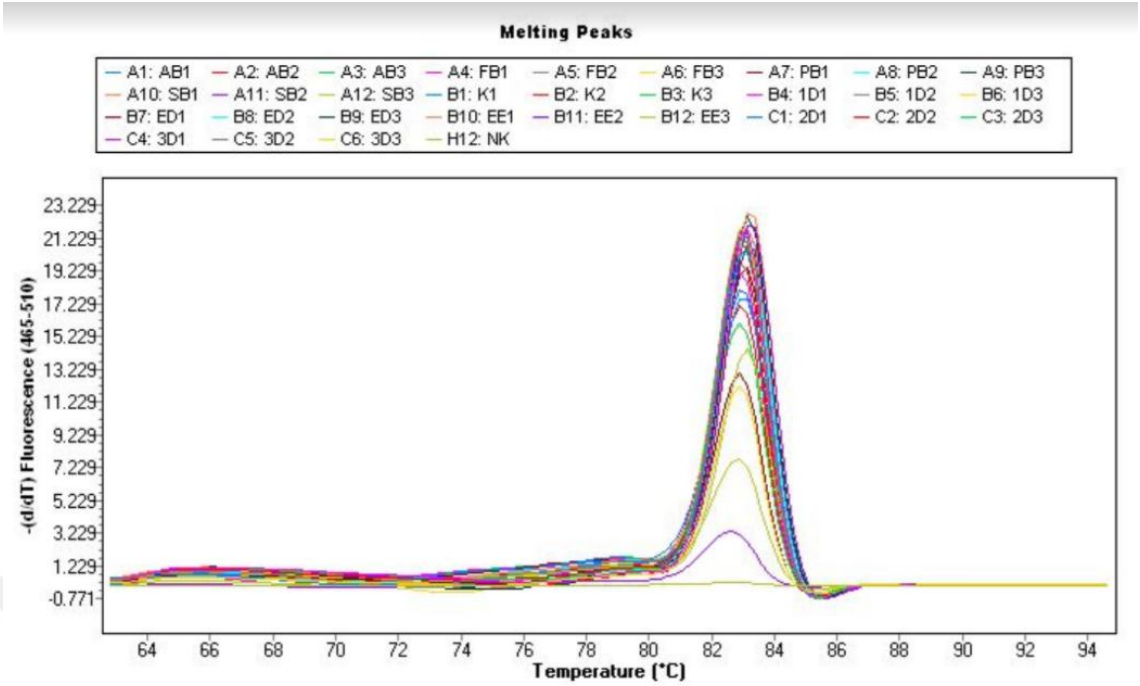
EK 6 *T. granarium* normalize edilmiş gen ifadesi seviyeleri

EK 7 *T. granarium* gen ifadesi seviyelerinin istatistiksel olarak standart sapma değerleri

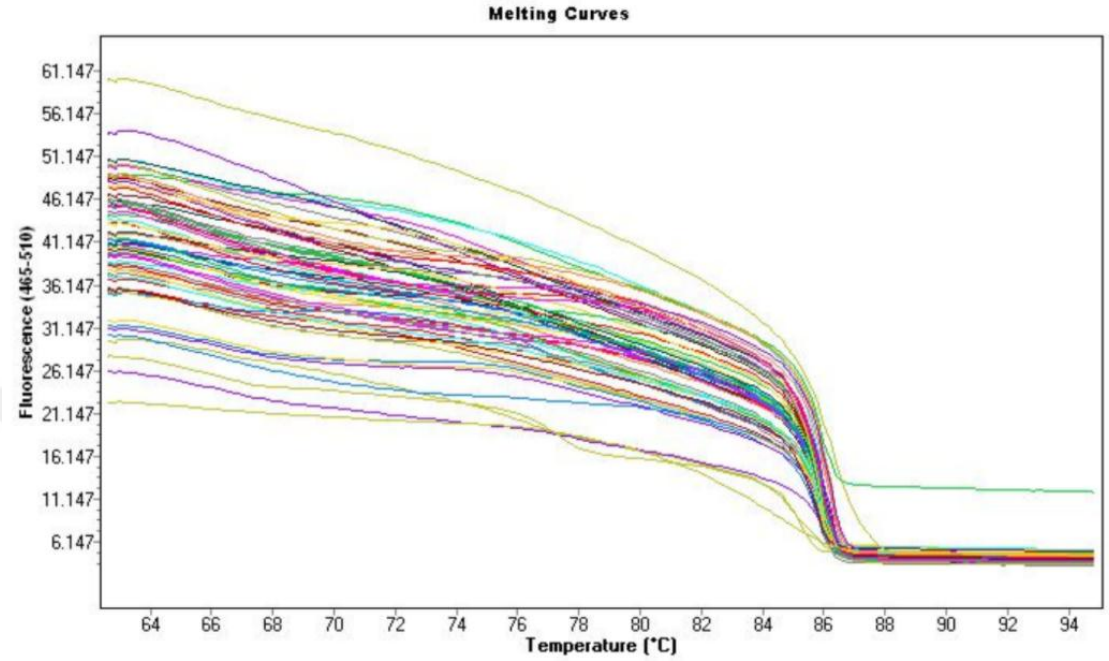
EK 8 *T. granarium* gen ifade seviyelerinin istatistiksel olarak sonuçları

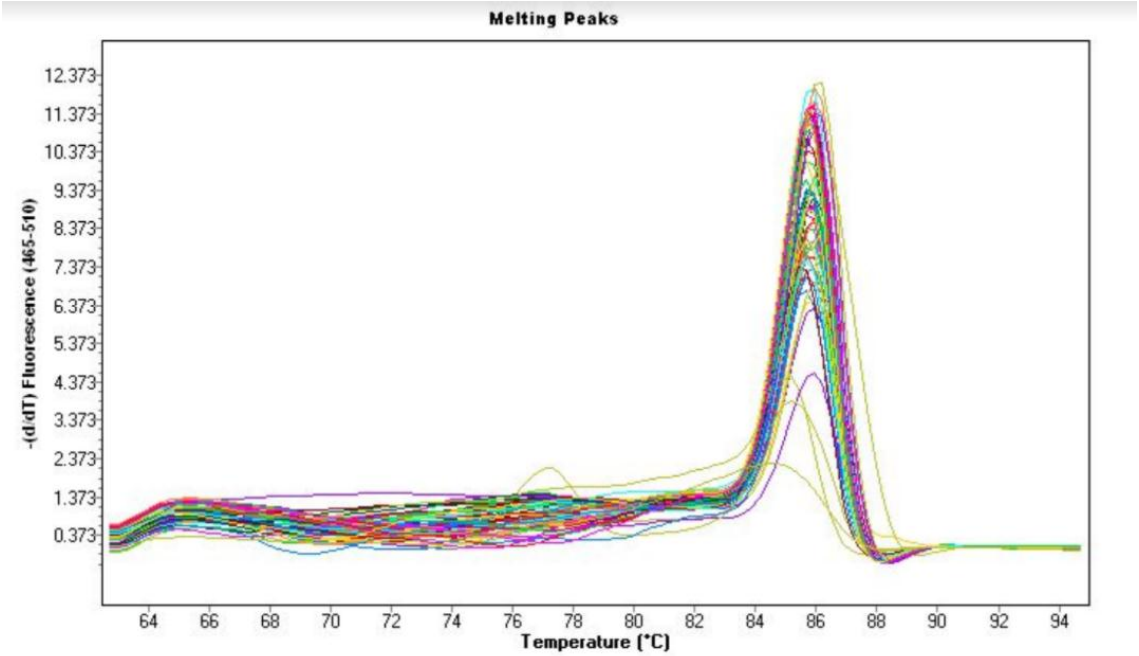
EK 1 *T. granarium*'da *Tubilin* Geninin q-PCR Sonuçları



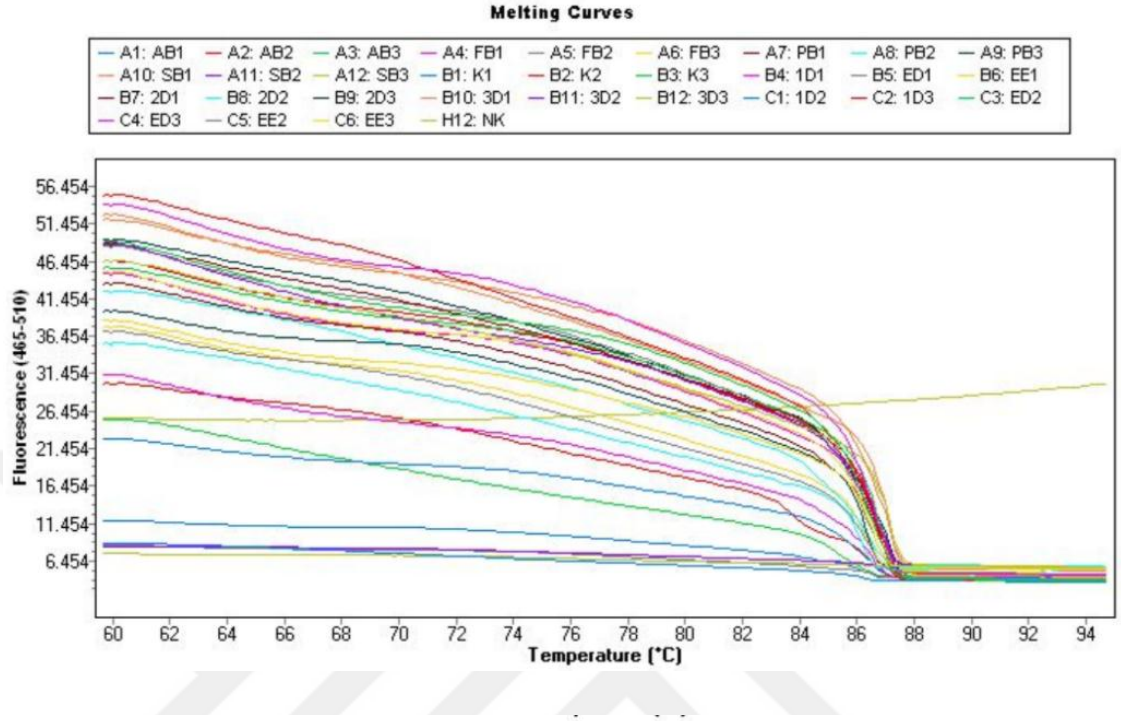

Melting Peaks
A1: AB1
A2: AB2
A3: AB3
A4: FB1
A5: FB2
A6: FB3
A7: PB1
A8: PB2
A9: PB3
A10: SB1
A11: SB2
A12: SB3
B1: K1
B2: K2
B3: K3
B4: 1D1
B5: 1D2
B6: 1D3
B7: ED1
B8: ED2
B9: ED3
B10: EE1
B11: EE2
B12: EE3
C1: 2D1
C2: 2D2
C3: 2D3
C4: 3D1
C5: 3D2
C6: 3D3
H12: NK
-(d/dT) Fluorescence (465-510)
23.229
21.229
19.229
17.229
15.229
13.229
11.229
9.229
7.229
5.229
3.229
1.229
-0.771
64
66
68
70
72
74
76
78
80
82
84
86
88
90
92
94
Temperature (°C)

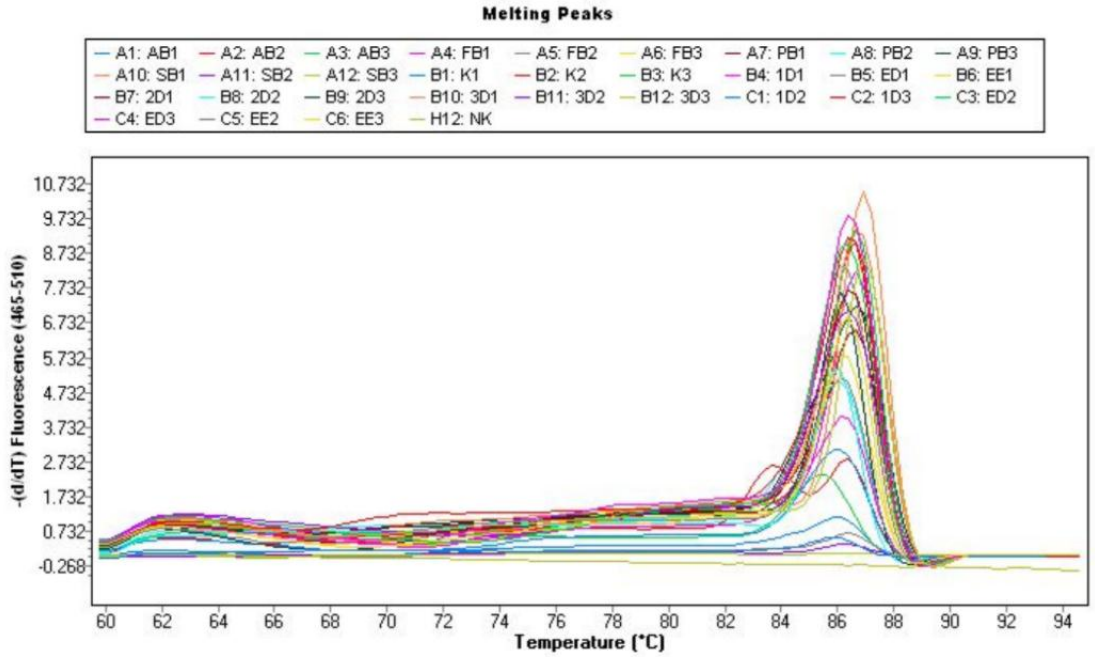
EK 2 *T. granarium'da Endochitinase A-like ve Peritrophic Matrix Protein 14* Precursor Genlerinin q-PCR Sonuçları



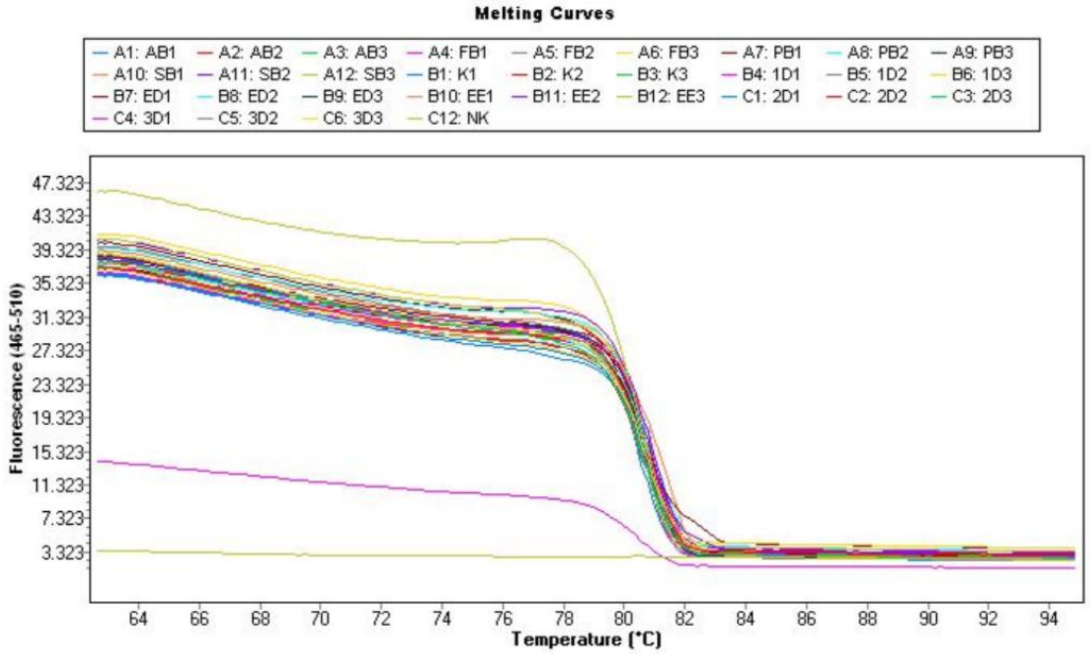


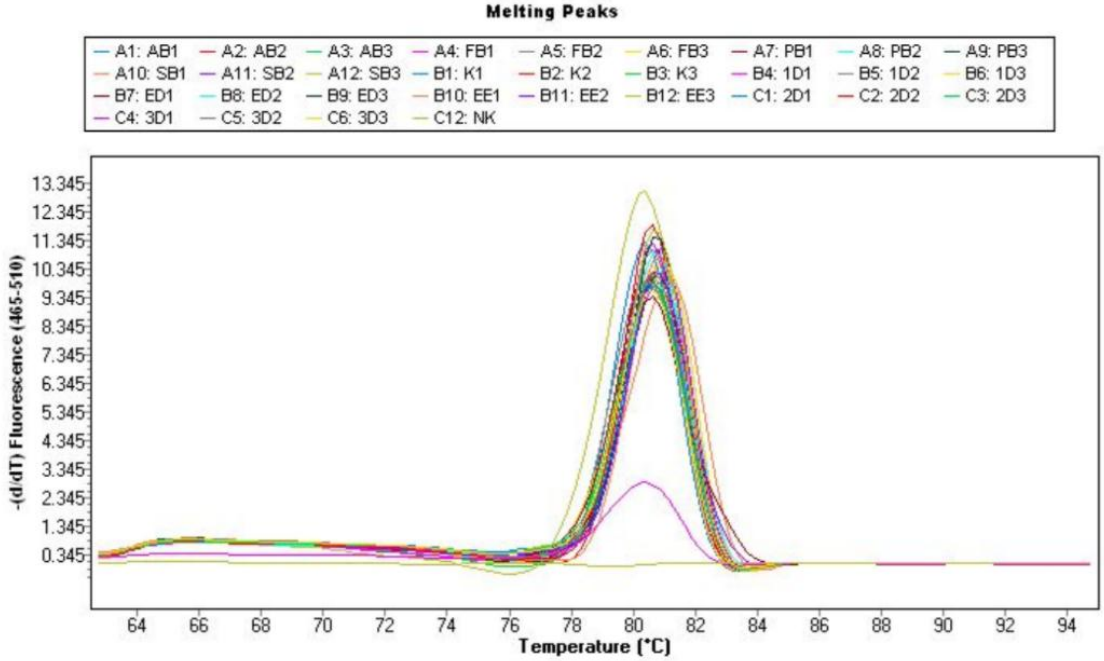
EK 3 *T. granarium'da A-kinase Anchor Protein 14-like* Geninin q-PCR Sonuçları



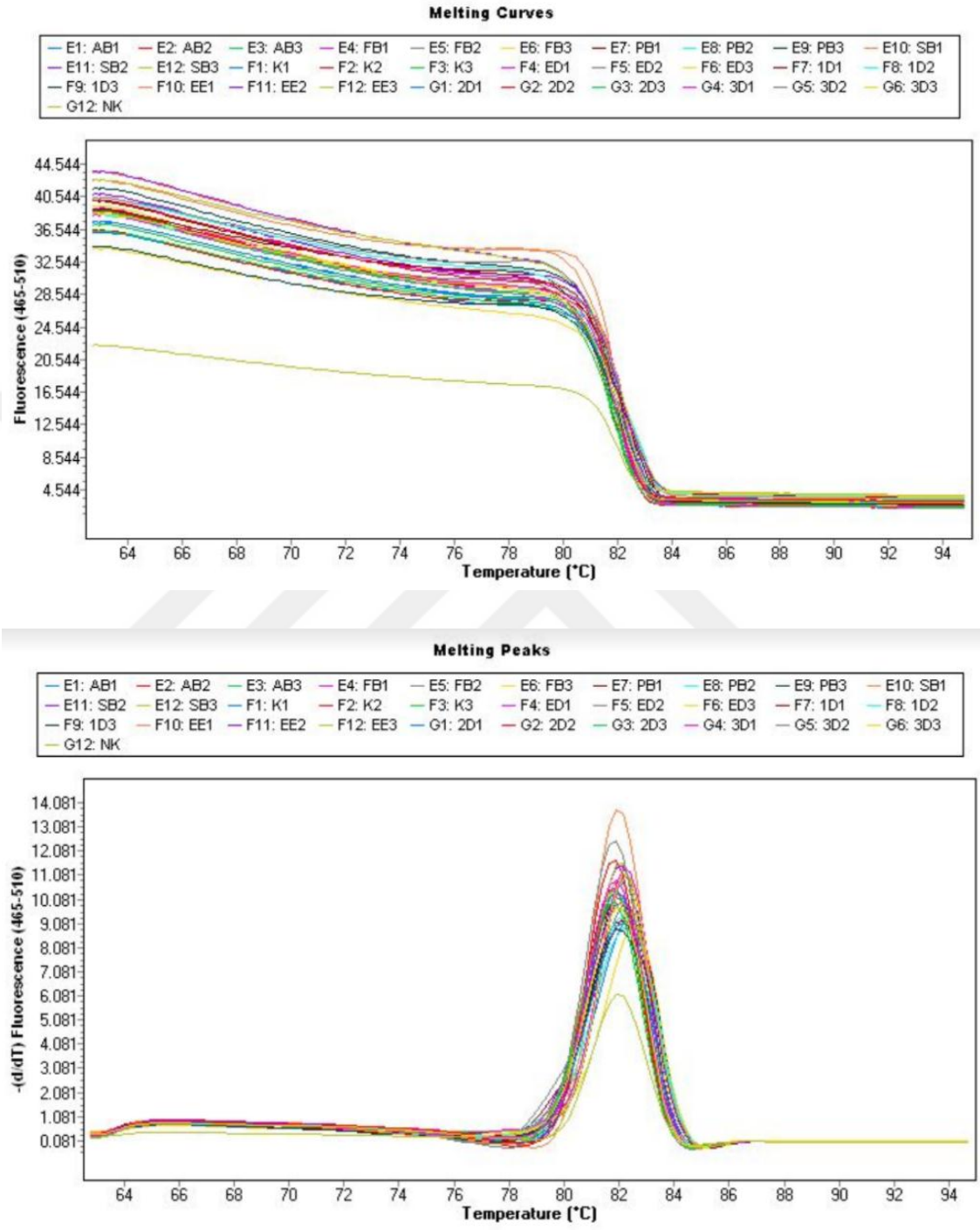


EK 4 *T. granarium*'da *Spidroin* Geninin q-PCR Sonuçları





EK 5 *T. granarium*'da *Antidiuretic Hormone* Geninin q-PCR Sonuçları



EK 6 *T. granarium* normalize edilmiş gen ifadesi seviyeleri

	EC	SP	PM	AP	ADH
Açlık Baskısı	1,16	0,58	3,61	3,41	3,17
Feçes Baskısı	0,94	0,49	6,3	10,33	7,85
Populasyon Baskısı	1,53	0,54	1,35	0,28	30,79
Soğuk Baskısı	1,52	1,06	18,82	29,55	57,58
Kontrol	1,18	1,01	1,06	1,06	1,19
	EC	SP	PM	AP	ADH
Larva 1. dönem	20,55	201,26	23,22	79,47	79,6
Larva 2. dönem	0,65	65,75	0,62	0	56,2
Larva 3. dönem	0,36	35,41	1,6	0,02	7,5
Ergin Dişi	1,26	1,52	1,71	0,49	976,2
Ergin Erkek	0,03	0,11	0,05	0,01	14,5

EK 7 *T. granarium* gen ifadesi seviyelerinin istatistiksel olarak standart sapma değerleri

	EC	SP	PM	AP	ADH
Açlık Baskısı	0,33	0,58	2,01	2,01	1,53
Feçes Baskısı	0,43	0,49	2,44	12,52	3,92
Populasyon Baskısı	1,11	0,54	0,99	0,2	27,67
Soğuk Baskısı	0,44	1,06	9,47	3,07	28,49
Kontrol	0,82	0,12	0,47	0,46	0,88
	EC	SP	PM	AP	ADH
Larva 1. dönem	0,9	53,81	10,11	13,78	18,8
Larva 2. dönem	0,03	40,23	0,35	0	47,4
Larva 3. dönem	0,06	2,57	0,79	0,01	4,6
Ergin Dişi	0,52	0,84	0,84	0,25	503,2
Ergin Erkek	0	0,02	0,02	0	2,2

EK 8 *T. granarium* gen ifade seviyelerinin istatistiksel olarak sonuçları

GENLER	F	P DEĞERİ
EC-KOŞUL	0,41	0,800
SP-KOŞUL	1,75	0,215
PM-KOŞUL	8,03	0,004
AP-KOŞUL	13,33	0,001
ADH-KOŞUL	5,44	0,014
EC-DÖNEM	1115,93	0,000
SP-DÖNEM	22,89	0,000
PM-DÖNEM	14,38	0,000
AP-DÖNEM	99,42	0,000
ADH-DÖNEM	10,34	0,001