



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***Trogoderma granarium*'da (COLEOPTERA:
DERMESTIDAE) GLUKONEOGENEZ VE
GLİKOLİZ YOLAKLARINDA GÖREV ALAN
GENLERİN TANIMLANMASI VE DİYAPOZ
SÜREÇLERİNDEKİ GEN İFADE
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

Emine KOÇAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Temmuz-2024
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Emine KOÇAK tarafından hazırlanan “*Trogoderma granarium*’da (Coleoptera: Dermestidae) glukoneogenez ve glikoliz yollarında görev alan genlerin tanımlanması ve diyapoz süreçlerindeki gen ifade düzeylerinin belirlenmesi” adlı tez çalışması 02/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ

.....

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ

.....

Üye

Prof. Dr. Levent ÜNLÜ

.....

Üye

Doç. Dr. Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ

.....

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

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

Emine KOÇAK

02/07/2024

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Trogoderma granarium*'da (COLEOPTERA: DERMESTIDAE)
GLUKONEOGENEZ VE GLİKOLİZ YOLAKLARINDA GÖREV ALAN
GENLERİN TANIMLANMASI VE DİYAPOZ SÜREÇLERİNDEKİ GEN İFADE
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

Emine KOÇAK

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

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aşlı DAĞERİ

2024, 66 Sayfa

Jüri

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aşlı DAĞERİ

Prof. Dr. Levent ÜNLÜ

Doç.Dr. Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK

Kapra böceği, *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), dünyada ve ülkemizde özellikle depolanan tahıl veya tahıl ürünlerine verdiği zararlar bilinen bir böcek türüdür. Buğday, arpa ve pirinç gibi önemli tahıl ürünlerinde ciddi zararlar oluşturması sebebiyle, böceğin kontrol altına alınması ciddi derecede önem arz etmektedir. Ancak böceğin “diyapoz” adı verilen metabolizmasının baskılandığı bir sürece girmesi, zararlıının uygun olmayan ortam koşullarına ve insektisitlere direncini artırarak, kontrolünü oldukça zor bir hale getirmektedir. Dolayısı ile böceğin diyapozda iken, hayatta kalmasına yardımcı olan gen ve gen gruplarına dair regülasyonların moleküler düzeyde detaylı bir şekilde incelenmesi bir ihtiyaç haline gelmiştir. Bu çalışmada, diyapozaya yönelik glukoneogenez ve glikoliz yollarında anahtar roller üstlenen *TgPEPCK* (*Fosfoenolpirüvat Karboksikinas*), *TgPK* (*Pirüvat Kinaz*) ve *TgPDH* (*Pirüvat Dehidrogenaz*) genleri kapra böceğinde ilk kez tanımlanmış, genlerin tahmini aminoasit dizilerinden faydalanılarak, dizilere ait biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Kapra böceğinin açlık ve soğuk ile indüklenmiş diyapoz süreçlerindeki gen ifadeleri Kantitatif Eş Zamanlı PCR (RT - qPCR) kullanılarak analiz edilmiştir. Pre-diyapoz, diyapoz ve post-diyapoz fazlarında incelenen detaylı gen analizlerinde, *TgPEPCK* geninin en yüksek seviyesinin, diyapoz fazında ifade olduğu tespit edilmiştir. Bu durum *TgPEPCK* geninin böceğin enerji tasarrufu ve stres direncine hazırlanma sürecinde görev alabildiğini akıllara getirmektedir. *TgPK* geni açlık diyapozunda en yüksek ifade seviyesini post-diyapoz fazında, soğuk diyapozunda ise diyapozun beşinci haftasında (5 °C’ de) göstermiştir. Bu sonuçlar, *TgPK* geninin açlık diyapozundan çıkarken, azalan enerji ihtiyacı ile artan ifadesini ortaya koymaktadır. Soğuk diyapozu ile görülen yukarı yönde regülasyonunun ise, böceğin donmasını engelleyen kriyoprotektan moleküllerinin sentezi ile ilişkili olduğuna işaret edilebilir. *TgPDH* geni, açlık diyapozunda diyapoz fazının sekizinci haftasında; soğuk diyapoz fazının ise ikinci ve üçüncü haftalarında en yüksek ifadeleri göstermiştir. Bu gözlemler indüklenen diyapozaya bağlı olarak, *TgPDH* geninin diyapozdaki böceğin enerji yönetimi ve hayatta kalma stratejileri ile ilişkili olabileceğine vurgulayabilir. *TgPEPCK*, *TgPK* ve *TgPDH* genlerinin kapra böceğinin diyapoz süreçleri boyunca ifade seviyelerindeki değişiklikler, bu genlerin moleküler seviyedeki önemlerine dikkat çekmektedir. Glukoneogenez ve glikoliz yollarında görev alan diğer gen ve gen gruplarının tanımlanması ve fonksiyonel analizlerinin gerçekleştirilmesi, kapra böceği diyapozunun aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Açlık baskısı, Diyapoz, Gen ifadesi, Glukoneogenez, Soğuk baskısı

ABSTRACT

MS THESIS

IDENTIFICATION OF GENES INVOLVED IN GLUCONEOGENESIS AND GLYCOLYSIS PATHWAYS IN *Trogoderma Granarium* (COLEOPTERA: DERMESTIDAE) AND DETERMINATION OF GENE EXPRESSION LEVELS DURING DIAPAUSE PROCESSES

Emine KOÇAK

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

Advisor: Assist. Prof. Dr. Ash DAĞERİ

2024, 66 Pages

Jury

Assist. Prof. Dr. Ash DAĞERİ

Prof. Dr. Levent ÜNLÜ

Assoc. Prof. Dr. Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK

The khapra beetle, *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), is a pest known for its significant damage to stored grains and grain products globally and in our country. Controlling this pest is of critical importance due to its severe impact on key cereal crops such as wheat, barley, and rice. However, the insect's entry into a state called diapause, a period of suppressed metabolism, enhances its resistance to adverse environmental conditions and insecticides, making control efforts challenging. Thus, there is a crucial need to investigate the molecular regulation of genes and gene groups that aid the insect's survival during diapause. In this study, the genes *TgPEPCK* (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase), *TgPK* (Pyruvate Kinase), and *TgPDH* (Pyruvate Dehydrogenase), which play key roles in gluconeogenesis and glycolysis pathways, were identified in the khapra beetle for the first time. Bioinformatic analyses were conducted based on the predicted amino acid sequences of these genes. Gene expressions during starvation- and cold-induced diapause were analyzed using Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR). Detailed gene expression analyses across pre-diapause, diapause, and post-diapause phases revealed that *TgPEPCK* was most highly expressed during the diapause phase, suggesting its role in the insect's energy conservation and stress resistance processes. The *TgPK* gene showed its highest expression level in the post-diapause phase during starvation diapause and in the fifth week (at 5°C) of cold diapause, indicating increased expression correlating with decreased energy requirements when exiting starvation diapause and a potential role in synthesizing cryoprotectant molecules during cold diapause. *TgPDH* gene expression peaked in the eighth week of starvation diapause and in the second and third weeks of cold diapause, highlighting its potential involvement in energy management and survival strategies during induced diapause. The variations in expression levels of *TgPEPCK*, *TgPK*, and *TgPDH* genes throughout the khapra beetle's diapause processes highlight their molecular significance. Identifying and functionally analyzing other genes and gene groups involved in gluconeogenesis and glycolysis pathways will further elucidate the diapause mechanisms of the khapra insect.

Keywords: Cold stress, Diapause, Gene expression, Gluconeogenesis, Starvation stress

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca benim için elinden geleni yapan tüm çalışmalarında yanımda olan bana akademik bakış açısı kazandıran beni daima ileriye götürmek için uğraşan bilimsel bilgi ve deneyimlerini hiç çekinmeden seferber eden değerli ve saygıdeğer hocam Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ'ye en içten duygularıyla minnet duyar, teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Bu tez çalışmasını destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne ve tez deney ve analizlerinin büyük bir kısmının gerçekleştiği Necmettin Erbakan Üniversitesi BİTAM (Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi)'a, teşekkür ederim.

Bu süreçte bana her türlü desteği sağlayan değerli arkadaşlarım Hasan SİVRİKAYA, Feyza KOSTAK, Merve BAŞTUTAN, Ayşenur ALTINKAYA ve Ümran ATA'ya değerli katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca beni destekleyen bana sonuna kadar güvenen benimle maddi ve manevi sıkıntılarımı paylaşan değerli eşim Mehmet KOÇAK ve değerli annem Hürrem KOÇAK'a sonsuz teşekkürlerimi ve minnettarlığımı sunarım.

Son olarak tüm lisans ve yüksek lisans sürecinde varlığı ile motive olduğum gördüğümde tüm yorgunluğumu unuttuğum güzel kızım Ayşe Zümra KOÇAK'a en içten sevgilerimi sunarım.

Emine KOÇAK
KONYA-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
ÇİZELGELER LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. <i>Trogoderma granarium</i> (Kapra böceği)	5
2.2. <i>Trogoderma granarium</i> 'un biyolojik gelişimi.....	5
2.2.1. Yumurta	6
2.2.2. Larva	7
2.2.3. Pupa	8
2.2.4. Ergin.....	9
2.3. <i>Trogoderma granarium</i> 'un zararının ekonomik etkisi ve önemi	10
2.4. <i>Trogoderma granarium</i> 'un tespiti	11
2.5. <i>Trogoderma granarium</i> 'la mücadele yöntemleri	11
2.5.1. Kimyasal yöntemler	12
2.5.2. Kimyasal olmayan yöntemler	13
2.6. Diyapoz	14
2.6.1. Diyapozun aşamaları.....	15
2.6.2. Diyapozun moleküler mekanizması.....	16
2.6.3. Diyapozun hormonal mekanizması	17
2.6.4. Diyapozu etkileyen faktörler	19
2.6.5. <i>Trogoderma granarium</i> 'da diyapoz.....	22
2.7. Glukoneogenez	23
2.7.1. PEPCK (Fosfoenol Pürivat Karboksikinas)	26
2.7.2. PK (Piruvat Kinaz).....	27
2.7.3. PDH (Piruvat Dehidrogenaz).....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Kapra böceğinin laboratuvar ortamında yetiştirilmesi	29
3.2. Diyapozun indüklenmesi	29
3.3. RNA izolasyonu.....	30
3.4. cDNA sentezi	31
3.5. Seçilen genlere uygun primerlerin tasarlanması	31
3.6. RT - qPCR analizi.....	32
3.7. Seçilen genlerin biyoinformatik ve filogenetik analizi.....	33

3.8. Verilerin istatistiksel analizi	33
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Biyoinformatik ve filogenetik analiz	34
4.1.1. <i>TgPEPCK</i> geninin biyoinformatik ve filogenetik analizi.....	34
4.1.2. <i>TgPK</i> geninin biyoinformatik ve filogenetik analizi	36
4.1.3. <i>TgPDH</i> geninin biyoinformatik ve filogenetik analizi	39
4.2. <i>TgPEPCK</i> , <i>TgPK</i> ve <i>TgPDH</i> genlerinin diyapozla ilişkili ifade seviyelerinin analizi.....	41
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	50
5.1 Sonuçlar	50
5.2 Öneriler	50
6. KAYNAKLAR	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. <i>Trogoderma granarium</i> 'un yaşam döngüsü	5
Şekil 2.2. <i>Trogoderma granarium</i> yumurtaları.....	7
Şekil 2.3. <i>Trogoderma granarium</i> larvaları.....	8
Şekil 2.4. <i>Trogoderma granarium</i> pupası.....	9
Şekil 2.5. <i>Trogoderma granarium</i> 'un erkek (sol) ve dişi (sağ) ergini.....	10
Şekil 2.6. Diyapozun aşamaları	16
Şekil 2.7. Diyapozun hormonal mekanizması	19
Şekil 2.8. Glikoliz ve glukoneogenez yolağında bulunan enzimatik mekanizma.....	25
Şekil 3.1. Açlık baskısı ile indüklenen diyapoz sürecinin şematik gösterimi.....	30
Şekil 3.2. Soğuk baskısı ile indüklenen diyapoz sürecinin şematik gösterimi.....	30
Şekil 4.1. <i>Leptinotarsa decemlineata</i> (XP_023026296.1), <i>Tribolium madens</i> (XP_044265737.1), <i>Tribolium castenauum</i> (XP_975997.1) ve <i>Trogoderma granarium</i> 'un MUSCLE aracı kullanılarak PEPCK aminoasit dizi hizalanması.....	34
Şekil 4.2. TgPEPCK'nın üç boyutlu tahmini protein yapısı	35
Şekil 4.3. 13 adet farklı böcekten elde edilen PEPCK'lardan oluşturulan filogenetik ağaç.....	36
Şekil 4.4. <i>Aethina tumida</i> (XP_019875157.1), <i>Dendroctonus ponderosae</i> (XP_048524062.1), <i>Tribolium castenauum</i> (XP_966698.2) ve <i>Trogoderma granarium</i> 'un MUSCLE aracı kullanılarak PK aminoasit dizi hizalaması.....	37
Şekil 4.5. TgPK'nın üç boyutlu tahmini protein yapısı.	38
Şekil 4.6. 10 adet farklı böcekten elde edilen PK'lardan oluşturulan filogenetik ağaç	38
Şekil 4.7. <i>Leptinotarsa decemlineata</i> (XP_023024898.1), <i>Tribolium madens</i> (XP_044269622.1), <i>Anoplophora glaripennis</i> (XP_018577560.1), ve <i>Trogoderma</i> <i>granarium</i> 'un MUSCLE aracı kullanılarak PDH aminoasit dizi hizalaması.....	39
Şekil 4.8. TgPDH'nin üç boyutlu tahmini protein yapısı	40
Şekil 4.9. 10 adet farklı böcekten elde edilen PDH'lardan oluşturulan filogenetik ağaç	41
Şekil 4.10. TgPEPCK'nın açlık diyapozu süresince göreceli mRNA seviyeleri.....	42
Şekil 4.11. TgPEPCK'nın soğuk diyapozu süresince göreceli mRNA seviyeleri	43
Şekil 4.12. TgPK'nın açlık diyapozu süresince göreceli mRNA seviyeleri	43
Şekil 4.13. TgPK'nın soğuk diyapozu süresince göreceli mRNA seviyeleri.....	44
Şekil 4.14. TgPDH'nin açlık diyapozu süresince göreceli mRNA seviyeleri	45
Şekil 4.15. TgPDH'nin soğuk diyapozu süresince göreceli mRNA seviyeleri.....	45

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cDNA sentez reaktif ürünleri.....	31
Çizelge 3.2. Tez çalışması için elde edilen primerler.....	32
Çizelge 3.3. RT – qPCR çalışması için kullanılan reaktifler ve hacimleri.....	32



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

CO ₂	:	Karbondioksit
μL	:	Mikrolitre
kDA	:	Kilodalton
mm	:	Milimetre
g	:	Gram
s	:	Saniye
°C	:	Santigrat Derece
M _w	:	Moleküler Ağırlık
dk	:	Dakika
pI	:	İzoelektrik Nokta

Kısaltmalar

2 ^{-ΔΔCt}	: Bağlı nicel yöntem
ADP	: Adenozin difosfat
AFP	: Antifreeze protein maxi-like
AMPK	: Adenozin 5'-Monofosfat ile Aktive olan Protein Kinaz
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
ATP	: Adenozin trifosfat
c-AMP	: Siklik Adenozin monofosfat
cDNA	: Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit
CPT1	: Karnitin Palmitoiltransferaz I
CT	: Döngü Eşiği
DH	: Diyapoz Hormonu
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dsRNA	: Çift İplikli Ribonükleik Asit
EPPO	: Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotit
FOXO	: Forkhead Transkripsiyon Faktörü
HIF	: Hipoksi ile İndüklenebilir Transkripsiyon Faktörü
HSP	: Isı Şok Protein
HSP23	: Isı Şok Protein 23
HSP70	: Isı Şok Protein 70
HSP90	: Isı Şok Protein 90
HSP60	: Isı Şok Protein 60 geni
HSP68	: Isı Şok Protein 68 geni
HSP83	: Isı Şok Protein 83 geni
IDT	: Integrated DNA Technologies
LAMP	: Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon
NAD	: Nikotinamid Adenin dinükleotit
NADP ⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDH	: Pirüvat Dehidrogenaz
PEP	: Fosfoenol Piruvat
PEPCK	: Fosfoenol Piruvat Karboksikinaz
PEPCK-C	: Fosfoenolpiruvat Karboksikinaz-Sitozolik
PEPCK-M	: Fosfoenolpiruvat Karboksikinaz-Mitokondriyal
PK	: Piruvat Kinaz
PTTH	: Protorasikaoropik Hormon
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT – qPCR	: Kantitatif Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDH	: Sorbitol Dehidrogenaz
sHSP	: Küçük Isı Şok Proteinini
TBE	: Tris Borat Etilen Diamin Tetraasetik Asit
TCA	: Trikarboksilik asit
TgPDH	: <i>Trogoderma granarium</i> Pirüvat Dehidrogenaz geni
TgPEPCK	: <i>Trogoderma granarium</i> Fosfoenolpiruvat Karboksikinaz geni
TgPK	: <i>Trogoderma granarium</i> Pirüvat Kinaz geni
UV	: Ultraviyole

1. GİRİŞ

Kapra böceği *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), istilacı davranış sergileyen, buğday ve birçok depolanan ürüne en çok zarar veren böcek türlerinden biridir (Banks, 1977; Lowe ve ark., 2000; Naseri ve Borzoui, 2016). Hindistan'dan köken alan *T. granarium* Asya, Avrupa ve Afrika kıtalarının birçok ülkesinde görülmektedir (Rahman, 1945; Kavallieratos ve ark., 2019). A2 karantina zararlısı olarak sınıflandırılan, tespiti ve kontrolü oldukça önem kazanan *T. granarium*, depo ürünlerine verdiği zararlar ve ülkelerin ihracatının azalmasına neden olduğu göz önünde bulundurulduğunda depo böcek zararlılarının başında gelmektedir (Athanassiou ve ark., 2019; EPPO, 2021).

Trogoderma granarium erginleri zararsızdır; ancak larva dönemi en çok zarar veren dönemdir (Ahmedani ve ark., 2007). Kapra larvaları tarafından istila edilen depo ürünlerinin karbonhidrat, ham yağ ve proteinleri ciddi oranda zarar görmektedir (Mardani-Talaei ve ark., 2017), bu da biyokütle ve gıda kalitesinin azalmasına sebep olmaktadır (Mohammadzadeh ve ark., 2018). Depolanan tahıllarda *T. granarium* istilası sonrasında %5 ila %30 arasında kayıp meydana gelebilmektedir. Hatta bu kayıp bazı durumlarda %70 seviyesine kadar çıkabilmektedir (Amaar ve El Refai, 2015). Böceğin dış kabukları, tüyleri ve diğer vücut parçalarıyla da insanlarda solunum yolu ve cilt tahrişleri meydana gelebilmektedir (Yadav ve ark., 2020).

Trogoderma granarium'un kontrolü kapsamında sık uygulanan yöntem, korunacak bölge yüzeylerine direkt uygulanan insektisitlerdir (Ghimire ve ark., 2017). Bu amaçla geçmiş yıllarda metil bromür ile fumigasyon işlemi yaygın olarak yapılmıştır. Ancak, metil bromürün, ozon tabakasını inceltmesi, çevreye zarar vermesi nedeni ile kullanımı geçmişe nazaran azaltılmıştır (Wilches ve ark., 2019). Diğer yaygın kullanılan fumigantlardan biri olan fosfine karşı kapra böceğinde gelişen direncin rapor edilmesi ile bu zararlı ile mücadelede kullanılan kimyasallara alternatif yöntemlerin bulunması gündeme gelmiştir (Sakka ve ark., 2022). Böcek üzerinde son zamanlarda toksisite oranı düşük ve çevre dostu böcek kontrol ajanları bulmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır ve bu alanda edinilen başarılar söz konusudur (Almadiy ve ark., 2018).

Trogoderma granarium'u kontrol altına almak için böceğin diyapoz dönemini iyi kavramak gerekmektedir. Diyapoz halindeki böcekler, fumigasyon ile kontrol

yöntemlerine karşı, aktif döneme kıyasla, oldukça dayanıklıdır (Bell ve Wilson, 1995). Diyapoz gelişme döneminin durdurulmasını temsil etmektedir. Ancak, bu durum gelişimin tamamen durduğu anlamına gelmemektedir. Diyapozdaki böceklerde gelişim devam edebilir, ancak bu, diyapoza girmeyen böceklere göre çok daha yavaş bir hızda seyreder (Denlinger ve ark., 2016). Böceklerde diyapoz zorunlu ve fakültatif olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Zorunlu diyapozda böcekler dış koşullara bakılmaksızın diyapozdan geçmektedir. Fakültatif diyapozda ise dışarıdan bir indükleme söz konusudur ve çevresel koşulların uygun olmadığı durumlarda görülmektedir (Wilches ve ark., 2016). *Trogoderma granarium* larvaları, düşük sıcaklığa maruz kalma, yetersiz gıda, kalabalık koşullarda yetiştirme ve feçes yoğunluğu gibi çevresel koşulların uygun olmadığı durumlarda fakültatif diyapoza girmektedir (Wilches ve ark., 2017). Çevresel koşullar normale dönene kadar, böceğin larvaları, birkaç yıl boyunca ara sıra beslenebilecekleri ve tüy dökmeye devam edebilecekleri ancak gelişimlerini tamamlayamayacakları bir diyapoz dönemi geçirmektedir (Gourgouta ve ark., 2021).

Diyapoza giren canlılarda moleküler mekanizmalar, gen düzeyinde transkripsiyon, post-transkripsiyon ve translasyon boyutundaki süreçleri etkileyerek biyokimyasal yolların, metabolik ürünlerin ve enerji üretiminin ayarlanmasını sağlar (MacRae, 2010). Olumsuz çevre koşullarına maruz kalarak diyapoza giren canlılarda, enerji dengesini ve hücrenin yapısal bileşenlerini korumak için metabolizmada hızlı değişiklikler meydana gelmektedir (Teets ve ark., 2013). Gen ifade profillemesi çalışmaları ile diyapoz halindeki böceklerde meydana gelen metabolik değişiklikler, gelişim durgunluk seviyeleri ve bunlara eşlik eden fizyolojik durumlar hakkında önemli bilgiler ortaya konulabilmektedir (Poelchau ve ark., 2013a).

Diyapoz dönemine giren böceklerin metabolizması, oksidatif fosforilasyondan glikoliz ve glukoneogeneze doğru büyük bir geçiş yapmaktadır (Penkov ve ark., 2020). Böcekte enerji tüketimi, ısı üretimi, oksijenli solunum ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsü azalmaktadır. Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP⁺) gibi yapım reaksiyonlarında görev alan enzime gerekli olan kofaktör üretimi yavaşlayarak, glikoliz ve glukoneogenez yolları ile karbonhidrat üretimi sağlanmaktadır (Homem ve ark., 2014; Erkut ve ark., 2015; Yılmaz ve ark., 2017). Glukoneogenezde yer alan Fosfoenolpiruvat Karboksikinaz (Phosphoenolpyruvate carboxykinase : PEPCK)'ın diyapoz ve çeşitli stres tepkileri sırasında gerçekleştirilmiş birçok transkriptomik

çalışmada anahtar rol üstlendiği izlenmiştir (Spacht ve ark., 2018). PEPCK enziminin tüm ökaryotlarda sitozolik ve mitokondriyal formu mevcuttur (Guo ve ark., 2019). Mitokondriyal formu pirüvat karboksilat tarafından mitokondride üretilen oksaloasetatı fosfoenol piruvat (Phosphoenolpyruvate : PEP)'e dönüştürmede görev alır (da Silva ve ark., 2021). Sitozolik formu ise oksaloasetatı malata indirgeyerek, sitozele salınan oksaloasetatın sitozolde PEP'e dönüşümünü sağlamaktadır (Croniger ve ark., 2002).

Metabolizmada görev alan diğer enzimlerden biri olan Piruvat Kinaz (Pyruvate kinase : PK), glikoneojenik/glikolitik dengenin düzenlenmesinde önem arz etmektedir (Thompson, 2000). PK, glikolizin son aşamasında sitoplazmada PEP'i pirüvata Adenozintrifosfat (ATP)'a bağımlı bir şekilde kataliz eden enzimdir (Abboud ve ark., 2021). Glikolizin kilit enzimi olduğu için, diyapozda olan böceklerde genel enerji metabolizmasını azaltmak ve hayatta kalmayı sağlamak için kritik bir rol üstlenmektedir (da Silva ve ark., 2019). Diyapozda artan glukoneogenez ve glikoliz ile enerji üretimi sağlanırken, PK tarafından da metabolik hızın düşüşü kontrol edilmektedir (Abboud ve ark., 2021).

Metabolik süreçlerde önemli olan ve mitokondriyal kısımda etkin rol üstlenen çoklu enzim kompleksinden meydana gelmiş enzimlerden biri ise Piruvat Dehidrogenaz (Pyruvate dehydrogenase: PDH)'dır. Tek birimden oluşan enzimlere kıyasla yapısal, işlevsel ve düzenleyici alt birimleri sayesinde daha ekonomik çalışabilmektedir (Hucho, 1975). Alt birimleri E1, E2 ve E3 olarak adlandırılmaktadır (Szurmak ve ark., 2003). PDH (E1), hidrolipoamid asetiltransferaz (E2), dihidrolipoamid dehidrogenaz (E3) olarak isimlendirilmiştir (Hein ve ark., 1996). Aerobik koşullarda glikoliz metabolizmasında yer alsa da bazı anaerobik bakterilerde bile aktivasyon sağladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Modak ve ark., 2002). Temel görevi krebs döngüsünde pirüvatı asetil-CoA molekülüne dönüştürmektir (Ng ve Tang, 2014). Diyapozdaki böceklerin birçoğunda mitokondriyal aktivite oldukça kısıtlanmıştır (McMullen ve ark., 2008). Soğuk ve açlık stresi altında meydana gelen diyapoz durumunda mitokondriyal bozulmalar ve yağ biriktirme meydana gelmektedir (Kukal ve ark., 1989). Mitokondriyal enzim aktivitesinin oldukça azaldığı ve buna bağlı olarak oksijenli solunumdan elde edilen ATP miktarında önemli ölçüde düştüğü gözlenmiştir (Yi-ping ve ark., 2000).

Yapılan bu tez çalışmasında soğuk ve açlık ile indüklenen *Trogoderma granarium* son dönem larvaları, fakültatif diyapoz durumuna getirilmiştir. Gelişimsel dönemini sürdüren *T. granarium* kontrol son dönem larvası ile karşılaştırmalı gen ifadesini araştırabilmek için deney düzeneği kurulmuştur. Diyapozda olan ve kontrol *T. granarium* larva örneklerinden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Geçmişte oluşturulmuş transkriptom verilerinden (Dageri ve ark., 2022), çalışılacak olan *T. granarium*'a ait fosfoenolpiruvat karboksikinas (*TgPEPCK*), piruvat kinaz (*TgPK*) ve piruvat dehidrogenaz (*TgPDH*) tanımlanmış; benzerlik, korunmuş domain taramaları ve filogenetik analizleri yapılmıştır. Genlerin diyapoz durumundaki ifade profilleri Kantitatif Eş Zamanlı PCR (Reverse transcription-quantitative PCR : RT-qPCR) kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar aracılığı ile zararlının diyapoz fizyolojisinde ifade edilen genlerinin hayatta kalmasına nasıl bir potansiyel katkı sağladığına yönelik değerlendirilme gerçekleştirilmiştir. Bu bilgiler ışığında, literatüre kapra böceği diyapozuna yönelik yeni bilgiler sağlanmış ve bu zararlının kontrolünün sağlanmasında yeni yaklaşımların geliştirilmesine aracı olabilecek yeni bir bakış açısı sunulmuştur.

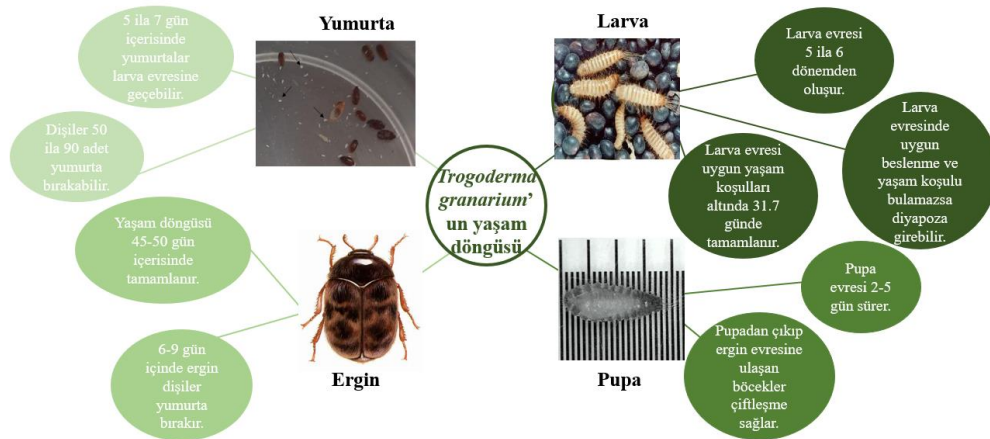
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Trogoderma granarium*

İlk olarak Everts tarafından 1898 yılında tanımlanarak isimlendirilmiş *Trogoderma granarium*; Hayvanlar (Animalia) alemi, Eklem bacaklılar (Arthropoda) şubesi, Kınkanatlılar (Coleoptera) takımı, Dermestidae ailesi ve *Trogoderma* cinsine ait bir türdür (Munro, 1935; EPPO, 2002; Athanassiou, 2023). Dermestidae (deri, kiler ve halı böcekleri) ailesinin birçok üyesi hayvan leşçileridir; ancak bitkisel maddelerle beslenen türleri de mevcuttur. Buna örnek olarak; *T. granarium* tüm gelişimsel döngüsünü tahıl ürünlerinde tamamlamaktadır (Kiselyova ve McHugh, 2006; Zhou ve ark., 2022). Ayrıca, pirinç ve arpa gibi ekonomik önemi olan ve depolanabilen tahıl ve gıda maddeleri üzerinde de ciddi zararlar meydana getirebilmektedir (Olson ve ark., 2014).

2.2. *Trogoderma granarium*'un biyolojik gelişimi

Trogoderma granarium yumurta, larva, pupa ve ergin şeklinde farklı gelişimsel dönemlerden geçmektedir. *Trogoderma granarium*'un biyolojik gelişimi sıcaklık, nem, ışık mevsimsel dönemlere göre değişiklik göstermektedir. Gelişim süresi üzerinde, beslenme koşulları ve ışık yoğunluğu oldukça etkilidir. Yaşam döngüsü bu koşullara bağlı olarak 26, 166, 220 veya 310 gün dolaylarında sürebilmektedir (Çelik, 2011) (Şekil 2.1).



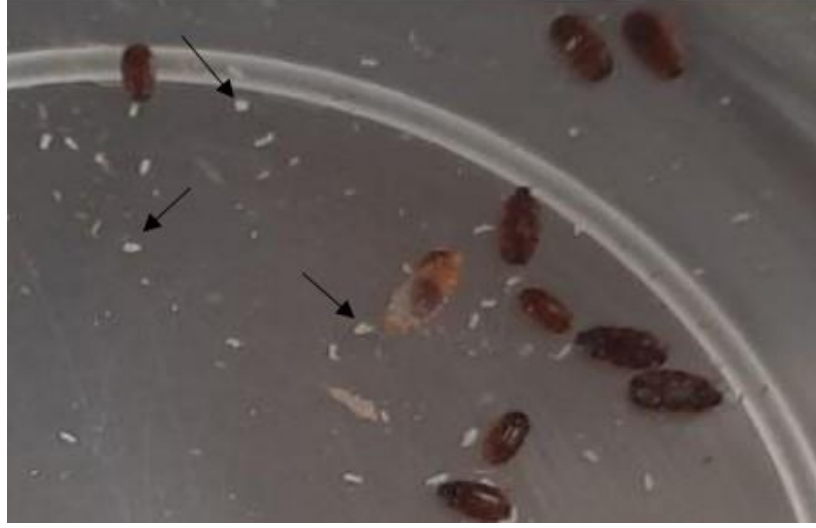
Şekil 2.1. *Trogoderma granarium*'un yaşam döngüsü

Erginler olumsuz koşullarda 147 güne kadar yaşayabilmektedir. Larvalar için bu süre 19'dan 190 güne kadar uzayabilmektedir. Diyapozdaki larvaların yaşam süresi 8 yıla kadar çıkabilmektedir (Burges 1962; Karnavar, 1972; EPPO, 2021).

Trogoderma granarium 'un gelişimi ve üremesi için en uygun sıcaklık, 25-35 °C arasındadır. 35-45 °C ise bu türün gelişimi ve üremesi için en yüksek sıcaklıklardır. 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise böcekte ölüm görülmektedir (Wilches ve ark., 2019). *T. granarium*'un popülasyon artışı üzerinde en güçlü fiziksel etkenlerden birisi sıcaklık, diğeri de bağıl nemdir. Sıcak ve nemli koşullarda larva gelişimi yüksek düzeyde sağlanmaktadır. 35 °C'de ve %73 bağıl nemde larva gelişimi 18 gün gibi kısa bir sürede sağlanabilmektedir. 25 °C'de %2 bağıl nemde çok düşük bir gelişim sağlanırken, 12 °C larvanın gelişim eşiğidir (Howe, 1965; Özberk ve ark., 2017). Laboratuvar koşullarında yapılan çalışmalarda dişi ve ergin yaşam süresi için 25 °C, yumurtlama için 22,5 °C, yumurta kuluçka süresi için 20 °C, larva ve pupa gelişimi için ise 17,2 °C alt sıcaklık sınırı olarak belirlenmiştir (Burges, 2008).

2.2.1. Yumurta

Kapra böceği yumurtaları, parlak beyaz renktedir ve zamanla soluk sarımsı bir renge dönüşmektedir. Yumurtanın bir ucu yuvarlak, diğer ucu ise sivridir. Yaklaşık 0.7 mm boy ve 0.25 mm genişliğe sahiptir ve içerisinde omurga benzeri yapı taşımaktadır (Lindgren, 1955; Harris, 2006). Kuluçkadan çıkış zamanı geldikçe larva gelişimi için karakteristik kahverengi tergitleri ve tüy oluşumu yumurta zarının sırt bölgesinde gözle görülecek seviyeye ulaşır. Ön kısmında koyu noktalar oluşur. Yumurtasının yuvarlak uç bölgesi, larvanın posteriorunda bulunan tüylerle ve larva ile yumurtanın kılıfının arka ucu arasındaki kıvrılan uzun kuyruk nedeniyle koyu kahverengi bir renk oluşturur (Şekil 2.2). Larva gelişimini tamamladığında, yumurta zarını parçalayarak geçmesi ile arka kısmında yumurta kılıfını bırakır (Hadaway, 1956).



Şekil 2.2. *Trogoderma granarium* yumurtaları (Sivrikaya, 2023)

2.2.2. Larva

Larvalar tüylü bir yapıya sahiptir. Larva aşaması 5 veya 6 dönemden oluşabilmektedir. Birinci dönem larvaları sarıya yakın beyaz renkte, 1.6-1.8 mm uzunluğunda ve 0.25-0.35 mm boyutlarında vücut genişliğine sahiptir. Dördüncü döneme geldiklerinde ise altın rengine yakın bir kahverengi renk alırlar ve yaklaşık 3 mm boya ulaşırlar. Son döneme erişen bir larva 6 mm boya ve 1.5 mm genişliğe kadar gelişebilir (Şekil 2.3). Diyapoz durumu söz konusu olduğunda ise larvalarda boyut farklılıkları olabilmektedir (EPPO, 2013). *Trogoderma granarium* larvaları birçok depolanmış kuru gıda ile beslenir. Daha çok buğday, arpa, pirinç gibi tam tahıl ürünlerini tercih ederler (Lindgren ve Vincent 1959). *T. granarium* 'un sindiriminde görev alan proteolitik ve amiloitik enzimler; arpa, pirinç, çavdar, buğday ve ceviz gibi bitkilerde incelenmiştir. Enzimler, arpa ve buğday gibi besinlerde yüksek oranda aktivite göstermesine rağmen, cevizde en az aktivasyon göstermiştir (Majd-Marani ve ark., 2018).



Şekil 2.3. *Trogoderma granarium* larvaları

2.2.3. Pupa

Pupa döneminin dişileri, erkeklerinden daha büyüktür. Pupanın sırt yüzeyi tüylerle kaplıdır. Tüyler orta hat boyunca belirgin bir çıkıntı oluşturur. Pupa, larvaya göre daha açık kahverengindedir (Şekil 2.4). Pupanın alt kısmından vücut parçaları ayırt edilebilmektedir (Lindgren ve ark., 1955). Erkekler ve dişi pupaların ortalama uzunlukları sırasıyla, 3.5 ve 5 mm'dir (EPPO, 2013).



Şekil 2.4. *Trogoderma granarium* pupası (<https://www.istockphoto.com/tr>).

2.2.4. Ergin

Ergin kapra böceği dikdörtgen-oval bir şekle sahip olup, yaklaşık 1,6-3,0 mm uzunluğunda ve 0,9-1,7 mm genişliğindedir. Erkekler kanat örtülerinde belirgin olmayan kırmızımsı kahverengi işaretlerle, kahverengiden siyaha kadar koyulaşan bir renk tonuna sahiptir. Dış yüzeyi gri-siyah renkte ve oldukça ince tüylerle kaplıdır (Arrow, 1917). Erkekler dişilerden daha küçük ve koyu renge sahiptir (Şekil 2.5). Dişilerin kafası daha küçüktür ve 11 parçalı kısa bir antenle bükülmüştür. Antenler, pronotumun yan tarafındaki bir oyuga uyan üç ila beş segmentten oluşan bir çubuğa sahiptir (Ahmedani ve ark., 2007; Athanassiou, 2023). Çiftleşmiş ve çiftleşmemiş dişiler sırasıyla 4-7 ve 20-30 gün, erkekler ise 7-12 gün yaşayabilmektedir. Erginler uçmaz ve çok az beslenirler (Gourgouta ve ark., 2021).



Şekil 2.5. *Trogoderma granarium*'un erkek (sol) ve dişi (sağ) ergini (<https://entomologytoday.org>)

2.3. *Trogoderma granarium*'un zararının ekonomik etkisi ve önemi

Dünya nüfusu gün geçtikçe ciddi oranda yükselmektedir ve bu artan nüfusa yetecek oranda gıda sağlanması gerekmektedir. Tahıl gibi dünya genelinde insanların ana besin maddelerini oluşturan gıdaların korunmaları ve sürdürülebilirliğini sağlamak için özel emek verilmektedir. Küresel olarak Coleoptera böcekleri depo ürünlerine en çok zarar veren türlerin başında gelmektedir (Almadiy ve Nenaah, 2022). Coleoptera böceklerinin arasında ise en tehlikeli depo zararlısı olan *T. granarium* Hindistan'dan köken alan sıcak ve kuru bölgelerde yaygın olarak görülen bir zararlıdır (Burges, 1959). Böcekler depolanmış ürünlere verdikleri zararlara göre çeşitli sınıflara ayrılmaktadır. Bunlar ürünün kendisini yiyen gerçek zararlılar, çöpçüler, ürünü etkileyen küfle beslenenler, avcılar ve böcek parazitleridir (Howe, 1950). *T. granarium* ürünün kendisine zarar veren böcek sınıfı içerisinde yer almaktadır; bütün ve öğütülmüş tahıllar, yağlı tohumlar ve kuru meyveler en çok zarar verdiği ürünlerin başında gelmektedir (Ahmedani ve ark., 2009). Kapra böceği depolanmış ürünlerin kuru ağırlığında ciddi kayıplara neden olmaktadır (Hayward, 1955). Tahılların mineral içeriği bakımından niteliğini düşürür. Tahılın barındırdığı karbonhidrat, protein ve nişastanın eliminasyonuna neden olur ve tahılın sağlacayağı biyolojik faydaya zarar verir (Athanassiou ve ark., 2019). Aynı zamanda böceğin kalıntı bırakması ile hijyenik olmayan bir tahıl ortamı meydana getirir (Jood ve Kapoor, 1993). *T. granarium*'un sekiz yıla kadar diyapoz fazında kalabilmesi ekonomik yükü artırmaktadır. Bu nedenle diyapoz mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir (Burges 1962; Dageri ve ark., 2023).

Ergin olmaya yaklaşan son dönem larvalar diyapoza girdiğinde, depolanan ürünü terk ederek depo alanının çeşitli bölgelerine saklanır ve aylarca beslenmeden kalır. Bu dönem insektisitlere karşı en dirençli dönemidir. Bunun sonucu olarak ithal edecek ülke, böceğin tespit edilmesi durumunda malın sevkiyatını durdurabilmektedir (Dick, 1987). Sıcaklık artışı gibi insektisit olmayan yöntemlerle mücadele edilmesi durumlarında, ısıya karşı oldukça duyarlı olan *Trogoderma granarium* direnç geliştirebilmektedir. Bu durum böcek ile mücadelede ekonomik yükler yükleyebilmektedir (Papanikolaou ve ark., 2019).

2.4. *Trogoderma granarium*'un tespiti

Trogoderma granarium ilk olarak 1948'de Nijerya'da depo ürünlerinin büyük hasarına sebep olması üzerine kendini göstermiştir. Ardından İngiliz Gıda Bakanlığı'nın ithal edilen gıda ürünlerinde barınan tüm dermestidlerin tanımlanmasını istemesi üzerine, zararlılar arasında önemli bir konuma gelmiştir. Böceğin ABD'nin güneybatısında tespiti ile birlikte federal bir karantina uygulandığında, *T. granarium* depo zararlıları arasında en problemli böcek halini almıştır. Bu durumun ardından birçok ülke böceklerin yayılmasını önlemek için karantina önlemleri almaktadır (Barak, 1989; Viljoen, 1990). Böcek kolaylıkla uluslararası nakliye yolları ve nakliye araçlarına gizlenerek, oldukça geniş bir yelpazede yayılım gösterebilmektedir (Paini ve Yemshanov, 2012). Bu durum *T. granarium*'un tespitinin önemini artırmıştır.

Böceklerin erken tespiti, depo ürününün istilasını olabilecek en kısa sürede durdurmayı kolaylaştırır ve maliyetli bir mücadeleye girişmeye engel olur. Ancak böceklerin zararsız birçok böcek türü ile morfolojik açıdan oldukça benzer özellikler taşıması tespitini zorlaştırmaktadır (Wu ve ark., 2023). Böcek türlerinin tespit edilmesi, spesifik morfolojik özelliklerin analiz edilmesinin yanı sıra korunmuş DNA dizilerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanarak saptanması ile gerçekleştirilmektedir. Böcek tespiti için en çok yararlanılan gen ise mitokondriyal DNA'nın sitokrom c oksidaz alt birimidir (Furui ve ark., 2019).

2.5. *Trogoderma granarium*'la mücadele yöntemleri

Trogoderma granarium'un yaşadığı ve yayılım gösterdiği alanlarda kontrolünü sağlamak amacıyla kimyasal, kimyasal olmayan ve entegre böcek yönetimleri kullanılmaktadır (Musa, 2009). Bunların arasında en sık kullanılanı kimyasal yöntemlerdir. Aşağıda kimyasal ve kimyasal olmayan yöntemler üzerinde detaylı şekilde durulmuştur.

2.5.1. Kimyasal yöntemler

Kimyasal yöntemler, insektisitlerin doğrudan depo ürünlerine veya depo alanlarına uygulandığı çeşitli kimyasal maddelerdir (Ghimire ve ark., 2016). Metil bromür, depo ürünlerinde kullanılan kimyasal maddelerin başında gelmektedir ve bu kimyasal hızlı bir şekilde etki etmektedir. Yalnızca böcekler değil, aynı zamanda nematodlar ve bitki patojenik mikroplarının da kontrolünde bu kimyasal kullanılmaktadır (Fields ve White 2002). Metil bromür oldukça etkili bir insektisit olmasına rağmen, ozon tabakasını incelten bir maddedir. Son yıllarda çevresel zararları sebebiyle *Trogoderma granarium*'un kontrol altına alınmasında kullanılmamaktadır. Ancak, bazı böcek türlerinin kontrolünde hala kullanılmaktadır (Athanassiou ve ark., 2015). Metil bromürle yapılan fumigasyonda *T. granarium* için gerekli doz yüksektir ve bu durum, fumigasyon yapılan depo ürünlerinde ciddi kalıntılara sebep olarak gıda kirliliğine yol açmaktadır (Bell ve ark., 1984). Bu durum neticesinde, metil bromürün aşamalı olarak kaldırılması gündeme gelmiş ve yerine alternatif fumigantlar bulunmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır (Athanassiou ve ark., 2012).

Daha sonra organofosfatlar, piretroidler ve diatomlu topraklar *Trogoderma granarium*'un kontrol altına alınması için kullanılmaya başlanmıştır. Kapra erginleri bu kimyasallara karşı oldukça hassasken, larvaları orta derecede etkilenmektedir (Gourgouta ve ark., 2021). Özellikle diyapozda olan larvalar, gelişmekte olan larvalara göre kimyasallara daha fazla tolerans gösterebilmektedir (Banks ve ark., 1985). Kontrolsüz uygulamalar nedeniyle en sık kullanılan organofasfat olan fosfine ve tip 2 piretroid olan deltamethrine karşı böceklerde yüksek seviyede tolerans gelişmektedir (Feroz ve ark., 2020).

Trogoderma granarium'un kontrol altına alınmasında kullanılan organofosfat türevi olan fosfin, sıcak iklimlerde kullanımı elverişli olan bir kimyasaldır. Depo

ürünlerinin tamamının böcekten arındırılmasında sık kullanılır. Ancak düşük sıcaklıkları gören bölgelerde etkinliği azalmaktadır, bu da gazın maruz kalma süresinin uzamasına sebep olmaktadır (Bell ve ark., 1988). Aynı zamanda, fosfin ile yapılan fumigasyonlarda, özellikle 25 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, *T. granarium* larvalarının yumurtadan çıktıktan sonra, fosfine oldukça kolay tolerans geliştirdiği gözlenmiştir. (Bell ve Wilson, 1995).

Piretroidler doğrudan merkezi sinir sistemi veya periferik sinirler üzerinde etkili olan insektisitlerdendir ve coleopterlere karşı sık kullanılan kimyasallardandır (Collins ve Sinclair, 1988). Böcek büyüme düzenleyiciler, piretroidlere göre larvalar üzerinde daha az öldürücü etkiye sahiptir, ancak piretroidlerle birlikte kullanıldıklarında kontrol altına alma gücünü artırmaktadır (Arthur ve ark., 2018). Kombinasyona ek olarak insektisit uygulanan alanın maruz kalma süresi ve insektisit konsantrasyonu da kontrol altına alma etkinliğini yükseltmektedir (Arthur ve ark., 2020). Deltamethrin ve Cyfluthrin gibi piretroidler ile böcek büyüme düzenleyicilerden olan metopren ve piripoksifenin beton yüzeylere uygulandığı bir çalışmada, *T. granarium* erginlerinin öldüğü, ancak larvalarının hayatta kaldığı görülmüştür. Özellikle beşinci veya altıncı dönem larvalarının, birinci, ikinci ve üçüncü dönem larvalarına göre daha toleranslı olduğu görülmüştür (Arthur ve ark., 2019). Aynı zamanda, insektisitlerin etkinliği depoların zemin durumuna göre değişmektedir. Birçok deponun zemini betondur ve organofosfatların çoğunun beton zeminde etkinliği azdır. Buna karşılık, piretroidlerin beton yüzeylerde organofosfatlara göre daha yüksek etkinliği vardır (Arthur, 1997). Organofosfatlar ve karbamatların gözenekli ve alkalın beton yüzeylerde uygulandıklarında piretroidlere göre daha sınırlı etkinliğe sahip oldukları gözlenmiştir (Guedes ve ark., 2008). Uzun ömürlü insektisit uygulanmış ağ gibi kontrol yöntemleri, yüzeylerin insektisit etkinliğini kısıtlamasını ortadan kaldıran alternatif yöntemlerdendir. Bu yöntem, *T. granarium* da dahil olmak üzere birçok depo zararlısında kullanılmaktadır. Larvaların, uzun ömürlü insektisit uygulanmış ağa 30 dk'dan daha kısa süre maruz bırakılması yeterli olmaktadır (Domingue ve ark., 2021).

2.5.2. Kimyasal olmayan yöntemler

Trogoderma granarium'u kontrol altına almak için kimyasal olmayan yöntemler de kullanılmaktadır. Bu amaç için oldukça farklı yollara başvurulmaktadır. Bunlardan biri

gama ışınlarıdır. Mansour (2016) yaptığı çalışmada gama ışınlarını kullanarak depo ürünlerine kimyasallar gibi zarar vermeden böceğin kontrol altına alınması sağlanmıştır ve oldukça başarı sağlamıştır. Aynı zamanda gama ışınları, böcek üzerinde bazı biyolojik değişikliklere yol açmıştır, bu da tüy dökümü, gelişim süresinin uzaması ve üreme kapasitesinin azalması gibi etkileri içermektedir (Abdel-Kawy, 1999). Kimyasal yöntemler dışında uygulanan yöntemlerden biri olan modifiye atmosfer yöntemi, böceğin bulunduğu depo ürünlerinin toksik kalıntı bırakmadan temizlenmesini sağlamaktadır ve çevreye zararı olmayan bir yöntemdir. Yöntemde, ortamın karbondioksit, oksijen ve azot oranları, normal hava koşullarından farklı olarak karbondioksit artışı ve oksijen azalımıyla sağlanmaktadır ve yapılan çalışmalarda etkin bir zararlı kontrolü sağlandığı gözlenmiştir (Vassilakos ve ark., 2019).

Zararlının kontrolü için kullanılan birçok yöntem, böceklerin tamamen ölümüne neden olmayabilir; ancak fizyolojik ve davranışsal etkilere yol açarak böceklerde stres oluşturur, yaşam sürelerini kısaltır, üreme kapasitelerini azaltır veya durdurur. Bu durum, sonraki nesillerde genetik değişikliklere yol açarak kontrolü zorlaştıracak bir dizi potansiyel tepkiye neden olabilir (Guedes ve ark., 2017; Vélez ve ark., 2018).

2.6. Diyapoz

Diyapoz, bir dizi morfolojik, fizyolojik, davranışsal ve biyokimyasal özelliklerle kendini gösteren böcek ve akarlarda yaygın şekilde görülen bir süreçtir. Diyapozun uygun zamanda gerçekleşmesi, organizmanın biyolojik ve fiziksel çevrede olumlu ve olumsuz koşullara başarı bir şekilde adapte olmasını sağlar (Tauber ve ark., 1976). Eğer bir böcek yaşam koşulları elverişsiz hale geldiğinde diyapoz dönemine girmezse, popülasyon sayısı düşük bir seviyeye iner ve daha sonra koşullar elverişli hale geldiğinde türünü koruyacak düzeyde bir popülasyona ulaşamayabilir. Bu durum diyapozun böcek türünü korumak için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (Andrewartha, 1952). Diyapozun oluşmasında birden fazla etken söz konusudur. Programlanmış bir genetik mekanizma olduğu gibi aynı zamanda çevresel koşullar da diyapoz için önemli etkenlerdendir (Hodek ve Hodková, 1988). Bir böceğin diyapoza girmesi yaşam döngüsünün herhangi bir aşamasında meydana gelebilir; ancak diyapozun meydana geldiği yaşam evresi her tür için oldukça karakteristiktir (Andrewartha, 1952; Tauber, 1970b). Aynı zamanda, Andrewartha (1952) diyapozun dinamik bir süreç olduğunu, diyapoz esnasında meydana

gelen değişikliklerin morfogenezden farklı olduğunu anlatmak için “fizyogenez” terimini kullanmıştır. Fizyogenez, birçok laboratuvar ve saha çalışmalarında fotoperiyot, nem, sıcaklık, hormonal denge gibi faktörlerin değişiklikleri gözlenerek kanıtlanmıştır (Lefever, 1989; Okuda, 1990; Nakamura, 1997; Numata, 2004). Böceklerde diyapoz, gelişim dönemlerine göre yumurta, larva, pupa ve ergin diyapozu şeklinde kategorize edilmektedir. Diyapoz mevsimsel farklılıklara göre “yaz diyapozu” ve “kış diyapozu” gibi de kategorize edilebilmektedir. Böceklerin diyapoza girmesi birden fazla aşamadan oluşan dinamik bir süreçtir (Şekil 2.6). Bu aşamalar pre-diyapoz (diyapozun indüklenmesi / diyapoza hazırlık), diyapoz (diyapozun başlaması, diyapozun sürdürülmesi ve diyapozun sonlanması) ve post-diyapoz (diyapoz sonrası gelişim) safhalarıdır (Koştál, 2006).

2.6.1. Diyapozun aşamaları

Pre-diyapoz; diyapoz öncesi bu dönemde morfogenetik gelişim devam eder, ancak diyapoza sebep olan dış etkenlerin oluşturduğu yanıtlar canlıyı diyapoza girmeye hazırlar (Lees, 1955). Bu dönem iki aşamada ele alınmaktadır; bunlar, indüklenme ve hazırlık aşamalarıdır. İndüklenme, literatürde çevresel etkenlerin fizyolojik gelişimin hızı üzerindeki etkilerinin ayırt edilebilmesi için kullanılmaktadır (Koştál, 2006). Hazırlık aşaması ise canlının diyapoza girmeden önce yaşayacağı zor koşullar altında nöroendokrin ve metabolik yollarında gen transkripsiyonlarını değiştirerek, farklı fizyolojik süreçlere girmesi ile karakterize edilir. Bu dönem canlının diyapozdayken sonuna kadar hayatta kalabilmesi için kritik önem taşımaktadır. Hazırlık döneminde oluşan gen seviyesindeki aktif değişiklikler ek yağ rezervlerinin tutulması, protein rezervlerinin artırılması gibi birçok fizyolojik yolda aktivasyona sebep olmaktadır (Tauber, 1973; Tauber, 1976; Tauber, 1982; Denlinger, 2001).

Diyapoz; bu dönemde morfogenez endojen süreçler tarafından durdurulur. Değişen çevre koşullarına göre fizyolojik sistemler farklılaşır. Diyapoz dönemi başlama, sürdürme ve sonlandırma aşamalarına ayrılarak incelenmektedir (Hodek, 2003). Böceklerin diyapozu nasıl başlattığı kesin olarak bilinmemekle birlikte, entomologlar diyapozun başlangıcını genel olarak transkripsiyon seviyesindeki düzenleyici faktörler ve dokuların zorlu koşullara hazırlanmasıyla açıklamaktadır (Bell, 1994; Denlinger, 2001; Hodek, 2002). Sürdürme aşamasında, bireyler gelişimsel olarak duraklama gösterir.

oldukça azalmalar gözlenmiştir (Denlinger ve Bradfield Iv, 1981; Bowen ve ark., 1984; Denlinger ve ark, 1986). Bazı genlerin ise hiç etkilenmediği normal seviyede ifade edildiği görülmektedir. Ayrıca, bazı genler erken diyapoz döneminde bazı genler ise geç diyapoz döneminde aşağı veya yukarıya doğru regüle olabilmektedir. Aşağı yönde regüle olan genlerin başında metabolizma ile ilişkili genler gelmektedir (Denlinger ve ark., 1992). Bu durum diyapozdaki bireyin, düşük metabolik aktivite göstermesi ile ilişkilendirilmektedir (Feng ve ark., 1998). Bunun yanı sıra ifade seviyelerinde farklılıklar gözlenen genler arasında Isı Şok Proteini (Heat Shock Proteinleri = HSP'ler) üyeleri yer almaktadır. Bu gen ailesi üyelerinden olan *HSP90* diyapoza giren bireyde aşağı doğru regülasyon gösterebilmektedir. Yine *HSP* üyesi olan *HSP23* ve *HSP70* ise diyapozda ifade edilme seviyesinde artış gözlenen genler arasındadır. *Sarcophaga crassipalpis*'de diyapoz üzerine yapılan çalışmalarda, *HSP23* ve *HSP70* genlerinin yukarı yönde regülasyonu izlenirken; *HSP90* geninin aşağı yönde regülasyonu gözlenmiştir (Rinehart ve ark., 2000; Yocum, 1998). *HSP23*, *HSP70* ve *HSP90* gibi stres genlerinin diyapozda ifade seviyelerinin neden değiştiği ve ne gibi görevler yüklendiği, henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa bile kriyoprotektif bir rol sağladığı, moleküler şaperon olarak görev yaptıklarından dolayı düşük sıcaklıklarda anahtar metabolik enzimlerin veya yapısal proteinlerin bütünlüğünün korunmasını sağladıkları düşünülmektedir (Yocum ve ark., 1991; Denlinger ve ark., 2002). Isı şok proteinlerinin *T. granarium*'un soğukla indüklenmiş diyapoz sürecindeki ifade profillerine yönelik yapılan bir çalışmada *HSP60*, *HSP68* ve *HSP83* genlerinin ifade seviyeleri izlenmiştir. Diyapozda bu genlerin yukarı yönde ifade edildiği görülmüştür (Çoban, 2022). Yine kapra böceğinde bulunan Antifreeze protein maxi-like (*TgAFP*) ve Cold-shock domain-containing protein (*TgCSDP*) ile yapılan bir çalışmada, iki genin böceğin soğukla indüklenmiş fakültatif diyapoz sürecinde soğukta sağkalım için önemli roller üstlenebileceği belirtilmiştir (Dageri ve ark., 2023). Kapra böceğinin soğuk ve açlıkla indüklenmiş diyapoz süreçlerinde, küçük ısı şok proteini (sHSP) genlerinin dikkat çekici seviyede ifade edilmesinin, böceğin hayatta kalması mekanizmasına katkı sağlayabileceği vurgulanmıştır (Dageri, 2024). Bunların dışında diyapozda etkili olan birçok gen ve gen grubu bulunmaktadır.

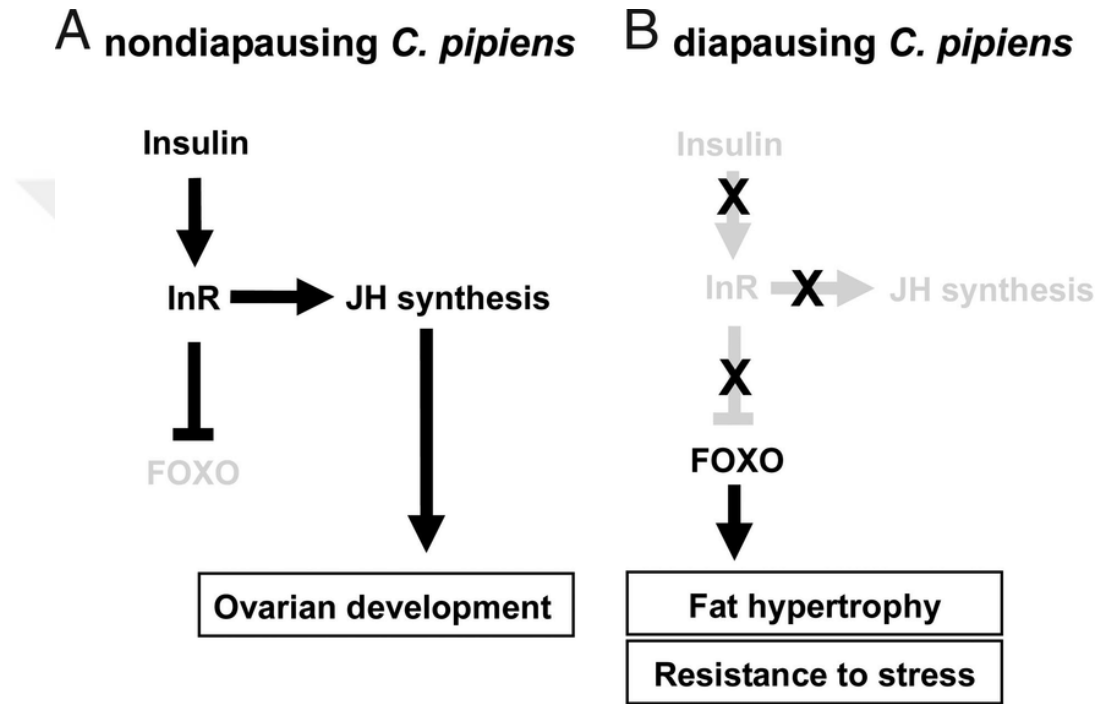
2.6.3. Diyapozun hormonal mekanizması

Diyapoz sürecinde endokrin sistem aktif rol üstlenmektedir. Özellikle bazı hormonlar diyapozda düzenleyici görevler almaktadır. Bu hormonlar türe ve diyapozun meydana gelme aşamasına göre farklılık gösterebilmektedir. Bu hormonların başında nöropeptit kökenli diyapoz hormonu (DH) gelmektedir. DH'nin histolojik kanıtlar ışığında sub-özofogeal gangliyonda tek bir çift sinir hücresi tarafından salgılandığı tespit edilmiştir. En önemli işlevi yumurta diyapozuna giren canlılarda yumurtanın gelişimsel kaderini belirlemesidir (Fukuda ve Takeuchi, 1967). İzlenimlere göre bu görevini poliol sorbitol düzeylerini yükselterek yapmaktadır (Horie ve ark., 2000). Son zamanlarda yapılan çalışmalar ışığında metabolik etkilerinin de olduğu ortaya çıkarılmıştır. Metabolik etkileri diyapoza girme kararını vermiyor olsa da, diyapozdaki canlının hayatta kalması için metabolik ayarlamalar yaparak diyapozun devamlılığını sağlamaktadır (Yamashita ve Hasegawa, 1970). Bir diğer nöropeptit olan protorasikotropik hormon (PTTH), ilk keşfedilen böcek hormonudur ve birçok böcek türünde pupa diyapozuna girme kararında kilit rol oynar (Meola ve ark., 1977). Genellikle pupa diyapoza, PTTH salınımının kesilmesiyle ve protorasik bezlerin sürekli gelişimini desteklemek için gereken ekdisteroidlerin sentezlenmesini baskılamasıyla başlar (Xu ve Denlinger, 2003).

Birçok araştırmacı diyapozun hormonal kontrolünde juvenil hormonlar, ekdisteroidler ve juvenil hormon ve ekdisteroid sentezini yöneten nöropeptitlerin oynadığı rol üzerine odaklanmıştır. Juvenil hormon ekstratlarının ve analoglarının enjeksiyonu protorasik bezin aktivasyonuna yol açarak diyapoza sonlandırabilmektedir (Žďárek ve Denlinger, 1975; Hiruma ve ark., 1978). Ekzojen 20- hidroksi-ekdison protorasik bez üzerinde benzer bir tropik etki göstererek hızlı bir şekilde diyapozun sonlandırılmasını sağlar. Bu kanıtlar ışığında, bu tür hormonların diyapozun sonlandırılması için, gerekli hormonal düzenlemeye katıldığı açığa çıkarılmıştır (Kimura ve Kobayashi, 1975; Bradfield ve Denlinger, 1980).

Sim ve Denlinger (2008) diyapozda hormonal dengenin sağlanmasında insülin sinyal düzenlenmesi üzerine çalışma yürütmüşlerdir. Bir sivrisinek türü olan *Culex pipiens* insülin sinyalinin ve insülin sinyal yolundaki bir aşağı akış molekülü olan Forkhead box-O transkripsiyon faktörü (forkhead transcription factor = FOXO) molekülünün, diyapoz tepkisine aracılık ettiği izlenmiştir. Diyapoza girmeyen sivrisineklerde insülin reseptörünün RNA interferans ile baskılanması ile sivrisineklerin foliküler diyapoza girdiği gözlenmiştir. Sivrisinekler bu türlerde diyapoza sonlandırdığı

bilinen endokrin tetikleyici bir hormon olan jüvenil hormon uygulamasıyla diyapozdan çıkarılmışlardır. FOXO'ya yönelik çift iplikli ribonükleik asit (double strand ribonucleic acid = dsRNA) diyapoz için programlanmış sivrisineklere enjekte edildiğinde, sineğin yağ depolaması önemli ölçüde azalmıştır ve ömrü kısalmıştır. Sonuç olarak, insülin sinyalinin kesilmesinin, aşağı akış geni FOXO'nun aktivasyonunu harekete geçirerek, diyapoza neden olduğu görülmektedir (Şekil 2.7). Bu durum jüvenil hormonun üretiminin durmasına da yol açmaktadır (Sim ve Denlinger, 2008; 2013).



Şekil 2.7. Diyapozun hormonal mekanizması (Sim ve Denlinger, 2008).

2.6.4. Diyapoza etkileyen faktörler

Diyapoza etkileyen faktörlerin başında fotoperiyot ve sıcaklık gelmektedir. Bunun yanı sıra besin, nem ve popülasyon yoğunluğu diyapoza etkileyen faktörler olarak ifade edilmektedir. Burada fotoperiyot, sıcaklık ve besin üzerinde durulacaktır:

Fotoperiyot; diyapoza giren böceklerin üzerinde en etkili faktörlerden biri fotoperiyottur. Beck ve ark. (1962) *Ostrinia nubilalis* üzerinde yapılan çalışmada uzun gün böceği olan bu canlıda fotoperiyodun diyapoza indükleyip indüklenmediğini izlemişlerdir. Sonuç olarak diyapozun 10 ila 14 saatlik stokofazlar (ışık ve karanlık döngüsündeki karanlık faz) içeren, doğal olarak meydana gelen fotoperiyotlar tarafından

indüklediği tespit edilmiştir. Yine Tauber ve ark. (1970a) *Chrysopa carnea* böceğinde yaptığı bir çalışmada kritik fotoperiyodun 12:12 ile 14:10 arasında olduğu ve diyapoz süresinin fotoperiyodik tipte ilişkili olduğunu göstermiştir. Bundan iki yıl sonra yaptıkları çalışmada ise kesin bir şekilde, fotoperiyodun diyapozun derinliğine olan etkisi gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalara bakılırsa, farklı böceklerin farklı ışık ortamlarında diyapoz tepkileri ölçüldüğünde, böceklerde fotoperiyodik zaman ölçümünün ya salınımsız kum saati benzeri bir mekanizma ile ya da sirkadiyen sistemin salınımlı bileşenleri tarafından gerçekleştirildiği izlenmiştir. Her ikisi de doğru veriler olsa da, güvenilirliği yüksek sonuçlar değerlendirildiğinde, gece uzunluğu ölçümünün sirkadiyen sistemin işlevi olduğu ve sirkadiyen zamanlama ile ilgili genlerin ve proteinlerin de fotoperiyodizmle ilişkili olduğu sonucu çıkarılmaktadır (Saunders ve ark., 2004). Sirkadiyen saat, gece ve gündüzün günlük döngüsüyle bağlantılıdır. Aydınlık ve karanlık döngülerine katılma kapasitesinin, incelenen tüm organizmalarda saatin evrensel bir özelliği olduğu kanıtlanmıştır (Devlin ve Kay, 2001).

Sirkadiyen saatin moleküler olarak nasıl çalıştığına yönelik bilgiler ilk olarak *Drosophila melanogaster* ile yapılan çalışmalarla elde edilmiştir. Sirkadiyen saat tek hücreli siyanobakterilerden insan gibi karmaşık bir organizmaya kadar birçok organizmada mevcuttur. Döngüsel bir ortamda yaşanıldığı için biyolojik işlevlerin döngüsel ortama adapte olmayı kolaylaştırdığı, bu tür mekanizmaların olması normal olarak algılanmaktadır (Williams ve Sehgal, 2001). Fotoperiyot yokluğunda merkezi sirkadiyen ritim çalışmamaktadır. Fotoperiyot ve sirkadiyen saat arasında önemli bir bağlantı vardır (Košťál ve Shimada, 2001). Fotoperiyodizm ve sirkadiyen ritim geniş bir ortamda böcek biyolojisinin devamı için varlığını sürdürmektedir. Bundan dolayı belirli zamanlama mekanizmalarının anlamını yorumlamak için, tüm organizmanın karmaşık biyolojisinin de dikkate alınması gerekmektedir.

Fotoperiyot, mevsimsel değişimleri güvenli bir şekilde gösteren parametredir. Ancak sinyaller bitki, enlem ve mevsime göre çok fazla değişebilir (Danks, 2003). Buna ek olarak, fotoperiyodik tepkilerin yalnızca sirkadiyen saatle sınırlı tutmamak gerekmektedir. Fotoperiyodizmin mevsimsel ilişkisini anlamak, böceğin ekolojik koşullar altında meydana getirdiği fizyolojik süreçleri de kavramayı sağlar (Danks, 2005).

Sıcaklık, bir böceğin diyapoza girmesinde çevresel faktörlerin başında gelen bir durumdur. Sıcaklıktaki değişiklikler, böceği diyapoza girmesi için indükleyen bir faktördür. Bazı böcekler zorunlu olarak genetik ve hormonal mekanizmalarla programlı bir şekilde diyapoza girerken, bazı böcekler için çevresel faktörlerin yaşamlarına elverişli olmadığı durumlarda, bu faktörleri çok önceden algılayarak isteğe bağlı (fakültatif) olarak diyapoza girmeleri söz konusudur. Böylece böcekler olumsuz koşullar altında hayatta kalmayı başararak, ortam koşulları elverişli hale geldiğinde yaşam döngülerine devam edebilirler. Sıcaklığın düşmesi veya artması ile fakültatif olarak diyapoza giren böcekler olduğu gibi, bunun tam tersi sıcaklık düşüşünde veya artışında diyapoza girmeyen böceklerde söz konusudur (Denlinger, 1991).

Saunders ve ark. (1980) *Sarcophoga argyrostoma* böceğinde yaptığı bir çalışmada yüksek sıcaklıkların diyapozu sonlandırdığını, düşük sıcaklığın diyapozu artırdığını, daha düşük sıcaklıkların ise yüksek larva ve pupa ölümüne yol açtığını izlemişlerdir. Sıcaklıkla birlikte fotoperiyodik manipülasyonlar da yaparak diyapoz insidansı açısından böceği takip etmişlerdir. Kısa gecelere göre uzun gecelerde daha fazla pupa ölümlerini kaydetmişlerdir (Saunders, 1980). Sgolastra ve ark. (2009) yapmış oldukları bir çalışmada tamamen karanlık bir ortamda fotoperiyottan uzak, zorunlu kış diyapozu geçiren *Osmia lignaria* böceğinde sıcaklığın diyapozu başlatma, sürdürme ve sonlandırma üzerine etkilerini araştırmıştır. Çoğu çalışma diyapozun başlama sürdürme ve sonlandırma ölçütü olarak gelişimin ve üremenin açıkça yeniden başlaması için gereken süreyi kullanırken, bu çalışmada solunum oranlarına bakılarak diyapoz süreci değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda, sıcaklığın düşmesi ile bireylerin diyapoza girdiği, sıcaklık artışı olana kadar diyapozda kaldıkları ve sıcaklığın yaşam koşullarına elverişli seviyeye geldiğinde ise diyapozdan çıktıkları gözlenmiştir (Sgolastra ve ark., 2010).

Bazı böcek grupları “yaz diyapozu” diye adlandırılan, sıcak mevsimlerde diyapoza girmektedir. Masaki (1978) yaptığı bir çalışmada, Japon adalarının kuzeyindeki cırcır böceklerinin bir iki türü dışında, diğerlerinin yaz döneminde zorunlu olarak diyapoza girdiklerini göstermiştir. Bu tür böceklerin diyapoz fazı ile sert bir sıcak mevsimi atlayarak, uygun mevsime daha rahat bir şekilde adapte olduklarını izlemiştir. Bazı araştırmacılar bu durumun nadir gözlemlendiğini, yalnızca belirli bir iklim tipinde yaygın olabileceğini söylese de, diğer çalışmalar durumun bu şekilde olmadığını, yaz

diyapozunun böceklerde mevsimsel evrim hakkında ciddi bilgiler sunduğunu göstermektedir (Masaki, 1980).

Besin; diyapoz ve kış uykusu gibi çoğu canlının gelişimsel sürecinde yer alan mekanizmalarda canlılar, moleküler alt yapılarını çoğu zaman çevresel değişikliklere uyum sağlamak ve nesillerini devam ettirmek için değiştirirler (Tougeron, 2019). Çevresel değişiklikler tek bir parametre ile kendini göstermez. Bir bütün olarak karşı karşıya kalınır. Gün uzunluğunun kısalması, sıcaklığın azalması, nem oranında değişiklikler ve besinin oldukça azalması, özellikle böceklerde, tüm popülasyonun birlikte girdiği bir gelişimsel duraklamaya sebep olur (Bradshaw ve ark., 1977). Besin kalitesinin ve miktarının azaldığı durumlar bir canlıyı metabolik yavaşlamaya iterek, diyapoza girme sürecini hızlandırabilir (Istock ve ark., 1975).

Diyapoza giren canlılar ortamda besin tükendiğinde diyapoza girdikleri gibi, fotoperiyot değişimi ve sıcaklık azalışı gibi koşullarla birlikte de diyapoza girebilir (Tauber, 1972).

2.6.5. *Trogoderma granarium*'da diyapoz

Trogoderma granarium isteğe bağlı (fakültatif) olarak diyapoza giren bir böcektir. Böceğin diyapozunu, yaşadığı ortamdaki olumsuz çevre koşulları belirler. Bu koşulların başında sıcaklık ve besin eksikliği gelmektedir. Buna ek olarak bağıl nem, popülasyon yoğunluğu, yüksek oranda feçes varlığı böceğin diyapoza girmesinde önemli faktörleridir (Burges, 1959; Nair ve Desai, 1972).

Sıcaklık, *Trogoderma granarium* için diğer birçok böcek türlerinde olduğu gibi, diyapozun başlaması için oldukça önemli bir faktördür. *T. granarium*'un normal yaşama ve üreme aralığı 21-41 °C'dir. Bu aralığın alt ya da üst derecelerinde diyapoza girmektedir; ancak ortamda diyapoza itecek başka bir unsur söz olması durumunda, normal sıcaklıklarda dahi diyapoza girebilmektedir (Burges, 1959; Burgess, 1960; Nair ve Desai, 1972).

Besin, *Trogoderma granarium* için eksikliğinde diyapoza girilen önemli bir faktördür. Ortamda, böceğin normal beslenme koşulunun altında bir miktarda besin

bulunması durumunda, larvaların diyapoza girdiği gözlenmiştir. Bu koşul altındaki larvalarda optimal ısı aralığının üzerinde ya da altında ısı uygulandığında ise, diyapoz insidansında artış gözlemlendiği kaydedilmiştir (Nair ve Desai, 1972).

%80-90 arasındaki bir nem oranında, *Trogoderma granarium* larva ve pupalarının yaşamlarını sürdürüp erginliğe erişerek üreme devamlılığı sağlandığı izlenmiştir (Shulov, 1955). Bu seviye üzerine çıkıldığında ise, larva ve pupa ölümlerinin yüksek seviyelere çıktığı gözlenmiştir (Hadaway, 1956). Burges (1963)'in yaptığı bir çalışmada, ayrıntılı bir inceleme ile en düşükten en yükseğe kadar bağıl nem oranları denendiğinde, sıfır bağıl nem ve %90'lık bir bağıl nemin diyapoza giren larva oranında ciddi artışlara sebep olduğu kanıtlanmıştır.

Trogoderma granarium son dönem larvalarının bulunduğu ortamın yoğun bir popülasyona bürünmesi neticesinde, larvaların diyapoza girdiği kaydedilmiştir. Larvaların ortam sıcaklığının 30 °C veya altında diyapoza girmeye daha elverişli olduğu gözlenmiştir (Burges, 1951; Burges, 1959; Burges 1960).

Feçes yoğunluğunu *Trogoderma granarium* larvaları için inceleyen Burges (1963), yoğun popülasyondaki artışla birlikte dışkı atıklarının da arttığını ve bunun da böceğin diyapoza girmesinde etkili olduğunu gözlemlemiştir. İkan ve ark. (1970) yaptıkları bir çalışmada dışkı içeriğinde, diyapozun başlamasına sebep olan palmitik, stearik, oleik ve linoleik asitler olduğu sonucuna varmıştır. Linoleik asitle böceğin beslenmesi veya infüzyonla böceğe verilmesi ile böceğin diyapozunun indüklendiği kanıtlanmıştır.

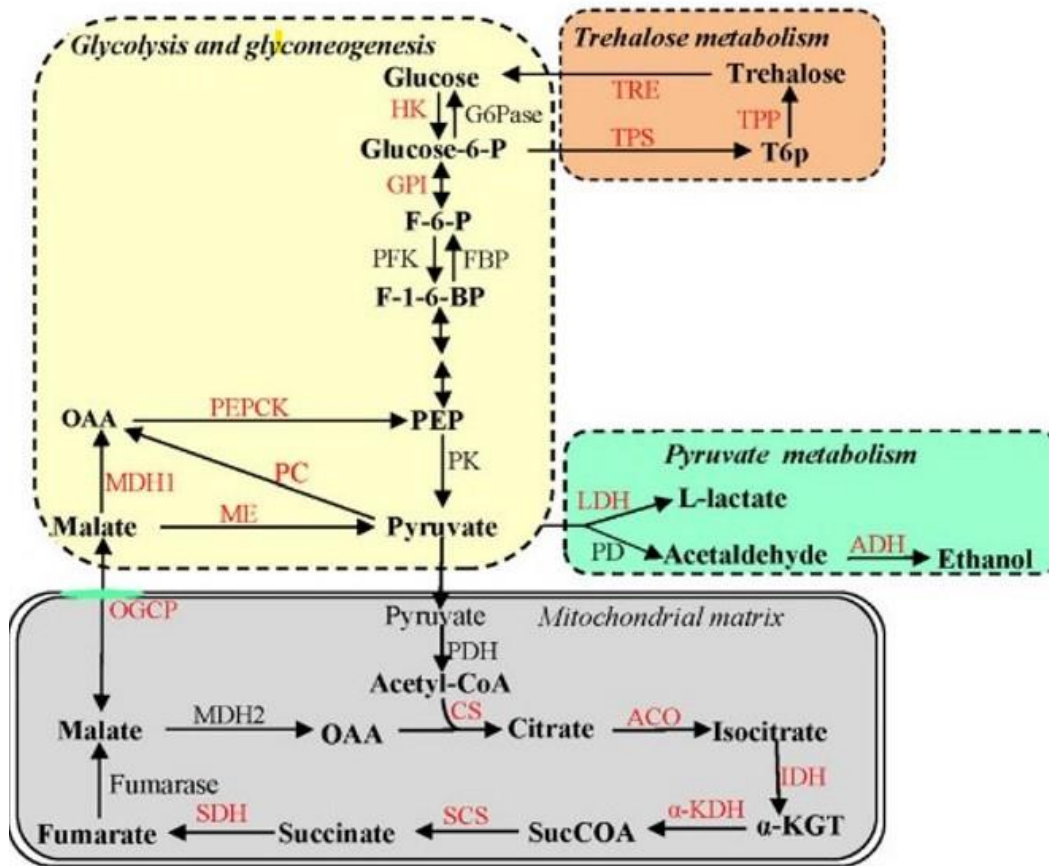
Trogoderma granarium için diyapozun nasıl sonlandırıldığına dair kesin bilgi yoktur. Önerilen fikirler ise ortamdaki ısının böceğin yaşayacağı optimal noktaya gelmesi, larva kalabalığının azalması, ortamın feçes baskısından kurtulması ve taze besin ortamına erişim böceğin diyapozdan çıktığı durumlar olarak değerlendirilmiştir (Nair ve Desai, 1973). Kısaca, ortam koşullarının organizmanın optimal yetiştirme koşullarına sahip ve steril olduğu durumlarda, gelişim devam ederek, diyapoz sonlanabilmektedir.

2.7. Glukoneogenez

Basit karbon kaynaklarından glikoz sentezi, besin kaynakları yetersiz olduğunda hayvanların hayatta kalması için önemli bir role sahiptir. Bu yüzden glukoneogenez yolağı ilkel metazoanlarda ve böceklerde bulunan atasal biyokimyasal süreçleri göz önüne sermektedir (Miyamoto ve Amrein, 2017). Glukoneogenez, vücudun gliserol, laktat, piruvat, propiyonat ve glukojenik aminoasitler gibi heksoz olmayan öncüllerden glikoz oluşmasına olanak sağlayan bir yoldur (Melkonian ve ark., 2019). Glukoneogenezin glikoz metabolizmasında ki eşsiz yeri birçok canlıda belgelenmiştir. İki karşıt hormon olan insülin ve glukagon kan glukoz düzeyini ayarlamaktadır. Kan glukoz seviyesi yükseldiğinde insülin salınımı artarak glikojenez yolağı meydana gelir ve glukoz yağa dönüştürülür (lipogenez). Kan glukoz seviyesi düştüğünde ise glukogan salgılanarak depolanmış glikojen glikoza parçalanır. Ancak glikojen tükendiğinde daha temel karbon kaynakları olan amino asit ve laktik asit gibi moleküllerden glukoz oluşumuna gidilir. Bu durum da glukoneogenez olarak adlandırılır (Thompson, 2003). Glukoneogenez genlerinin ifadesi, memelilerde ve böceklerde fonksiyonların tam olarak kavranmadığı birçok organda eksprese edilmektedir (Miyamoto ve Amrein, 2019). Glikojenoliz (glikojen parçalanması) ya da glukoneogenez (küçük karbon moleküllerinden biyosentez) yoluyla üretilen glukoz 11 enzimatik adımda üretilmektedir. Çoğu enzim reaksiyonları çift yönlü olarak katalizlense de fosfoenolpiruvat karboksikinaz (PEPCK), fruktoz-1,6-bifosfataz ve glukoz-6-fosfataz sadece glukoneogenik yolun katalitik enzimleridir (Zimmer ve ark., 1990; Chen ve ark., 2002). Metabolik enzimler taksonlarda en çok korunan genler arasındadır (Kunieda ve ark., 2006).

Glukoneogenez yolağının düzenlenmesi, genel bir bakış açısı ile anlatılacak olursa; 3 karbonlu bileşik olan piruvattan glikoz katalizlenme sürecidir (Şekil 2.8). Glukoneogenezde, genellikle bir ila iki aminoasit parçalanmasından türetilen laktat veya keto-asitten başlayarak piruvat üretilmektedir. Öncül ürünü fosfoenolpiruvat (PEP)'tir. Bu molekül piruvat kinaz enzimi (PK) ile piruvata dönüştürülür. Piruvat, mitokondride piruvat karboksilaz enziminin karboksilasyonu ile oksalasetata dönüştürülür. Bu reaksiyon yağ asitlerinin oksidasyonu yoluyla üretilen ve yüksek adenosin di-fosfat (ADP) ve glukoz seviyeleri tarafından inhibe edilen yüksek seviyelerde asetil-CoA ile uyarılır. Asetil-CoA hücrenin mitokondrisinde piruvattan, piruvat dehidrogenaz (PDH) enzim kompleksi tarafından katalizlenerek elde edilir. Oksalasetatın malat aracılığıyla mitokondriyi terk etmesine izin veren bir ara aşamadan sonra, oksalasetat dekarboksile edilir ve daha sonra PEPCK ile PEP oluşturmak üzere fosforile edilir. Bu enzim,

glukoneogenez hızının düzenleyicisidir ve transkripsiyonu, glukagon, insülin ve kortizol gibi birçok hormon tarafından hedeflenir. Birkaç ters glikoliz adımından sonra früktoz 1,6-bifosfataz, früktoz 1,6-bifosfatı früktoz 6-fosfata dönüştürür. Früktoz 2,6-bifosfat ve adenosin mono-fosfat (AMP) bu reaksiyonu inhibe ederken, sitrat früktoz 1,6-bifosfataz enzimi aktive eder. Glikoz-6-bifosfat, fosfoglikoizomeraz tarafından früktoz 6-fosfattan oluşturulur. Glikoz-6-fosfat, diğer metabolik yollarda kullanılabilir veya serbest glikoz oluşturmak üzere glikoz-6-fosfataz tarafından fosforile edilebilir. Serbest glikoz hücre içine veya hücre dışına rahatlıkla yayılabilirken fosforile form bunu yapamaz ve hücre içi glikoz seviyelerinin kontrol edildiği bir mekanizma sağlar (Exton, 1972; Young, 1977; Hers ve Hue, 1983; Bodner, 1986; O'Brien ve ark., 1990; Chen ve ark., 2002; Kunieda ve ark., 2006; Hattingve ark., 2018).



Şekil 2.8. Glikoliz ve glukoneogenez yolağında bulunan enzimatik mekanizma (Hao ve ark, 2016).

Glukoneogenez yolağında bulunan enzimlerden olan PEPCK, PK, PDH bu tez çalışmasında işlendiği için burada detaylı açıklaması yapılacaktır:

2.7.1. PEPCK (Fosfoenol Pürivat Karboksikinaz)

PEPCK (Fosfoenol Pirüvat Karboksikinaz) glukoneogenezin ilk adımını katalize eden önemli bir enzimdir. Oksalaasetatı, CO₂ ve PEP'e dönüştürür. Aneorobik (oksijensiz solunum) metabolizmanın önemli bir enzimidir. Glikoz üretiminde tampon bir görevi mevcuttur. Sitozolik ve mitokondriyal olmak üzere iki çeşidi mevcuttur. Bazı canlılarda sitozolik formu yoğunken, bazı canlılarda ise mitokondriyal formu yaygındır: insanlarda ise eşit oranda dağılım göstermektedir. Hem sitozolik hem mitokondriyal formu 74000 dalton ağırlığındadır ve monomerik yapıdadır yalnız kinetik ve immünokimyasal özellikler açısından farklılık göstermektedir (Hers ve Hue, 1983; Hanson ve Hakimi, 2008; Yang, ve ark., 2009). PEPCK'nın sitozolik formu (PEPCK-C)'nin gen ifadenmesini artıran ana faktörler arasında siklik adenosin mono fosfat (c-AMP), glukokortikoidler ve tiroid hormonu vardır. İnsülin ise süreci tersine çeviren antogonistik etki gösteren hormonal faktördür (Hanson ve Reshef, 1997). Karaciğerde, böbrek korteksinde buna ilave olarak kahverengi ve beyaz yağ dokusunda bulunur (Croniger ve ark., 2002; Hanson ve Hakimi, 2008; Yang ve ark., 2009). PEPCK'nın mitokondriyal formu (PEPCK-M) sitozolik forma göre daha az çalışılmıştır. İnsanlarda dahil olmak üzere birçok memelide toplam hepatik glukoneogenezde sitozolik formla yarı yarıya etki gösterirken, bazı canlılarda neredeyse hiç etkinlik göstermemektedir. PEPCK enziminin mitokondriyal formu PEP'in üzerindeki glikolitik ara havuzla iletişim kurabilen önemli bir yoldur (Méndez-Lucas ve ark., 2014). PEPCK-M'in PEPCK-C'ye göre tamamlayıcı bir metabolik rolü olduğu izlenmiştir (Méndez-Lucas ve ark., 2013).

Pirüvat kinaz (PK) ve pirüvat dehidrogenaz (PDH) enzimleri ile uyumlu bir şekilde etkinlik gösteren PEPCK, hücrel solunumun aneorobik ayağında piruvat üretir veya biyolojik bir dokuyu donma hasarından koruyan kriyoprotektan moleküllerinin sentezi için glikoz üretebilmektedir. Bu enzim bu nedenle diyapoza girmeye sebep olan sıcak, soğuk, kuruma ve açlık durumlarındaki ani streslerde canlıyı koruma yönünde önemli bir işlev gösterir (Lee ve ark., 1981; Lee ve ark., 1987). Hipoksik koşullar altında, böcekler aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya geçerler, bu da glikoliz/glikoneogenez, pentoz fosfat ve fosfoenolpiruvat karboksikinaz (PEPCK)-süksinat yollarına geçmeye sebep olur (Hahn ve Denlinger, 2011). Liu ve ark. (2006) *Drosophila melanogaster* üzerinde yapılan bir çalışmada oksijensiz ortamda bırakılan

canlıda yapılan gen ifade analizlerinde, *PEPCK* ifadesinin yukarı doğru bir regülasyon gösterdiği görülmüştür.

2.7.2. PK (Piruvat Kinaz)

Piruvat kinaz (PK) PEP'in piruvata tersinir bir şekilde dönüşümünü kataliz eden enzimdir (Reeves, 1968). PK enziminin en önemli noktası glikoliz ve glukoneogenez dengesinin kontrolünde önemli kilit enzimlerden biri olmasıdır (Şekil 2.8). Şöyle ki PK'ın katalize ettiği piruvat metabolizmada, birçok basamağın öncül ürünüdür. Bu durumda PK'nın metabolik yoldaki kesişme noktasında olduğunu gösterir (Kayne, 1973). Piruvat kinaz, c-AMP'ye bağlı protein kinaz tarafından fosforile edilerek aktif hale getirilir. Tetramer yapısında olduğu için iki ila dört fosfat grubunun eklenmesi ile fosforilasyonu sağlanır. Daha sonra PEP'in piruvata dönmesini sağlar. Bu olayı katalize ederken bir adet ATP oluşumu da sağlar. Defosforile olması ile inaktif hale gelir (Jett ve ark., 1981; Pilkis ve ark., 1988). Diyapoz gibi metabolizmanın oldukça düşük seviyede çalıştığı durumlarda, geri dönüşümlü bir metabolik baskılama meydana gelir. Laboratuvar çalışmalarında enerji elde edilen yollardaki kilit enzimler üzerinde durulmuştur ve bu enzimler geniş filogenetik hatlarda ortaya çıkarılmıştır. Bu kilit enzimler, protein kinaz ve protein fosfataz eylemleriyle kontrol edilen geri dönüşümlü fosforilasyona tabi olmaktadır. Bu enzimlerden biri olan PK, yapılan bir çalışmada deniz yumuşakçalarında meydana gelen hipometabolik hadiseler dolayısıyla oksijenli solunumun azalmasına bağlı olarak fosforile olması ile inaktif hale gelmiştir. PEP'in piruvata dönüşümünü sağlayamadığı için PEP'i, PEPCK reaksiyonuna itmiştir ve ardından PEP'i süksinat sentezi reaksiyonlarına yönlendiren karbonhidrat akışını kolaylaştırmıştır (Storey, 1993, 1996; Storey ve Storey, 2004).

2.7.3. PDH (Piruvat Dehidrogenaz)

Piruvat dehidrogenaz (PDH) üç ana katalitik birimden oluşmaktadır. Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde üç katalitik enzimin çoklu kopyalarını oluştururlar. Piruvat dehidrogenaz (E1), dihidrolipoamid asetiltransferaz (E2) ve dihidrolipoamid dehidrogenaz (E3)'dür. E1 ve E2, asetil-CoA'yı üretirken, FAD/NAD'a bağlı E3, redoks geri dönüşümünü gerçekleştirir (Şekil 2.8). E1, tiamin difosfata bağımlı bir enzimdir. Enamin ara ürünü oluşturarak piruvatın CO₂'ye dekarboksilasyonun ve kovalent olarak

bağlı lipoil gruplarının indirgeyici-asetilasyonunu sağlar. E2, asetil-CoA oluşturmak için bir asetil parçasının CoA'ya transferini katalize eder. E3 ise, Elektronların E2'nin dihidrolipoil kısımlarından FAD ve sonra NAD'a transferini gerçekleştirir (Patel, 1990; Brown ve ark., 1994; Patel ve ark., 2014). Piruvat dehidrogenazın (PDH) düzenlenmesi glukoz dengesinin düzenlenmesinde önemlidir. PDH'nin regülasyonu, post-translasyonel mekanizmalarla (fosforilasyon/(defosforilasyon) ve transkripsiyonel mekanizmalarla dikkatli bir şekilde yürütülür. Post-transkripsiyonel düzenlemeler yalnızca kinazların ve fosfatazların dokuya özgü dağılımını içeren bileşenlere bağlı değildir. Enerji durumunun göstergeleri olarak intra-mitokondriyal redoks durumuna ve metabolit seviyelerine göre de düzenlemeler yapılmaktadır. Uzun vadeli süreçte ise transkripsiyonel düzenleme yapılmaktadır ki PDH'nin regülasyonu için daha karmaşık bir süreçtir (Patel ve Korotchkina, 2006).

Diyapoz gibi metabolik baskılamanın olduğu durumlarda yakıt metabolizması yeniden düzenlenmektedir. Karbonhidrat katabolizması oldukça düşük seviyelere getirilerek lipidoksidasyona geçiş kolaylaştırılmaktadır. Burada en önemli enzimlerden olan biri TCA döngüsüne karbonhidrat girişini sağlayan PDH enzimi göze çarpmaktadır. Metabolik aktivitenin en alt noktalara getirileceği durumlarda PDH enzimi güçlü bir şekilde fosforilasyon ile inhibe edilerek glukoneogenez yolağının önü açılmış olur (Brooks ve Storey, 1992; Brooks ve Storey, 1997).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Yapılan bu tez çalışmasında *Trogoderma granarium* (Everts) (Coleoptera: Dermestidae) böceği kullanılmıştır. Deneyler, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİTAM) ve Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi'nde yapılmıştır.

3.1. Kapra böceğinin Laboratuvar ortamında yetiştirilmesi

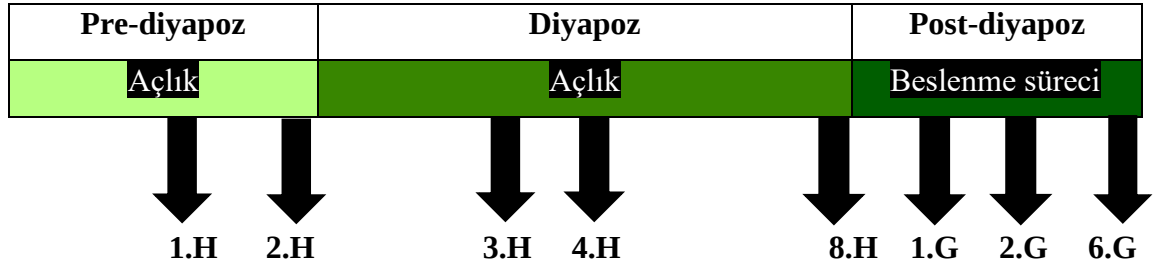
2 kg tane buğday (*Triticum aestivum* L.) tartıldıktan sonra 500 g'lık miktarları dört ayrı kaba paylaştırılmıştır. Buğdaylar etüvde, 55 °C'de 6 saat steril edilerek, kontaminasyondan arındırılmıştır. *Trogoderma granarium* kültürleri, 11,5 cm çapında ve 18,5 cm yüksekliğinde petri kaplarında yetiştirilmiştir. Kapakları, hava akışını sağlamak ve böceklerin kaçmasını engellemek amacıyla tül bezle kaplanmıştır. Böcek kültürünün çoğalması için etüv 33 ± 1 °C sıcaklık ve %65 ± 5 bağıl neme ayarlanmış, her bir kaba yüz adet son dönem larva ilave edilmiştir.

3.2. Diyapozun indüklenmesi

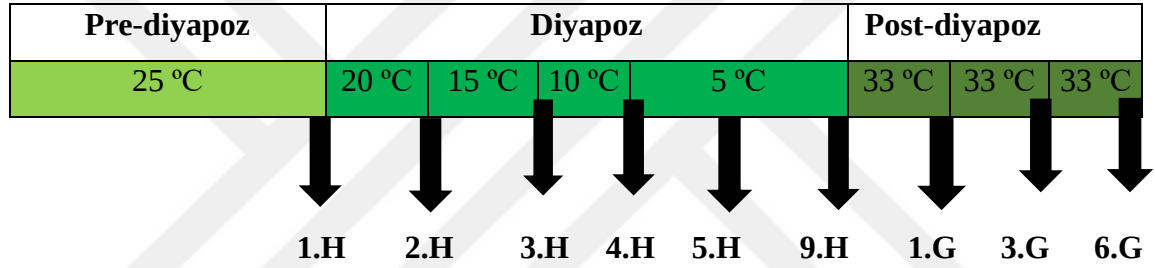
Böceklerin diyapoz indüklenme aşaması, Dageri (2024)'nin yaptığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Açlık diyapoz grubunu oluşturmak için, beşinci dönem larvalar ayrı bir Petri kabına taşınmıştır. Larvalara ilk olarak, bir hafta boyunca 5 g buğday verilmiştir. İkinci hafta 2.5 g buğday verildikten sonra, böcekler sekiz hafta boyunca besinsiz bırakılarak diyapoz süreci izlenmiştir. Açlığın üçüncü haftasından sonra larvalarda karakteristik diyapoz belirtileri gözlenmiştir. Sekizinci haftanın sonunda ise altı gün süreyle besin sağlanarak diyapoz sonlandırılmıştır. Birinci, üçüncü ve altıncı günlerden toplanan örnekler, post-diyapoz fazını oluşturmuştur. Pre-diyapoz, diyapoz ve post-diyapoz fazlarından toplanan örnekler Şekil 3.1'de verilmiştir.

Soğuk diyapozu deneyinde, son dönem larvaların sıcaklıkları, 33 ± 1°C'den başlayarak haftalık yaklaşık 5°C'lik kademelerle 5 ± 1°C'ye kadar düşürülmüştür. 5 °C'de dört hafta sürdürülen diyapoz fazı sonrası, sıcaklık tekrar 33 ± 1°C'ye çıkarılarak diyapoz sonlandırılmıştır. Birinci, üçüncü ve altıncı günlerden toplanan örnekler, post-diyapoz fazını oluşturmuştur. Pre-diyapoz, diyapoz ve post-diyapoz fazlarından toplanan

örneklere dair diyagram Şekil 3.2’de verilmiştir. Her iki diyapoz grubundaki kontrol grupları, standart yetiştirme koşulları altında tutulan beşinci dönem larvalardan oluşmuştur. Bu örnekler ve diyapoz örnekleri RNA izolasyonuna tabi tutulmuştur.



Şekil 3.1. Açlık baskısı ile indüklenen diyapoz sürecinin şematik gösterimi. Haftalar “H” harfi şeklinde, günler “G” harfi şeklinde yazılmıştır. 1.H pre-diyapoz fazını göstermektedir. 2.H, 3.H, 4.H ve 8.H diyapoz fazını göstermektedir. 1.G, 2.G ve 6.G ise post-diyapoz fazını göstermektedir.



Şekil 3.2. Soğuk baskısı ile indüklenen diyapoz sürecinin şematik gösterimi. Haftalar “H” harfi şeklinde, günler “G” harfi şeklinde yazılmıştır. 1.H pre-diyapoz fazını göstermektedir. 2.H, 3.H, 4.H, 5.H ve 9.H diyapoz fazını göstermektedir. 1.G, 3.G ve 6.G ise post-diyapoz fazını göstermektedir.

3.3. RNA izolasyonu

Açlık ve soğuk diyapozu ile kontrol örneklerinden, NucleoZOL (Machery-Nagel GmbH, Düren, Almanya) reaktifi ile total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler, üç biyolojik ve üç teknik tekrar şeklinde yapılmıştır. Yaklaşık 50 mg örnek, 500 µl NucleoZOL reaktifi içeren mikrosantrifüj tüpünde mikro havaneli yardımıyla homojenize edilmiştir. Daha sonra tüplere 200 µl ultra saf su ilave edilerek 15 s çalkalanmıştır. Tüpler 5 dk oda ısısında inkübe edildikten sonra, 15 dk 12.000 x g’de santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant, steril bir santrifüj tüpüne aktarılmış ve tüpe 500 µl izopropanol eklenerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra, tüp 10 dk süre ile 12.000 x g’de santrifüje tabi tutularak örneklerin total RNA’ları çöktürülmüştür. Tüpün alt kısmında görünür şekilde bulunan RNA pelleti, iki kez %75’lik etanol 500 µl ile 8.000 x g’de 3 dk santrifüj edilerek yıkanmıştır. Elde edilen

pelletin üzerine 50 µl ultra saf su eklenerek RNA çözündürülmüştür. Örneklerin, Multiskan GO Mikroplaka Spektrofotometresi (Termo Fisher Scientific, MA, ABD) ile RNA konsantrasyonu, 260/280 nm ve 260/230 nm'deki saflık absorbans değerleri ölçülerek tespit edilmiştir.

3.4. cDNA sentezi

OneScript® Plus cDNA Sentez Kiti (ABM Good, Kanada) kullanılarak tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi yapılmıştır. İzole edilmiş RNA'lar üreticinin belirttiği protokol uygulanarak cDNA'ya çevrilmiştir (Çizelge 3.1). Belirtilen miktarda cDNA sentez reaktiflerini içeren tüpler, ilk olarak 55°C'de 15 dk inkübasyona alınmış, ardından 85°C'de 5 dk inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra cDNA'ların konsantrasyon ve saflık ölçümü, Multiskan GO Mikroplaka Spektrofotometresi ile tayin edilmiştir. Örnekler RT - qPCR uygulamalarında kullanmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cDNA sentez reaktif ürünleri.

Reaktif ürünleri	Hacim(µl)
5X RT Buffer	4 µL
Primerler	1 µL
Deoksinükleotid Karışımı (10 mM)	1 µL
Reverse Transcriptase Enzimi (20U/µL)	1 µL
Total RNA	1 ng - 2 µg
Ultra saf su	20 µL'ye tamamlanır.

3.5. Seçilen genlere uygun primerlerin tasarlanması

Tez çalışması kapsamında *TgPEPCK*, *TgPK* ve *TgPDH* genleri kullanılmıştır. Genlere ait dizi bilgileri, Dağeri ve ark. (2022) tarafından oluşturulan cDNA kütüphanesi incelenerek, elde edilmiştir. Housekeeping gen olarak β-aktin (*TgACT*) kullanılmıştır (Dağeri ve ark., 2023). Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) sitesi aracılığı ile primerlerin tasarımı gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Tez çalışması için elde edilen primerler.

Gen adı	Primerler (5'-3')
<i>TgPEPCK</i>	Forward: AGACTGGCAAGGCCGACCCAT Reverse: CTTCAAGAGGCTTCCCAGTGA
<i>TgPK</i>	Forward: TCAATTTGCCTGGTGTAGCCG Reverse: TTCTGGTGAGGGCAGCAGCGT
<i>TgPDH</i>	Forward: CACACGGCTGGACACATATAATG Reverse: CGACAATTCCATTGCCACCATAG
<i>TgACT</i>	Forward: ATGGCGTGTGGCAAAGCGTAA Reverse: CCTTCAACACACCAGCTATGT

3.6. RT – qPCR analizi

QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) cihazı ile RT-qPCR analizi yapılmıştır. Deneyler için, FastStart Essential DNA Green Master Mix (Roche) ile reaksiyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 3.3). Hazırlanan reaksiyonlar, cihazda 95°C'de 10 dk ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Bunu takip eden sürede 95°C'de 10 s ısınma, primerlerin spesifik bağlanma sıcaklıklarına göre 10 s süreyle bağlanma ve son olarak 72°C'de 10 s süreyle uzama aşamaları içeren 40 döngü şeklinde çalışılmıştır. Ardından 10 s 40 °C'de soğutma işlemine tabi tutulmuştur. Reaksiyon basamaklarının ardından, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak erime eğrisi analizi gerçekleştirilmiş ve her fragmentin bütünlüğü teyit edilmiştir, ayrıca olası kontaminasyonlar kontrol edilmiştir. Tüm örnekler için üç teknik tekrar yapılmış ve *TgPEPCK*, *TgPK* ve *TgPDH* genlerinin göreceli ifade seviyeleri, housekeeping gen *TgACT* ile karşılaştırılarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ bağıl nicel yöntem kullanılarak hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

Çizelge 3.3. RT - qPCR çalışmasında kullanılan reaktifler ve hacimleri.

Reaktifler	1X Hacim (µl)
DNA Green Master	10 µL
Forward Primer (10 µL)	0.75-1,5 µL
Reverse Primer (10 µL)	0.75-1,5 µL
cDNA	1-100 ng
Ultra Saf Su	- µL
Toplam Hacim	20 µL

3.7. Seçilen genlerin biyoinformatik ve filogenetik analizi

TgPEPCK, *TgPK* ve *TgPDH* genlerinin varsayılan protein dizilimlerini belirlemek için, ilgili cDNA'ların tahmini açık okuma çerçeveleri, NCBI ORFfinder aracı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) ile belirlenmiştir. Üç genin nükleotit dizisinin diğer genlere benzerlik oranları BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – Temel Yerel Hizalama Aracı) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) aracı kullanılarak saptanmıştır. Proteinlerin, tahmini moleküler ağırlıkları ve izoelektrik noktaları (pI) Compute pI/Mw aracı (https://web.expasy.org/compute_pi/) kullanılarak belirlenmiştir. *TgPEPCK*, *TgPK* ve *TgPDH* tahmini proteinlerinin olası domain ve motif taraması NCBI Conserved Domain (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) ve ScanProsite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>) kullanılarak araştırılmıştır. *Trogoderma granarium*'a ait tahmini PEPCK, PK ve PDH protein dizileri, üç farklı coleopter böceği ait gen dizileri ile MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/muscle>) aracı kullanılarak hizalanmıştır ve ardından BoxShade aracı (<https://junli.netlify.app/apps/boxshade/>) ile renklendirilmiştir. *TgPEPCK*, *TgPK* ve *TgPDH*'nin tahmini üç boyutlu protein yapısı Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html>) kullanılarak elde edilmiştir.

Filogenetik ağaçlar oluşturmak için farklı böceklerle ve *T. granarium*'a ait PEPCK, PK ve PDH aminoasit dizileri NCBI veri tabanından elde edilmiştir ve MEGA 7 programına yüklenmiştir (Kumar ve ark., 2016). Çoklu dizi hizalaması ClustalW programı kullanılarak yapılmıştır. Hizalanan dizi dosyası, komşu birleştirme (Neighbor joining) yöntemi ile 1000 tekrarlı önyükleme sekmesi (Bootstrap: 1000) seçilerek, filogenetik ağaçlar elde edilmiştir (Saitou ve Nei, 1987).

3.8. Verilerin istatistiksel analizi

Minitab Ltd. tarafından geliştirilen Minitab 19.0 yazılımı ile istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak uygulamalar arasındaki istatistiksel anlamlılık farklılıkları belirlenmiş ve bunun ardından Tukey HSD (Honestly Significant Difference) testi yapılmıştır. Test sonucunda, istatistiksel olarak 0.05'ten küçük *p* değeri anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Biyoinformatik ve filogenetik analiz

4.1.1. *TgPEPCK* geninin biyoinformatik ve filogenetik analizi

2985 nükleotit uzunluğuna sahip *TgPEPCK* geni 651 aminoasit kodlayan, 1956 nükleotit içeren açık okuma çerçevesine sahiptir. Tahmini aminoasit dizisi, *Drosophila melanogaster* (P20007.2)'de bulunan Fosfoenol pirüvat karboksikinas ile %70.86 benzerlik göstermektedir. BLAST sonucuna göre *TgPEPCK*, PEPCK enziminin sitozolik formudur. *TgPEPCK* 'nın teorik pI ve moleküler ağırlığı sırası ile 8.28 ve 72.327 kDa'dır. *TgPEPCK*, glukoneogenezde aktif rol üstlenen PEPCK (GTP) süperailisi üyelerindendir. ScanProsite tarafından korunmuş motifi FPSACGKTN olarak tahmin edilmiştir ve aktif bölgesinin sistein (C) aminoasidi olduğu gözlenmiştir. (Şekil 4.1).

Ldecem_pepck	1	MRFLLVLTKEFEFCRFTEFGKE-KGLASCN-VEFLNQVRGLSAINGDLRLLEPKLSY
Tgrana_pepck	1	-MPEVV---EKKNLNTTNGVGGAAKNLAHKNSFGLFDHLRG-SVVHGS-KDLSPKVRSY
Tmaden_pepck	1	-MPEFI--EKKSNGFS--TEVGRFAQASHPN-VGLFNHLKGISVVGDFKNLSPKVRAY
Tcastan_pepck	1	-MPEFI--EKKSNGFS--TEVGRFAQASHPN-VGLFNHVKGISVVSGDFKNLSPKVRAY
Ldecem_pepck	59	VEENVLCQPEIHICDGTDEVENKLLLMQQQGTIVPLPKYNCWLARTNPADTARVES
Tgrana_pepck	55	VENVDLCQPER--CDGSEVENNNLLNLLQ QGTV PLPKYQNCWLARTNPADTARVES
Tmaden_pepck	55	VEENIDLQPEKIHICDGTENENNNLLNLMQQQGTIVPLPKYQNCWLARTNPADTARVES
Tcastan_pepck	55	VEENIDLQPEKIHICDGTENNNLLNLMQQQGTIVPLPKYQNCWLARTNPADTARVES
Ldecem_pepck	119	KTFICTDKKETIPS-KGVKGALGNWMSPDMDA INERFTGCMRGRTMYIVPFSMGPV
Tgrana_pepck	112	KTFCTERRADTPTTKEG-KGQLGNWLSPRMDAAVKERFTGCMRGRTMYVVPFSMGPG
Tmaden_pepck	115	KTFICTEKRAETIPTTKEGKGTGLGNWMSPRMD AVKERFTGCMKGRRTMYVVPFSMGPV
Tcastan_pepck	115	KTFICTEKRAETIPTTKEGKGTGLGNWMSPRMDAAVKERFTGCMKGRRTMYVVPFSMGPV
Ldecem_pepck	179	TSPLSKIGIEITDSYVVASMRIMTRMGLPVLEKLKGAEFVKCLHSGVTPNGIEFPS
Tgrana_pepck	169	SPSKG---ELTDSAYVVSSMRMTRMGKPVLDLADNRDFVKCLHSGVTPAGFVEMES
Tmaden_pepck	175	SSPLKIGIQLTDSAYVVVSMRVTRMGQTVLDKLDGTDVFRCLHSGVTPANGFIEMKS
Tcastan_pepck	175	SSPLSKIGIQLTDSAYVVVSMRVTRMGQAVLDKLDGSDVFRCLHSGVTPANGFIEMKS
Ldecem_pepck	239	WPCDPERTIILHRPNNNEIVSYSGYGGNSLLGKKCFALRIGSTIARREGWLAEHMLILG
Tgrana_pepck	224	WPCDPERTLHKPOTNEVSYSGYGGNSLLGKKCFALRGSTAKREGWLAEHMLILG
Tmaden_pepck	235	WPCDPERTIILHKPOTNEIVSYSGYGGNSLLGKKCFALRIGSTIAKREGWLAEHMLILG
Tcastan_pepck	235	WPCDPERTIILHKPOTNEIVSYSGYGGNSLLGKKCFALRIGSTIAKREGWLAEHMLILG
Ldecem_pepck	299	ITPSGKKRYIAAFAFPSACGKTNLAMMTPSLPGYKIECVGDDIAWMRFDKNGVLRAINPE
Tgrana_pepck	278	TNPQGGKRYAAAFPSACGKTNLAMLTPTPLPGYKVECVGDDAWMRFDNGVLRAINPE
Tmaden_pepck	295	ITNPEGKKRYIAAFAFPSACGKTNLAMMTPTPLPGYKIECVGDDIAWMRFDKNGVLRAINPE
Tcastan_pepck	295	ITNPEGKKRYIAAFAFPSACGKTNLAMMTPTPLPGYKIECVGDDIAWMRFDKNGVLRAINPE
Ldecem_pepck	359	NGFFGVAPGTSNSSNPIAMTIFKNTLFTNVASTSDGGVFWEGMEKEVSNM ITDWRGN
Tgrana_pepck	334	NGFFGVAPGTSNSSNPIAMKTIFKNTFTNVASTSDGGVFWEGMEKEEVEVKTDWGR
Tmaden_pepck	355	NGFFGVAPGTSNSSNPIAMKTIFONTIFTNVASTSDGGVFWEGMEDEIDPLKIDWRGK
Tcastan_pepck	355	NGFFGVAPGTSNSSNPIAMKTIFONTIFTNVASTSDGGVFWEGMEDEIDPNRITDWRGK

Ldecem_pepck	419	WKIGSKTPAAHPNSRFCTPAKQCPIIDPAWEPEGVPISAILFGGRRPAGVPLVYEAR
Tgrana_pepck	391	PWAKGESKTAAHPNSRFCSPAQCPDPEWEAEGVP--SALFGGRRPAGVPLYEAR
Tmaden_pepck	415	PWVKGESKTAAHPNSRFCTPAKQCPIIDPNWEAPEGVPISAILFGGRRPGVPLVYQAR
Tcastan_pepck	415	PWTKGESKTAAHPNSRFCTPAKQCPIIDPNWEAPEGVPISAILFGGRRPAGVPLVYQAR
Ldecem_pepck	479	NW_HGVFIGATMRSEATAAAEHKGVVMHDPFAMRPFFGYNFG_YLHWLSMKERSDNLP
Tgrana_pepck	446	NW_HGVF_GAAMRSEATAAAEHKGV_MHDPFAMRPFFGYNFGHYLEHWLSMEKRSDDL
Tmaden_pepck	475	DWKHGVLIIGATMRSEATAAAEHKGVIMHDPFAMRPFFGYNFGHYLEHWLSMKQRSTNLP
Tcastan_pepck	475	DWKHGVLIIGAMRSEATAAAEHKGVIMHDPFAMRPFFGYNFGHYLEHWLSMEQRSANLP
Ldecem_pepck	539	KIFHVNWFRKDGKFLWPGFGGENSRVLDWILRRLDNEDCARDTPIGLIPKENLNLEGI
Tgrana_pepck	504	K_FHVNWFRKSGDKFLWPGFGGENSRVLDW_RRLNECA_DTP_GLPKENALNLDGL
Tmaden_pepck	535	KIFHVNWFRKSGDKFLWPGFGGENSRVLDWILRRLDNEDCAKETPIGYLPKPSAINMQGL
Tcastan_pepck	535	KIFHVNWFRKSGDKFLWPGFGGENSRVLDWILRRLDNEDCAKETPIGYLPKPSAINMQGL
Ldecem_pepck	599	ENI_VKELFDLPKQFWMEEVDSV_KYFDEQVG_DLPKEITKQLNELLKKNVQSMKD
Tgrana_pepck	559	KEQ_NLKELFALPKGFWMEEV_A_DKYFQEQVGSDDLPOK_ETQLKNLEKR_NDM--
Tmaden_pepck	595	KDKVNEELFSLPKDFWMEEVYAIEKYFNEQVGSDDLPEITITQLKQLKKRVNDM--
Tcastan_pepck	595	KDKVNEELFSLPKDFWMEEVYAIEKYFNEQVGSDDLPEITIEQLKQLKKRVNDM--

Şekil 4.1. *Leptinotarsa decemlineata* (XP_023026296.1), *Tribolium madens* (XP_044265737.1), *Tribolium castenauum* (XP_975997.1) ve *Trogoderma granarium*'un PEPCK aminoasit dizi hizalanması. PEPCK (GTP) enzim süper ailesi yeşil vurgu, FPSACGKTN korunmuş motif sarı vurgu, aktif bölge kalıntısı kırmızı vurgu ile belirtilmiştir.

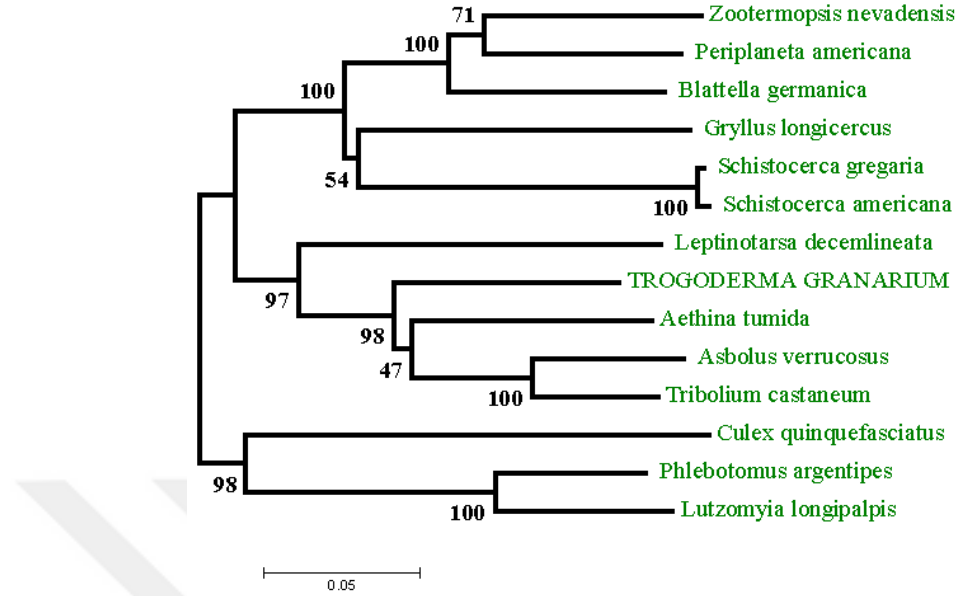
Üç boyutlu protein modellemesi c2qeyA şablonu (PDB erişim no: 2qey) üzerinden oluşturulmuştur; %100 güven oranında, %67 benzerlik göstermiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. TgPEPCK'nın üç boyutlu tahmini protein yapısı.

TgPEPCK oluşturulan filogenetik ağaçta, Coleoptera takımından *Asbolus verrucosus*, *Tribolium castenauum*, *Aethina tumida* ve *Leptinotarsa decemlineata* ile aynı

nod altında dallanmıştır. İki ana dal altında üç alt dalın meydana geldiği ağaçta, her böcek kendi takımına uygun şekilde kümelenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. 13 adet farklı böcekten elde edilen PEPCK'lerden oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik ağaçta kullanılan böceklerin isimleri ve Genbank accession numaraları şu şekildedir: *Zootermopsis nevadensis*, XP_021918257.1; *Periplaneta americana*, KAJ4428710.1; *Blattella germanica*, PSN39125.1; *Gryllus longicercus*, KAK7789390.1; *Schistocerca gregaria*, XP_049833816.1; *Schistocerca americana*, XP_047001685.1; *Leptinotarsa decemlineata*, ARI45072.1; *Aethina tumida*, XP_019866924.2; *Asbolus verrucosus*, RZC33038.1; *Tribolium castaneum*, XP_975997.1; *Culex quinquefasciatus*, EDS35056.1; *Phlebotomus argentipes*, XP_059607541.1; *Lutzomyia longipalpis*, XP_055692844.

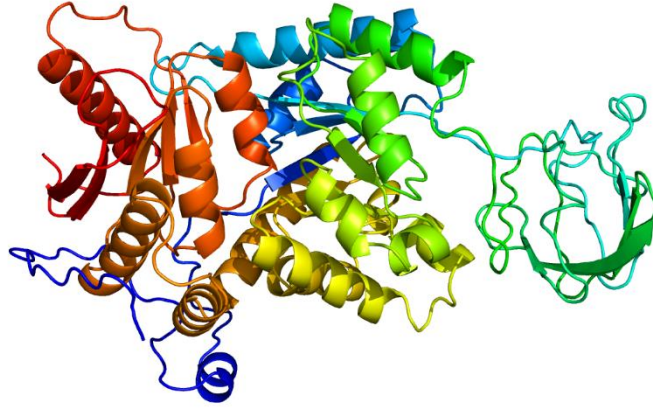
4.1.2. *TgPK* geninin biyoinformatik ve filogenetik analizi

1850 nükleotit uzunluğundaki *TgPK* geni 533 aminoasit kodlayan, 1602 baz dizisi içeren açık okuma çerçevesine sahiptir. *TgPK* tahmini aminoasit dizisi, *Drosophila melanogaster* (O626119.2) Pirüvat kinazının amino asit dizisi ile %72.04 benzerlik göstermektedir. *TgPK*'nın teorik pI ve moleküler ağırlığı sırası ile 7.91 ve 57.753 kDa'dır. PK, glikolizi düzenleyen PK süperaillesine üye olan önemli bir allosterik enzimdir. IMIISKIENQQGM aminoasit dizisi ScanProsit tarafından varsayılan korunmuş motif olarak bulunmuştur (Şekil 4.4).

Atumid_pk	1	-----MVWETIND--DNPDDIVDPKVKP
Dponder_pk	1	-----MVWTTINDRISNVNPEMSANVLP
Tgrana_pk	1	-----MKAVY---RQNSMAGTNVPP
Tcasta_pk	1	MLVPALLGGGRSVCKGSSAFVVLIESCALRFPCRKMVTITTYD--NDEREMASSSVPP
Atumid_pk	24	QQIDAGARSHTEHICALNVMSKPKTRLGICTIGPASKPMLKMMEQGMNIARN
Dponder_pk	24	FQMQAASNTOLDHLCALDIESASYVRLSGIICTIGPASKDPALEKMMEVGMNARLN
Tgrana_pk	18	LQIQAADANNHLCALD-NSKASYVRLSG-CTGPASRDPALEMMETGMNARLN
Tcasta_pk	59	LQMEADAETHLDHMCALDIQSKADEVRLSGIICTIGPASRDPALEKMMETGMNIARLN
Atumid_pk	82	FSHGSHEYHAETVKNRIAAAYSKKIGMYPLAIALDTKGPEIRTGLLDGGGSAEVELK
Dponder_pk	84	FSHGSHEYHAETIKNIREAVANYSKKIGMTYPLAIALDTKGPEIRTGLLEGGGSAEIELK
Tgrana_pk	72	FSHGSHEYHAETIN-RTAVANYSKKGM-YPLAALDTKGPERTGLLEGGGSAEVELK
Tcasta_pk	119	FSHGSHEYHAETIKNIRTAVANYSKKIGMSYPLAIALDTKGPEIRTGLLEGGGSAEVELK
Atumid_pk	142	KGTTILT DKYADKCTADIVYVDYENIKIVFGNKIFVDDGLMSLVC E KGNALVC
Dponder_pk	144	KGDTIKLTLDKAYAEKGNKDVFDYDNIQKVVKVGNKIYVDDGLISLVSGI GSFILTC
Tgrana_pk	127	KGK KLTLDK YADKNTSV YVDYEN QKVVKVGNR--DDGL--LC E--EGTTHC
Tcasta_pk	179	RGEKTLTLDKAYAEKCTASIVYVDYENIQKVLKVGNRVYVDDGLMSLVCIEIKGADLLC
Atumid_pk	202	TIENGGMGLSKKG NLPGLPVDLPVSEKDKSDLQFGVDQGVDMIFASFIRG ALTEIR
Dponder_pk	204	TIENGGMGLSRKGVNLPVPVDLPVSEKDKSDLQFGVEQGVDMVFASFIRNGAALTEIR
Tgrana_pk	178	TENGGLLSRKGVNLPGVVDLPVSEKDKDLQFGDQGVDMFASF RNAALTE--
Tcasta_pk	239	TIENGGMGLSRKGVNLPVPVDLPVSEKDKSDLQFGVEQGVDMIFASFIRNG ALSEIR
Atumid_pk	262	VLGEKGD IKIISKIECQQALN IDEIIDASDGIMLARGDLGIEIPTKVF LAQKSIIA
Dponder_pk	264	NILGD GKHILIISKIENQQGVNLDEIIEASDGIMARGDLGIEIPTKVF LAQK MIA
Tgrana_pk	232	VLGEKG KIMIISKIENQQGMNLDE--KASDG MVARGDLG--EPTK FLAQKSM A
Tcasta_pk	299	NILGPGK ILIISKIENQQGMQ LDEIIKASDGIMVARGDLGIEIPTKVF LAQK MIA
Atumid_pk	322	KCNRVGKPV CATQMLESMIKKPRPTRAESDVANAVLDG D VMLSGETAKGEYPLECI
Dponder_pk	324	RCNKAGKPVICATQMLESMVKKPRPTRAESSDVANA ILDGADCVMLSGETAKGDYPLDCV
Tgrana_pk	281	RCNKYKPV CATQMLESMVKKPRPTRAESSDVANA LDGADCVMLSGETAKGDYPLECV
Tcasta_pk	359	KCNKVGKPVICATQMLESMVKKPRPTRAESSDVANA ILDGADCVMLSGETAKGDYPLECV
Atumid_pk	382	ATAVV KEAE AIYEIEDL DATPLVDAAQIAIAAV ASKCAV AIIVITTS
Dponder_pk	384	QTMASICKAEAAIWRRLEIDLNLATPPIDAHTVAIAAVEASTK LAAAIIVITTS
Tgrana_pk	339	LTMANCKEAEAAWQRQETDLSNQATPPDAAHTVAIAVEAS KCLAAA-VVTTTG
Tcasta_pk	419	HTMANICKAEAAIWQKQLEQDLTS A PPMDAHTVAIAA EASSKCLAAAIIVVITTS
Atumid_pk	442	RSAHLVAKYRPRCPILAVRDARVARQ HMYRGIVPLIFDKRK FIDLERL EAMS
Dponder_pk	444	RSAHLISKYKPRCPPIAVTRARTARQAHLRYRAVLPLYEQDRLGDWL DVDAVNVGGIT
Tgrana_pk	392	RSAPHLAKYRPRCP-AVTRDQVARQAHLRYRA LPL YPERLEDWLKDVDARVNEGN
Tcasta_pk	479	RSAPHLISKYRPRCPPIAVTRAQTARQAHLRYRAILPLYEAEER DDWLKDVEARVNT IE
Atumid_pk	502	FGRGRIKED IILS WKGTGFSN MRILYVEAGDEEVCMFPCQT
Dponder_pk	504	FGKKGFIKSDPVIVITGWKQSGGFTNTMRVYVVEELGTICAE----
Tgrana_pk	446	FGKAGFGKSGDPVV TGWKQSGGFTNTLRVNV-----
Tcasta_pk	539	FGKARGFIK GDPVIVITGWKQSGGFTNTMRVNV-----

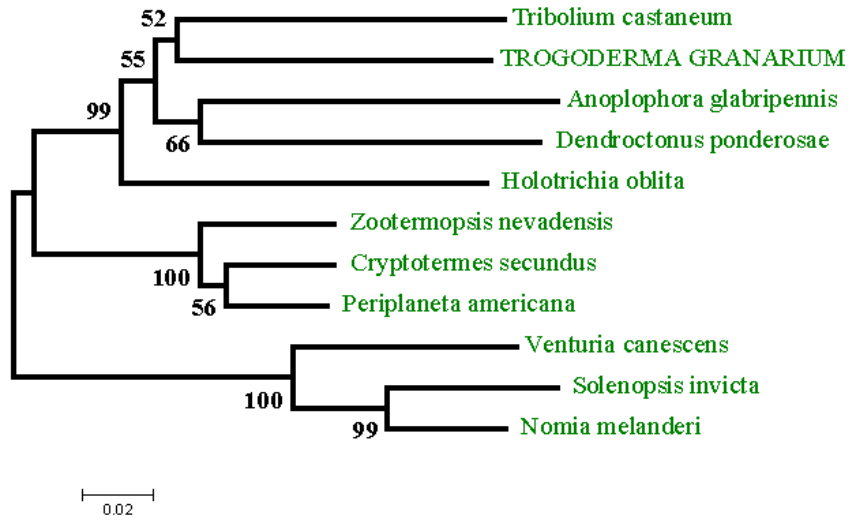
Şekil 4.4. *Aethina tumida* XP_019875157.1), *Dendroctonus ponderosae* (XP_048524062.1), *Tribolium castenauum* (XP_966698.) ve *Trogoderma granarium*'un MUSCLE aracı kullanılarak PK aminoasit dizi hizalaması. PK enzim süperailisi yeşil vurgu, IMIISKIENQQGM korunmuş motifi sarı vurgu ile belirtilmiştir.

TgPK üç boyutlu modellemesi, c6du6D şablonu (PDB erişim no: c6du6) üzerinden %100 güven oranında oluşturulmuş ve şablona %76 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. TgPK'nın üç boyutlu tahmini protein yapısı

PK aminoasit dizileri ile elde edilen filogenetik ağaçta, ilgili taksonların bir arada kümelendiği kopya ağaçların yüzdesi (1000 kopya) dalların yanında gösterilmiştir. Filogenetik ağaç analiz edildiğinde 2 ana dal altında 3 alt dal oluşmuştur. *Trogoderma granarium* ile coleopter takımına ait böcekler aynı dal altında kümelenebilir. Diğer böcekler ise kendi taksonomisine uygun bir şekilde kümelenebilir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. 10 adet farklı böcekten elde edilen PK'lerden oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik ağaçta kullanılan böceklerin isimleri ve Genbank accession numaraları: *Tribolium castaneum*, XP_966698.2; *Anoplophora glabripennis*, XP_018565355.1; *Dendroctonus ponderosae*, XP_048524062.1; *Holotrichia oblita*, KAI4458810.1; *Zootermopsis nevadensis*, XP_021919879.1; *Cryptotermes secundus*, XP_023719209.1; *Periplaneta americana*, KAJ4450257.1; *Venturia canescens*, XP_043274285.1; *Solenopsis invicta*, XP_039310598.1; *Nomia melanderi*, XP_031834387.1.

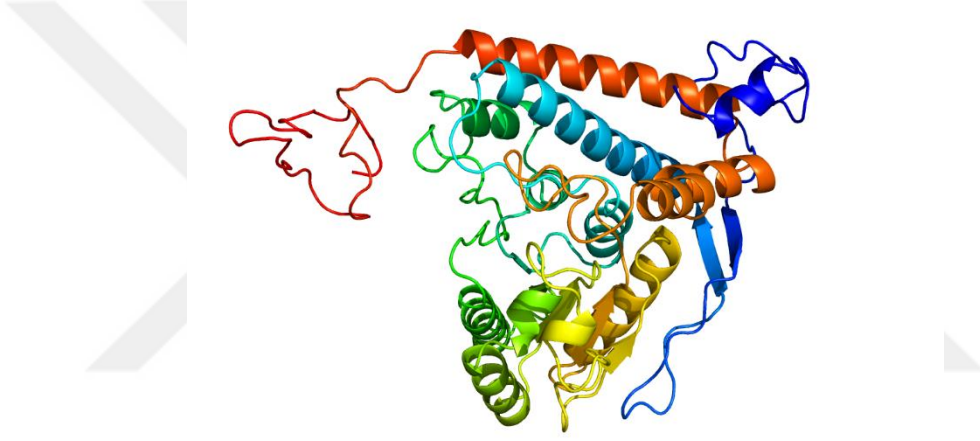
4.1.3. *TgPDH* geninin biyoinformatik ve filogenetik analizi

1673 nükleotit uzunluğundaki *TgPDH* geni 399 aminoasit kodlayan, 1200 nükleotit dizisi içeren bir açık okuma çerçevesine sahiptir. Tahmini aminoasit dizisi, *Caenorhabditis elegans* (P52899.1)'dan Pirüvat dehidrogenaz E1 komponent subunit alfa mitokondriyal ile %64.54 benzerlik göstermektedir. *TgPK*'nın teorik pI ve moleküler ağırlığı sırası ile 8.81 ve 43.822 kDa'dır. Tiamin pirofosfat enzim ailesine üye olan PDH geri dönüşümlü dekarboksilasyon da dâhil olmak üzere çeşitli reaksiyonları katalize etmek için kofaktör olarak kullanılan tiamin pirofosfat Şekil 4.7'de belirtilmiştir.

Ldecem_pdh	1	-----MTEAMSRFHPILTSLLTKTSSITHLRCMTCKAALS V FENHPY LHRISSP
Tmaden_pdh	1	-----MLKTFVKKVLMPRIFFKH-----FYSTE TFTEPFRLHRLDEGP
Aglabr_pdh	1	MLPFCARSVCSKYFRP-NKALGLIPK---N-----GYSTE TFETKPYRLHRLEQSP
Tgrana_pdh	1	MFQNCRNS-KKTLNPAQKILGLVPKVQS-----NYSTE VTFETKPFRLHKLEEGP
Ldecem_pdh	55	TT ELTRSDALFIYKNM SIRRMETVAASLYQOKII GFCHLYSGQEA AVGIKSVMKP
Tmaden_pdh	41	AT VTLTKPDALTIYD MQTIRKME AISKLYTAK IRGFCHLY GOEAVAVGI SNVR
Aglabr_pdh	49	TTVSLTKEDAVFYTQL TIRRMETTAGNLYKDKIVRGFCHLYSGQEAIAVGIRKALRP
Tgrana_pdh	51	ATATLTKEDA TFFTQLQT RRMETSAGNMYKDK RGFCHLYSGQEA VAVG KALRP
Ldecem_pdh	114	GDTVITSYRCHAWAL--MT EPLAIMESELVGKVTG SRGKGGSMMHIYNR FYGGNGIVG
Tmaden_pdh	101	NDVIVTSYRNHAWTLN NLDPS--FVCELMGHT GCSKGKGSMHMYGKNE GG GIVG
Aglabr_pdh	109	YDDVITAYRAHWTHI MGVP L GVLGELGKQSGCARGKGGSMMHYTD FYGGNGIVG
Tgrana_pdh	107	YDAV TAYRAHWTH--MG EPL GVLAELGRQSGCARGKGGSMMHYTKNFYGGNG V
Ldecem_pdh	172	AEVPLGTGVALSHKY INNSCISFVA GDGAMNGQV EAFN AKL NLP IYL ENNKY
Tmaden_pdh	160	AEVPLGAGVALSFKYKNE DGVAITVYGDGAANNGQVF EAFNIAKMWNLPCLFLCENNLFG
Aglabr_pdh	167	AEVPLGVGLAALAKYKGT DGVCVLYGDGAANQGQVF EYVYNMAKLWNIPCFVCENNGYG
Tgrana_pdh	161	AEVPLGVG AALKY GTDGVCTLYGDGAANQGQVF EYVYNMAKLWNVPC FVCENNGYG
Ldecem_pdh	232	MGTSLRHSANTDYYTRGDV IPGI LDGMDVLAVRE GKFAV H KTGKGPILLE IVTYR
Tmaden_pdh	220	MGTSLVERH AN DFYTRGDI PGIIWVDGMDVL MREAAKFA NHCISGKGPILLEAQTYR
Aglabr_pdh	227	MGTSAER SANT EYYTRGDY IPGI WVDGMDVLAVRE FRFAVD CASGKGPLVIEAATYR
Tgrana_pdh	219	MGTSAER SA T YSRGDY IPG VVDGMDV AVREA AKFAVN CASGKG P VLEATYR
Ldecem_pdh	292	YSGHSMSPDGT TYRTREEVKEVRDTRD IQFQDKILKTELAE EELKDIDNEVKR D
Tmaden_pdh	280	YSGHSMSPDGT SYRT EEVKEMRS RDPITNFK KILD KLVTDELKEIEN RKKTVD
Aglabr_pdh	287	YSGHSMSPDGT SYRTRDEIQEVRQTRDPVTSFKEKIVSSNLV ADEIKKIDGEIRALVD
Tgrana_pdh	276	YSGHSMSPDGT SYRTRDE IQEVRQTRDP TSFKEK--STNLVSADEVKK ESDVRAMVDE
Ldecem_pdh	352	AVDRAK KPEGLEEVTYDIY RD KAKVRMPSNR EEDHKNTVELKN--
Tmaden_pdh	340	AINKCKKDKEVGLEELTY IYSNDLYK IRGVSPF KLOHKVVGI----
Aglabr_pdh	347	ATKKCKTDKEIGLDEL GDVYS SLE KIRNV PFSHLVHKRIGPALNFK
Tgrana_pdh	332	ATKKAKADKE GLDELTD YSNNLE KRN SPFKELQHKRIGPATNV-

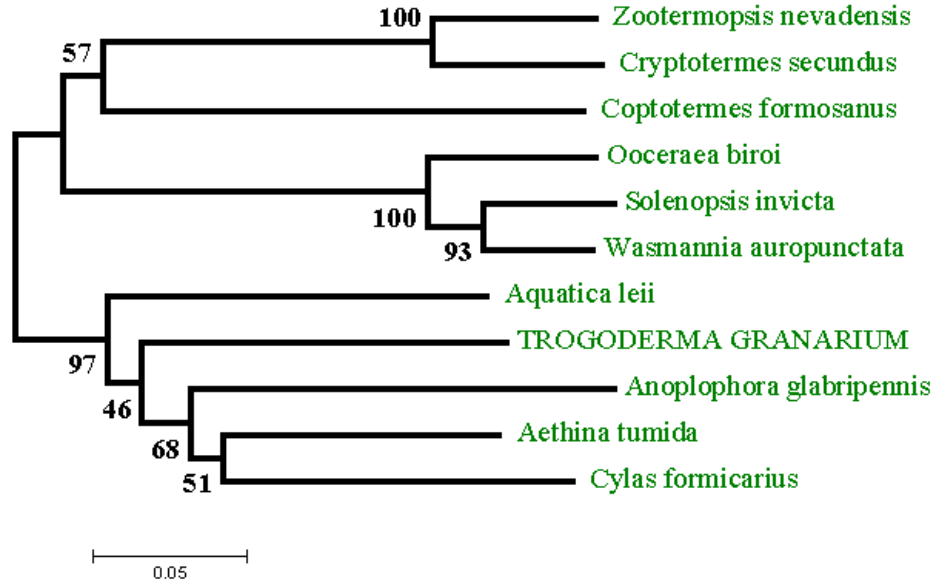
Şekil 4.7. *Leptinotarsa decemlineata* (XP_023024898.1), *Tribolium madens* (XP_044269622.1), *Anoplophora glaripennis* (XP_018577560.1) ve *Trogoderma granarium*'un MUSCLE aracı kullanılarak PDH aminoasit dizi hizalaması. Tiamin pirofosfat enzim ailesi korunmuş bölgesi (yeşil vurgu) ile belirtilmiştir.

Tahmini aminoasit dizisinin tahmini üç boyutlu protein yapısı %100 güven oranında %59 benzerlik ile d2ozla1 şablonu (PDB erişim no: 2ozl) kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. TgPDH'nin üç boyutlu tahmini protein yapısı.

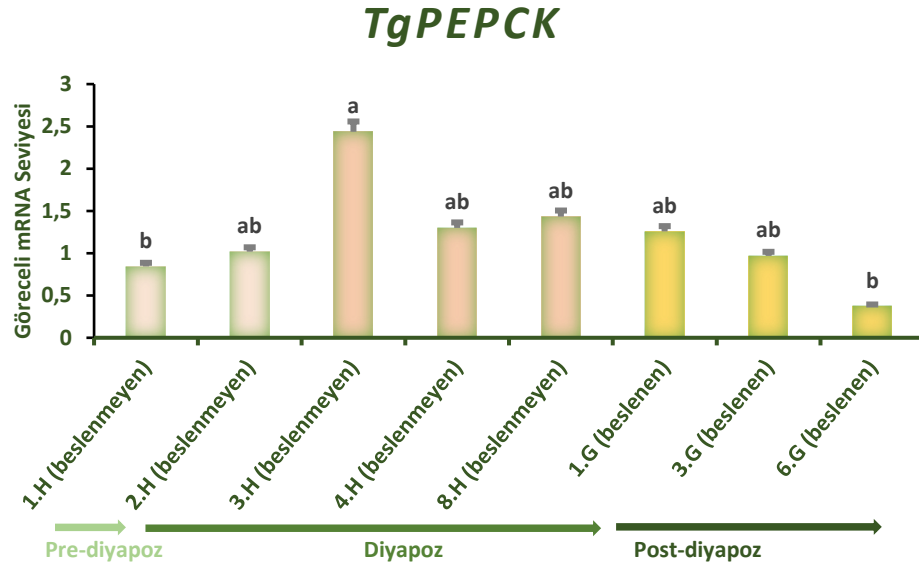
TgPDH amino asit dizisinin, diğer böcek PDH'leri ile hizalanması sonucu elde edilen filogenetik ağaçta, iki ana dal altında üç alt dal oluşmuştur. TgPDH Coleoptera takımına ait böceklerin PDH'leri ile aynı dal üzerinde kümelenmiştir. Diğer böcekler ise kendi taksonomisine uygun bir şekilde kümelenme göstermiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. 10 adet farklı böcekten elde edilen PDH’lardan oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik ağaçta kullanılan böceklerin isimleri ve Genbank accession numaraları: *Zootermopsis nevadensis*, XP_021928410.1; *Cryptotermes secundus*, XP_023721598.1; *Coptotermes formosanus*, GFG37618.1, *Ooceraea biroii*, XP_011330786.1, *Solenopsis invicta*, XP_039314332.1, *Wasmannia auropunctata*, XP_011696987.1, *Aquatica leii*, KAK4872795.1, *Anoplophora glabripennis*, XP_018577560.1; *Aethina tumida*, XP_049819838.1; *Cylas formicarius*, XP_060519481.1.

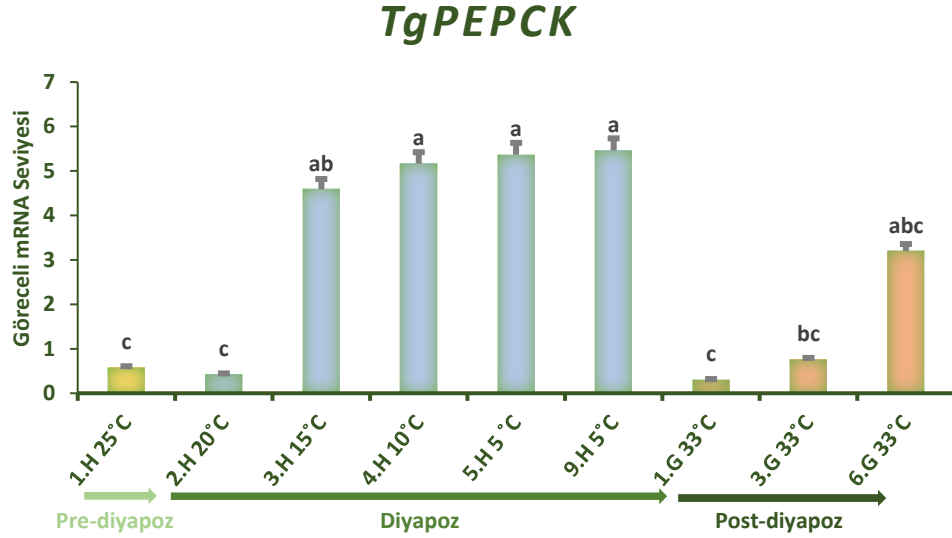
4.2. *TgPEPCK*, *TgPK* ve *TgPDH* genlerinin diyapozla ilişkili ifade seviyelerinin analizi

Trogoderma granarium’un açlık ile tetiklenen diyapozuna ilişkin gen ifade modelleri incelendiğinde, *TgPEPCK* geninin pre-diyapoz sürecinde aşağı yönde regüle olduğu görülmüştür. Açlığın üçüncü haftasında ise en yüksek ifade seviyesine rastlanmıştır. Bunu takip eden dördüncü, sekizinci haftalar ve post-diyapozun birinci gününde hafif seviyede yukarı yönde regüle olduğu görülmüştür. Birinci, ikinci hafta ve post-diyapozun üçüncü gününde ise ifade seviyesinin neredeyse değişmediği görülmüştür. Beslenme fazında olduğu post-diyapozun altıncı gününde ise yeniden aşağı yönde regüle olduğu görülmüştür (Şekil 4.10).



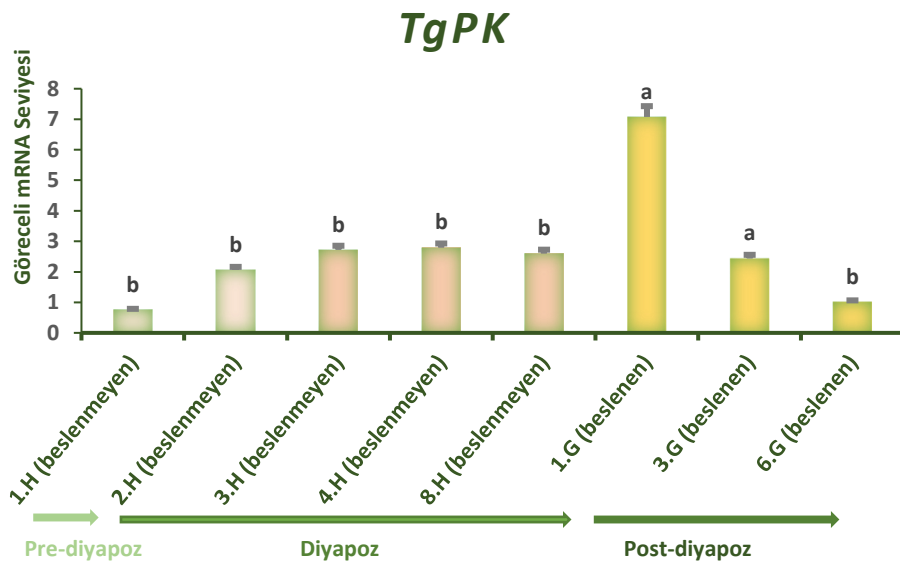
Şekil 4.10. *TgPEPCK*'nin açlık diyapozu süresince göreceli mRNA seviyeleri. Pre-diyapoz (1.H), Diyapoz (2.H, 3.H, 4.H, 5.H, 9.H) ve Post-diyapoz (1.G, 3.G ve 6.G).

Trogoderma granarium'un soğuk diyapozu örneklerinde *TgPEPCK* geninin en fazla dokuzuncu haftada 5 °C'de ifade edildiği gözlenmiştir. Üçüncü, dördüncü ve beşinci haftalarda da benzer seviyede (yaklaşık olarak beş kat fazla) yukarı yönde ifade edildiği gözlenmiştir. Bu gen için aşağı yönde regülasyona pre-diyapoz, ikinci hafta ve post-diyapozun ilk ve ikinci gün örneklerinde rastlanmıştır. Post-diyapozun altıncı gününde ise yaklaşık iki kat oranında ifade artışı gözlenmiştir (Şekil 4.11).



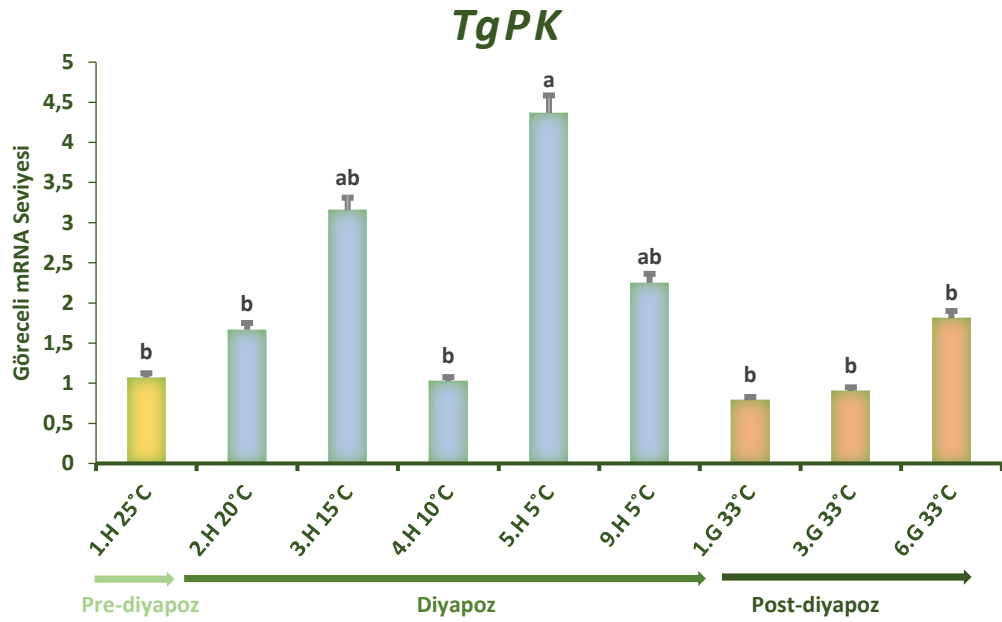
Şekil 4.11. *TgPEPCK*'nın soğuk diyapozu süresince göreceli mRNA seviyeleri. Pre-diyapoz (1.H 25 °C), Diapoz (2.H 20 °C, 3.H 15 °C, 4.H 10 °C, 5.H 5 °C, 9.H 5 °C) ve Post-diyapoz (1.G 33 °C, 3.G 33 °C ve 6.G 33 °C).

Trogoderma granarium'un açlık diyapozu örneklerinde, *TgPK* geni en fazla (yaklaşık yedi kat) post-diyapozun birinci gününde ifade edilmiştir. Bu fazın üçüncü günü yukarı yönde regüle olurken, altıncı günü ise ifade seviyesinin değişmediği gözlenmiştir. Açlığın ikinci, üçüncü, dördüncü ve sekizinci haftalarında yukarı yönde regülasyon görülürken (yaklaşık 2 kat), pre-diyapoz fazının ilk haftasında ise aşağı yönde regüle olmuştur (Şekil 4.12).



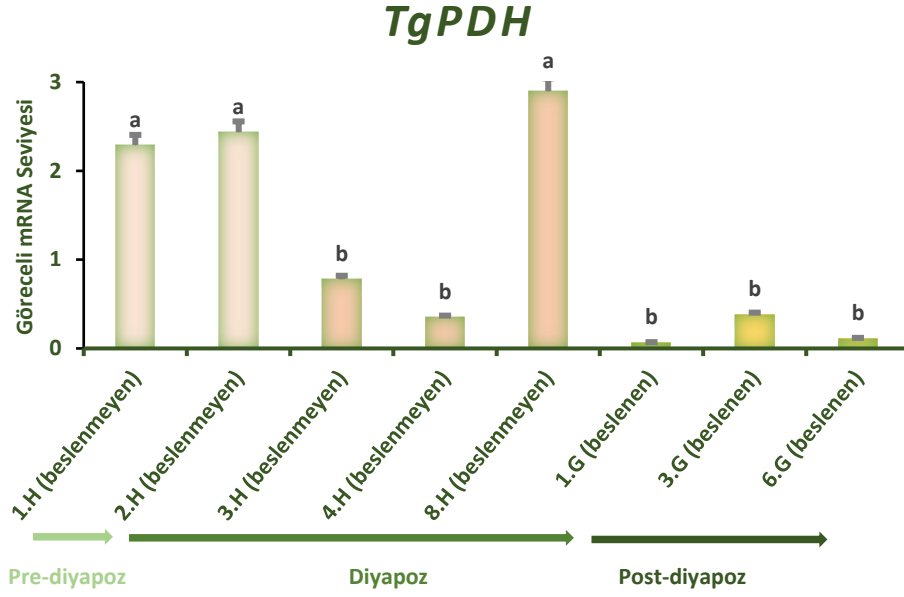
Şekil 4.12. *TgPK*'nın açlık diyapozu süresince göreceli mRNA seviyeleri. Pre-diyapoz (1.H), Diapoz (2.H, 3.H, 4.H, 5.H, 9.H) ve Post-diyapoz (1.G, 3.G ve 6.G).

Soğuk diyapozu örneklerinde *TgPK* geninin, en yüksek seviyede ifade edildiği fazın, diyapozun beşinci haftasında olduğu gözlenmiştir (yaklaşık 4,5 kat). Bunu sırası ile diyapozun üçüncü, dokuzuncu, ikinci ve dördüncü haftaları izlemiştir. Genin pre-diyapoz ile post-diyapozun birinci hafta ve üçüncü günlerinde nerdeyse hiç ifade edilmediği görülürken, post-diyapozun altıncı gününde yukarı yönde regülasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



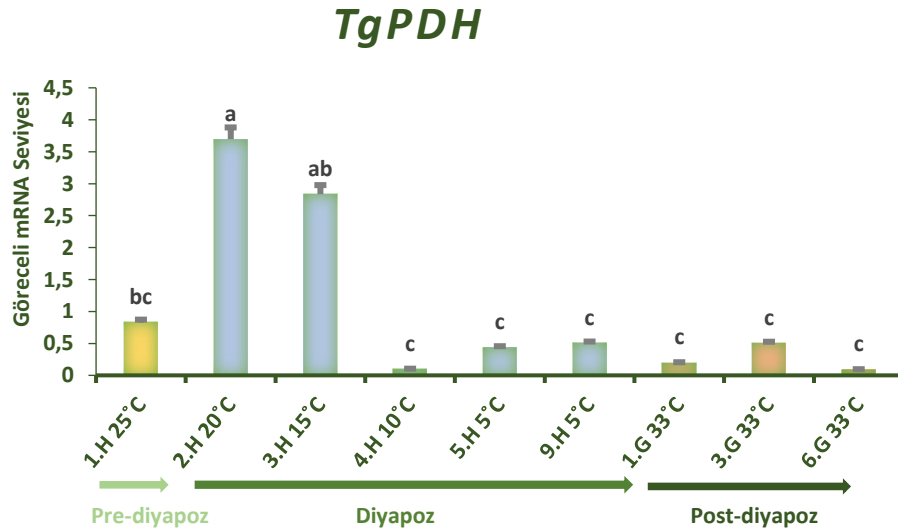
Şekil 4.13. *TgPK*'nın soğuk diyapozu süresince göreceli mRNA seviyeleri. Pre-diyapoz (1.H 25 °C), Diapoz (2.H 20 °C, 3.H 15 °C, 4.H 10 °C, 5.H 5 °C, 9.H 5 °C) ve Post-diyapoz (1.G 33 °C, 3.G 33 °C ve 6.G 33 °C).

TgPDH geninin açlık uygulamasının sekizinci haftasında diyapoz fazında iken, en yüksek seviyede ifade edildiği görülmüştür. Bu ifadeyi sırası ile pre-diyapoz fazı örnekleri takip etmiştir. *TgPDH* geninin diyapozun üçüncü ve dördüncü haftaları ile post-diyapoz fazı boyunca aşağı yönde regüle olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *TgPDH*'nin açlık diyapozu süresince göreceli mRNA seviyeleri. Pre-diyapoz (1.H), Diapoz (2.H, 3.H, 4.H, 5.H, 9.H) ve Post-diyapoz (1.G, 3.G ve 6.G).

TgPDH geninin soğuk diyapozundaki ifade seviyesi izlendiğinde, en yüksek ifadeler diyapoz başlangıcı olan ikinci (20 °C) ve üçüncü haftalarda (15 °C) rastlanmıştır. Uygulamanın dördüncü, beşinci ve dokuzuncu haftaları ile pre-diyapoz ve post-diyapoz fazlarında ise aşağı yönde ifade edildiği gözlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *TgPDH*'nin soğuk diyapozu süresince göreceli mRNA seviyeleri. Pre-diyapoz (1.H 25 °C), Diapoz (2.H 20 °C, 3.H 15 °C, 4.H 10 °C, 5.H 5 °C, 9.H 5 °C) ve Post-diyapoz (1.G 33 °C, 3.G 33 °C ve 6.G 33 °C).

Diyapoz, statik değildir. Fizyolojik olarak dinamik olan diyapoz süresince farklı stratejiler kullanılır. Hücresel olayların ve biyokimyasal yolların diyapoz sürecinde nasıl korunduğu ve hangi genlerin diyapoza spesifik olduğu birçok böcekte henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Ragland ve ark., 2010). Bu konudaki araştırmalar, diyapozun karmaşık doğasını ve böceklerin bu duruma nasıl adapte olduğunu anlamada önemli katkılar sağlamaktadır.

Metabolizma, diyapoza giren canlılardaki en önemli genetik ve biyokimyasal karakterlerden biridir (Yocum ve ark., 2015). Diyapoza giren bir canlı stres koşulları altında iken metabolik açıdan kendini koruma altına almaya gerek duyar. Bunu aerobik (oksijenli) metabolizmadan anaerobik (oksijensiz) metabolizmaya yönelerek ve glikoliz ile glukoneogenez yolağını kullanarak gerçekleştirebilmektedir. Glukoneogenezde hız sınırlayıcı olarak görev alan ve kilit bir enzim olan PEPCCK bu noktada oldukça önemlidir (Poelchau ve ark., 2013b). *Sarcophaga crassipallıs* ile yapılan bir çalışmada diyapoz pupalarının diyapozda olmayan pupalara göre önemli ölçüde glikoliz ve glukoneogenez geçirdiği görülmüştür. Transkriptomik ve metabolomik araştırmalar neticesinde TCA döngüsünde görev alan birkaç önemli enzimde transkripsiyon artışının olduğu gözlenmiştir (Ragland ve ark., 2010). *Delia antiqua* ile yapılan bir çalışmada yaz diyapozu geçiren bu böceğin diyapoz fazında iken *PEPCCK* geninin önemli oranda arttığı rapor edilmiştir (Hao ve ark., 2016). *Wyeomyia smithii* bir sivrisinek türüdür ve larval diyapoza girmektedir. Bu canlı larvasının diyapozu sonlandıracağı sırada, erken transkripsiyonel gen ifadelerini ortaya koymak amacıyla mikarray çalışması yapılmıştır. Sonuç olarak metabolizmanın glukoneogenez sürecine yöneldiği diyapoz fazında *PEPCCK* geninin yüksek oranda ifade edildiği ortaya koyulmuştur (Emerson ve ark., 2010). Spatch ve ark. (2018), *Sarcophaga bullata*’da iki adet *PEPCCK* izoformuna ait transkriptleri klonlamış ve bunların ifadesinin gelişim boyunca değiştiğini gözlemlemişlerdir. Diyapoza giren pupalar, her iki izoformun en yüksek göreceli ifadesini göstermiş; bu da bu genlerin kışlama aşaması sırasında şekerlerin ve şeker alkollerinin önceden üretimine katılımlarını düşündürmüştür. Benzer şekilde, bu tez çalışmasında açlık ve soğuk diyapozu sırasında *TgPEPCCK*’nın yüksek miktarda ifade olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, Spatch ve ark. (2018) bulgularıyla uyumludur ve *TgPEPCCK*’nın açlıkla indüklenmiş diyapoz fazında kapra böceğini enerji tasarrufu ve stres direncine hazırlama sürecinde görev alabildiğini akıllara getirmektedir. Aynı zamanda açlığın neden olduğu diyapozun ardından post-diyapoz fazında *TgPEPCCK*’nin

ifade seviyesinde önemli bir düşüş olduğu da gözlenmektedir. Bu azalma, diyapoz aşaması sona erdiğinde organizmanın metabolik ihtiyaçlarında ve önceliklerinde bir değişiklik olduğunu göstermektedir. Diyapoz fazındaki yukarı regülasyon, enerji depolamayı ve organizmanın devamlılığını desteklerken, post-diyapoz fazını müteakip aşağı regülasyon, organizmanın uyku halinden çıkıp normal gelişime devam ederken aktif metabolizmaya ve enerji kullanımına doğru yaptığı geçişi yansıtabilir. Ayrıca, Spatch ve ark. (2018), 24 saatlik açlığa yanıt olarak *PEPCK* geninin sitozolik izoformunun yukarı yönde regüle edildiğini ve 24 saati takip eden iyileşme ile beraber, kontrol seviyelerine geri döndüğünü bildirmiştir. Açlık diyapoz fazı süresince *TgPEPCK* geninin aşırı ifadesi, *Sarcophaga bullata* *PEPCK*'sinin açlık koşulları altında iken yukarı yönde regülasyon göstermesi ile tutarlıdır. Bu durum, *TgPEPCK*'nin glukoneojenezi arttırmak için yukarı yönde regüle edildiği ve böylece besin mevcudiyetinin düşük olduğu dönemlerde enerji üretimini desteklediğini akla getirmektedir. Böylece hem açlığın hem de diyapozun, enerji tasarrufu ve stres direncini amaçlayan benzer metabolik tepkileri tetiklediği fikrini desteklemektedir.

Birçok organizmanın çevresel koşullar uygun olmadığı durumlarda hayatta kalmak için kullandığı diyapoz gibi süreçler, metabolizma hızının düşmesini sağlamaktadır. Bu stratejinin önemli miktarda enerji tasarrufu sağladığı ve hücrel dengeyi korumak için karmaşık bir metabolik ayarlama gerektirdiği vurgulanmaktadır (Brooks ve Storey, 1992; Brooks ve Storey, 1997). Aynı zamanda organizmalar diyapoza hazırlanırken, stres koşullarında hayatta kalmak için çok önemli olan glikoz ve piruvat gibi molekülleri yüksek oranlarda sentezlerler. Açlık diyapozu sırasında, *TgPK* ekspresyonu ikinci, üçüncü, dördüncü ve sekizinci haftalarda yukarı doğru düzenlenmiştir. Bu model, *Leptinotarsa decemlineata*'da diyapoz girişinde gözlemlenen glikoz sentezindeki artışa benzer şekilde, diyapoz sırasında enerji tasarrufu ve stres direnci ihtiyacıyla uyumludur (Lefevre ve ark., 1989). *Trogoderma granarium*'da *TgPK* geni, post-diyapoz fazının ilk gününde en yüksek ifadeyi göstermiştir; bu da post-diyapoz gelişimi sürecindeki iyileşme ile alakalı olduğuna işaret edebilir. Glikoz ve piruvat aynı zamanda donmayı önleyen kriyoprotektanların üretiminde de gereklidir (Kukal ve ark, 1991; Michaud ve ark, 2007). *Leptinotarsa decemlineata* gibi böceklerde diyapoz sırasında glikoz sentezinin yukarı doğru düzenlendiği bulunmuştur (Lefevre ve ark., 1989). Piruvat ise hazır bir enerji kaynağı olarak hizmet etmektedir (Kageyama ve Ohnishi, 1971). Kapra böceğinde soğuk ile indüklenmiş diyapoz örneklerinde *TgPK* geni,

diyapozun beşinci haftasında en yüksek ifadesini sergilemiş, bu da *TgPK* geninin enerji yönetimindeki rolünü göstermektedir. Bu genin pre-diyapoz fazı ve post-diyapozun üçüncü günlerindeki minimal ifadesi ve ayrıca post-diyapoz fazının altıncı gündeki yukarı yönde regülasyonu, bu genin stres adaptasyonuna katılımını desteklemektedir. *Eurosta solidaginis* ile yapılan bir çalışmada PK enziminin soğuk stres koşuluna karşı donmayı önlemek için metabolik hızı düşürdüğü ve poliols kriyoprotektanların birikimini sağlayarak canlının tüm vücut donmasına dayanıklılığını artırdığı izlenmiştir. Bunun için fosforilasyon ile inaktif hale gelen PK, uzun süreli anaerobik karbonhidrat metabolizmasının çalışmasına olanak sağlamıştır (Abboud ve ark. 2021). *Trogoderma granarium*'da *TgPK* geninin diyapoz sırasında farklı ifade seviyeleri, açlık ve soğuk diyapoz koşullarına adaptasyonu yansıtır. Açlık diyapozunda *TgPK*, enerji üretimini ve metabolik süreçleri desteklemek için yukarı yönde regüle edilirken, soğuk diyapozunda enerji üretiminin ve metabolik aktivitelerin korunması için genin yüksek seviyede ifade edildiği görülmektedir. Bu durum, *T. granarium*'un farklı çevresel koşullara uyum sağlamak için *TgPK* enzim aktivitesini nasıl düzenlediğini gösterir.

Trogoderma granarium'da *TgPDH* geni, açlık diyapozunun sekizinci haftasında en yüksek ifadesini göstermiştir; bu durum, bu faz sırasında enerji metabolizmasının korunmasında kritik bir role sahip olabileceğine işaret ediyor. Gen ayrıca pre-diyapoz aşamalarında enerji tasarrufu ve stres direncine uygun olarak yukarı doğru düzenlenmiştir. Soğuk diyapozu sırasında, *TgPDH* ikinci ve üçüncü haftalarda yüksek düzeyde ifade edilmiştir; bu da diyapozun başlangıcında bir enerji talebi olduğunu akla getirmektedir. Bununla birlikte, soğuk diyapozunun üçüncü ve dördüncü haftalarında ve diyapoz sonrası aşamada aşağı yönde regüle edilmiştir, bu durum enerji tasarrufu modlarına geçişi yansıtabilir. Bu aşağı regülasyon, glikoliz ve glukoneogenez gibi yolların sıkı bir şekilde düzenlendiği ve sıklıkla enzimlerin geri dönüşümlü fosforilasyonunu içeren daha geniş metabolik baskılama stratejisiyle uyumludur. Enerji metabolizmasındaki enzimler, diyapoz koşulları altında deniz yumuşakçası *Eurosta solidaginis* dâhil olmak üzere çeşitli türlerde görüldüğü gibi metabolik hızları ayarlamak için geri dönüşümlü fosforilasyona uğrar (Storey ve Storey, 1990; Storey, 1993; Storey, 1996; Storey ve Storey, 2004). *Sarcophaga crassipalpis* ile yapılan bir çalışmada, reaktif oksijen türleri (ROS)'nin hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörü (HIF) ve adenosin 5'-monofosfatla aktive olan protein kinaz (AMPK) fosforilasyonunu düzenleyerek, PDH ve karnitin palmitoiltransferaz I (CPT1) gibi iki önemli metabolik

enzimin aktivitesinde değişikliklere yol açtığını gözlenmiştir. Çalışma, ROS sinyallemesinin böcek diyapozunda periyodik uyarımı düzenlediğini göstermektedir ve bu da ROS'un diyapoz ve memeli kış uykusu süreçlerinde glikoliz ve glukoneogenez gibi metabolik döngü tiplerini düzenlemede de olası önemini göstermektedir. Bu sonuçlar ışığında, böceklerdeki metabolik döngülerin, memeli kış uykusundaki gibi, ROS sinyallemesi ve PDH aktivitesi aracılığıyla düzenlendiği düşünülmüştür (Chen ve ark., 2021). Yaptığımız tez çalışmasında *TgPDH* gen ifadesinin açlık ve soğuk diyapozu sırasında artan ve azalan ifade seviyeleri böceğin enerji yönetimi ve hayatta kalma stratejileri hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. *Trogoderma granarium*'un diyapozda enerji tasarrufu ve yeniden enerji üretimi arasında denge kurmasına yardımcı olduğu anlaşılmaktadır. *TgPDH* geninin, diyapoz sürecinde ve sonrasında enerji dengesini korumak için kritik öneme sahip olabileceği düşünülmektedir. Ancak bugüne kadar diyapozdaki böceklerde *PK* ve *PDH* üzerine detaylı bir çalışmanın yapılmadığı göz önünde bulundurulmalıdır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Yaşamın devam edebilmesi için gıda gereksiniminin karşılanabilmesi en önemli konulardan biridir. Artan nüfusla birlikte depolanan ürünlere olan talep artmakta ve bu ürünlerin korunması oldukça önemli bir hale gelmektedir. *Trogoderma granarium* depolananmış tahıl ürünlerine zarar vermekle kalmayıp, açlık durumunda besin kaynağı skalasını genişletebilen, diyapoza girerek insektisitlere karşı direncini koruyan, uygun ortam koşullarına sahip olmadığı durumlarda sekiz yıla varan süre ile diyapozda kalabilen bir böcektir. Bu fakültatif diyapoz durumu, kapra böceği ile mücadeleyi oldukça zor bir duruma sokmakla kalmayıp, aynı zamanda böceğin uygulanan insektisitlere karşı duyarsız kalmasına neden olmaktadır. Dolayısı ile bu böceğin çeşitli yollarla indüklenmiş diyapoz durumlarında, hayatta kalmasına yardımcı olan genlerin aşağı ve yukarı yönde regülasyonlarının moleküler düzeyde incelenebilmesi bir ihtiyaç haline gelmiştir.

Bu tez çalışmasında kapra böceğinin açlık ve soğuk ile indüklenen diyapozunda *TgPEPCK*, *TgPK* ve *TgPDH* genlerinin ifade seviyeleri analiz edilmiştir. Diyapozun farklı fazlarında incelenen bu genler metabolik yollaklarda etkin olarak görev alan genlerdir. Diyapozdaki böcekte bu genlerin moleküler seviyede işleyişine dair önemli bilgiler elde edilmiştir.

5.2 Öneriler

Bu çalışmanın devamı niteliğinde, metabolik yollaklarda aktif rol üstlenen başka gen grupları da çalışılarak diyapozun aydınlatılmayan genetik ve metabolik alt yapısı tanskripsiyon seviyesine ortaya koyulabilir. İleri moleküler yöntemler kullanılarak, araştırılan genlerin fonksiyonel özellikleri hakkında daha ayrıntılı bilgiye sahip olunabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abboud, J., Green, S. R., Smolinski, M. B. ve Storey, K. B. (2021). Regulation of an important glycolytic enzyme, pyruvate kinase, through phosphorylation in the larvae of A species of freeze-tolerant insect, *Eurosta solidaginis*. *Insect Molecular Biology*, 30(2), 176-187.
- Abdel-Kawy, F. K. (1999). Effect of gamma-irradiation on some biological activities of the larval stage of the khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Col., Dermestidae). *J. Appl. Ent* (C. 123).
- Ahmedani, M. S., Khaliq, A., Tariq, M., Anwar, M. ve Naz, S. (2007). Khapra beetle (*Trogoderma granarium* Everts): a serious threat to food security and safety. *Pak. J. Agri. Sci* (C. 44).
- Ahmedani, M. S., Haque, M. I., Afzal, S. N., Aslam, M. ve Naz, S. (2009). Varietal changes in nutritional composition of wheat kernel (*Triticum aestivum* L.) caused by khapra beetle infestation. *Pak. J. Bot* (C. 41).
- Almadiy, A. A., Nenaah, G. E. ve Shower, D. M. (2018). Facile synthesis of silver nanoparticles using harmala alkaloids and their insecticidal and growth inhibitory activities against the khapra beetle. *Journal of Pest Science*, 91(2), 727-737.
- Almadiy, A. ve Nenaah, G. (2022). Chemical Profile, Bioactivity, and Biosafety Evaluations of Essential Oils and Main Terpenes of Two Plant Species against *Trogoderma granarium*. *Agronomy*, 12(12).
- Amaar, M. I., & El-Refai, S. A. (2015). Effect of freezing, high temperature and laser radiation for controlling khapra beetle, *Trogoderma granarium* (Everts), on wheat grains. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 93(4), 1069-1084.
- Andrewartha, H. G. (1952). Diapause in relation to the ecology of insects. *Biological Reviews*, 27(1), 50-107.
- Arrow, G. J. (1917). XLVII.—The Khapra beetle (*Trogoderma khapra*, sp. n.), an Indian Grain-pest. *Journal of Natural History*, 19(114), 481-482.
- Arthur, Frank H. (1997). Differential Effectiveness of Deltamethrin Dust on Plywood, Concrete, and Tile Surfaces Against Three Stored-product Beetles. *J. stored Prod. Res* (C. 33).
- Arthur, F. H., Ghimire, M. N., Myers, S. W. ve Phillips, T. W. (2018). Evaluation of pyrethroid insecticides and insect growth regulators applied to different surfaces for control of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) the khapra beetle. *Journal of Economic Entomology*, 111(2), 612-619. doi:10.1093/jee/toy040
- Arthur, Frank H., Domingue, M. J., Scheff, D. S. ve Myers, S. W. (2019). Bioassays and methodologies for insecticide tests with larvae of *Trogoderma granarium* (Everts), the khapra beetle. *Insects*, 10(5).

- Arthur, Frank H., Athanassiou, C. G. ve Robert Morrison, W. (2020). Mobility of stored product beetles after exposure to a combination insecticide containing deltamethrin, methoprene, and a piperonyl butoxide synergist depends on species, concentration, and exposure time. *Insects*, 11(3).
- Athanassiou, C. G., Phillips, T. W., Aikins, M. J., Hasan, M. M. ve Throne, J. E. (2012). Effectiveness of sulfuryl fluoride for control of different life stages of stored-product psocids (Psocoptera). *Journal of Economic Entomology*, 105(1), 282-287.
- Athanassiou, C. G., Hasan, M. M., Phillips, T. W., Aikins, M. J. ve Throne, J. E. (2015). Efficacy of Methyl Bromide for Control of Different Life Stages of Stored-Product Psocids. *Journal of Economic Entomology*, 108(3), 1422-1428.
- 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.
- Athanassiou, C. (2023). *Trogoderma granarium* (khapra beetle).
- Banks, H. J. (1977). Distribution and establishment of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae): climatic and other influences. *Prod. Res* (C. 13). Pergamon Press.
- Banks, H. J. ve Cavanaugh, J. A. (1985). Toxicity of phosphine to *Trogoderma variabile ballion* (Coleoptera: Dermestidae). *Australian Journal of Entomology*, 24(3), 179-185.
- Barak, A. V. (1989). Development of a New Trap to Detect and Monitor Khapra Beetle (Coleoptera: Dermestidae). *J. Econ. Entomol* (C. 82).
- Beck, S. D. (1962). Photoperiodic Induction of Diapause in an Insect. *Bulletin* (C. 122).
- Bell, C H, Wilson, S. M. ve Banks, H. J. (1984). Everts (Coleoptera: Dermestidae). *J. stored Prod. Res* (C. 20).
- Bell, Christopher H, Hole, B. D. ve Clifton, A. L. (1988). The Toxicity of Mixtures of Methyl Bromide and Methyl Chloroform to Stored Product Insects. *J. stored Prod. Res* (C. 24).
- Bell, C H. (1994). A Review of Diapause in Stored-product Insects. *J. stored Prod. Res* (C. 30).
- Bell, C H ve Wilson, S. M. (1995). Tolerance and resistance in *T. granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). *J. stored Prod. Res* (C. 31).
- Bell, C. H. (2014). A review of insect responses to variations encountered in the managed storage environment. *Journal of Stored Products Research*. Elsevier Ltd.
- Bodner, G. M. (1986). Metabolism Part II. The Tricarboxylic Acid (TCA), Citric Acid, or Krebs Cycle (C. 63).

- Borzoui, E., Naseri, B. ve Rahimi Namin, F. (2015). Different diets affecting biology and digestive physiology of the Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Stored Products Research*, 62, 1-7.
- Bowen, M. F., Bollenbacher, W. E. ve Gilbert, L. I. (1984). In vitro studies on the role of the brain and prothoracic glands in the pupal diapause of *Manduca sexta*. *J. exp. Biol* (C. 108).
- Bradfield, J. Y. ve Denlinger, D. L. (1980). Diapause Development in the Tobacco Hornworm: A Role for Ecdysone or Juvenile Hormone? *General and comparative endocrinology* (C. 41).
- Bradshaw, W. E. ve Philip, L. (1977). Evolution of Dormancy and its Photoperiodic Control in Pitcher-Plant Mosquitoes. *Lounibos Source: Evolution* (C. 31).
- Brooks, S. P., & Storey, K. B. (1992). Properties of pyruvate dehydrogenase from the land snail, *Otala lactea*: control of enzyme activity during estivation. *Physiological Zoology*, 65(3), 620-633.
- Brooks', S. P. J. ve Storey, K. B. (1997). Glycolytic Controls in Estivation and Anoxia: A Comparison of Metabolic Arrest in Land and Marine Molluscs. *Camp. Riochem. Physiol* (C. 118).
- Brown, G. K., Otero, L. J., LeGris, M., & Brown, R. M. (1994). Pyruvate dehydrogenase deficiency. *Journal of Medical Genetics*, 31(11), 875.
- Burges, D. H. (1951). Diapause, pest status and control of the Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts. *Proceedings of the Association of Applied Biologists Circ. US. Dep. Agric* (C. 32).
- Burges, H. D. (1959). Dormancy of the khapra beetle: quiescence or diapause. *Nature*, 184(4700), 1741-1742.
- Burges, H. D. (1960). Studies on the Dermestid beetle *Trogoderma granarium* Everts—IV. Feeding, growth, and respiration with particular reference to diapause larvae. *Journal of Insect Physiology*, 5(3-4), 317-334.
- Burges, D.H., 1962. Diapause, pest status and control of the Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts. *Ann. Appl. Biol.* 50 (3), 614–617. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7348.1962.TB06059.X>.
- Burges H. D. (1963) Studies on the dermestid beetle *Trogoderma granarium* Everts -VI. Factors inducing diapause. *Bulletin of Entomological Research*, 54, 571-587.
- Burges, H. D. (2008). Development of the khapra beetle, *Trogoderma granarium*, in the lower part of its temperature range. *Journal of Stored Products Research*, 44(1), 32-35.
- Chen, Q., Enbo, M. A., Behar, K. L., Xu, T. ve Haddad, G. G. (2002). Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5), 3274-3279.

- Chen, C., Mahar, R., Merritt, M. E., Denlinger, D. L., & Hahn, D. A. (2021). ROS and hypoxia signaling regulate periodic metabolic arousal during insect dormancy to coordinate glucose, amino acid, and lipid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(1), e2017603118.
- Collins, P. J. ve Sinclair, E. R. (1988). Dispersion of Grain Beetles (Coleoptera) in Grain Partially Treated with Insecticide. *J. Econ. Entomol* (C. 81).
- Croniger, C. M., Chakravarty, K., Olswang, Y., Cassuto, H., Reshef, L. ve Hanson, R. W. (2002). Phosphoenolpyruvate carboxykinase revisited: II. Control of PEPCK-C gene expression. *Biochemistry and Molecular Biology Education*.
- Çoban, F. N. (2022). *Trogoderma granarium*'da ısı şok proteinlerinin gen ifade düzeylerinin belirlenmesi (Doctoral dissertation, Necmettin Erbakan University (Turkey)).
- da Silva, R. M., Vital, W. O., da Fonseca, R. N., Martins, Y. P. M., Lemos, F. J. A., da Silva Vaz, I. ve Logullo, C. (2019). Hypometabolic strategy and glucose metabolism maintenance of *Aedes aegypti* egg desiccation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part-B: Biochemistry and Molecular Biology*, 227, 56-63.
- da Silva, R. M., Vital, W. O., Martins, R. S., Moraes, J., Gomes, H., Calixto, C., Logullo, C. (2021). Differential expression of PEPCK isoforms is correlated to *Aedes aegypti* oogenesis and embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part-B: Biochemistry and Molecular Biology*, 256.
- Dageri, A., Öğreten, A. and Güz, N., 2022, Depo Zararlısı *Trogoderma granarium*'da Karşılaştırmalı Transkriptom Analizi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü.
- Dageri, A., Kadir, M. L., Guz, N., Ogreten, A. ve Arshad, M. (2023). The involvement of Antifreeze protein maxi-like and Cold-shock domain-containing protein genes in cold-induced larval diapause and cold-shock treatment of khapra beetle. *Journal of Stored Products Research*, 101.
- Dageri, A. (2024). Molecular characterization and expression analysis of six small heat shock protein genes in *Trogoderma granarium* during cold and starvation-induced larval diapause. *Journal of Stored Products Research*, 108, 102368.
- Danks, Hugh V. (2002). The range of insect dormancy responses. *European Journal of Entomology*, 99(2), 127-142.
- Danks, Hugh V. (2003). Studying insect photoperiodism and rhythmicity: Components, approaches and lessons. *European Journal of Entomology*, 100(2), 209-221.
- Danks, H. V. (2005). How similar are daily and seasonal biological clocks? *Journal of Insect Physiology* içinde (C. 51, ss. 609-619). Elsevier Ltd.
- Day, C. ve White, B. (2016). Khapra beetle, *Trogoderma granarium* interceptions and eradications in Australia and around the world Water Sensitive Cities: economic

modelling and analysis View project Valuing Western Australian Apiary Sites. (Honey Bee Product CRC) View Project.

- Denlinger, D. L., & Bradfield IV, J. Y. (1981). Duration of pupal diapause in the tobacco hornworm is determined by number of short days received by the larva. *Journal of Experimental Biology*, 91(1), 331-337.
- Denlinger, D. L. (1991). Relationship between cold hardiness and diapause. In *Insects at low temperature*. (174-198). Boston, MA: Springer US.
- Denlinger, D. L., Lee Jr, R. E., Yocum, G. D., & Kukal, O. (1992). Role of chilling in the acquisition of cold tolerance and the capacitation to express stress proteins in diapausing pharate larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 21(4), 271-280.
- Denlinger, D. L., Giebultowicz, J., & Saunders, D. S. (Eds.). (2001). *Insect timing: circadian rhythmicity to seasonality*. Gulf Professional Publishing.
- Denlinger, D. L. (2002). Regulation of diapause. *Annual review of entomology*, 47(1), 93-122.
- Denlinger, D. L. ve Armbruster, P. A. (2016). Molecular physiology of mosquito diapause. *Advances in Insect Physiology* içinde (C. 51, ss. 329-361). Academic Press Inc.
- Devlin, P. F., & Kay, S. A. (2001). Circadian photoperception. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 677-694.
- Dick, K. M. (1987). Pest management in stored groundnuts.
- Domingue, M. J., Scheff, D. S., Arthur, F. H. ve Myers, S. W. (2021). Sublethal exposure of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) to insecticide-treated netting alters thigmotactic arrestment and olfactory-mediated anemotaxis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 171.
- Emerson, K. J., Bradshaw, W. E. ve Holzapfel, C. M. (2010). Microarrays reveal early transcriptional events during the termination of larval diapause in natural populations of the mosquito, *Wyeomyia smithii*. *PLoS ONE*, 5(3).
- Çelik, (2011). Farklı besinlerin *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae)'un larva ve ergininin yağ asidi içeriğine etkileri. (Yüksek lisans tezi Biyoloji Anabilim Dalı Diyarbakır).
- Erkut, C. ve Kurzchalia, T. v. (2015). The *C. elegans* dauer larva as a paradigm to study metabolic suppression and desiccation tolerance. *Planta*. Springer Verlag.
- Exton, J. H. (1972). Gluconeogenesis. *Metabolism*, 21(10), 945-990.
- Feng, Q.-L., Ladd, T. R., Retnakaran, A., Davey, K. G. ve Palli, S. R. (1998). Identification and developmental expression of the mitochondrial phosphate transport protein gene from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (C. 28).

- Feroz, A., Shakoori, F. R., Riaz, T. ve Shakoori, A. R. (2020). Development of resistance in stored grain pest, *Trogoderma granarium* (Everts) against deltamethrin and its effective control by synergistic toxicity of bifenthrin and chlorpyrifos. *Journal of Stored Products Research*, 88.
- 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.
- Fukuda, S., & Takeuchi, S. (1967). Diapause factor-producing cells in the suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Proceedings of the Japan Academy*, 43(1), 51-56.
- Furui, S., Miyanoshita, A., Imamura, T., Minegishi, Y. ve Kokutani, R. (2019). Qualitative real-time PCR identification of the khapra beetle, *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). *Applied Entomology and Zoology*, 54(1), 101-107.
- Ghimire, M. N., Arthur, F. H., Myers, S. W. ve Phillips, T. W. (2016). Residual efficacy of deltamethrin and β -cyfluthrin against *Trogoderma variable* and *Trogoderma inclusum* (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Stored Products Research*, 66, 6-11.
- Ghimire, M. N., Myers, S. W., Arthur, F. H. ve 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.
- Giebultowicz, J. M., & Denlinger, D. L. (1986). Role of the brain and ring gland in regulation of pupal diapause in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of insect physiology*, 32(2), 161-166.
- Gourgouta, M., Agrafioti, P. ve Athanassiou, C. G. (2021). Insecticidal effect of phosphine for the control of different life stages of the khapra beetle, *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). *Crop Protection*, 140.
- Guedes, R. N. C., Campbell, J. F., Arthur, F. H., Opit, G. P., Zhu, K. Y. ve Throne, J. E. (2008). Acute lethal and behavioral sublethal responses of two stored-product psocids to surface insecticides. *Pest Management Science*, 64(12), 1314-1322.
- Guedes, N. M. P., Guedes, R. N. C., Campbell, J. F. ve Throne, J. E. (2017). Mating behaviour and reproductive output in insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). *Annals of Applied Biology*, 170(3), 415-424.
- Guo, H., Xu, G., Wang, B., Xia, F., Sun, Q., Wang, Y., Xia, Q. (2019). Phosphoenolpyruvate carboxykinase is involved in antiviral immunity against *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Developmental and Comparative Immunology*, 92, 193-198.
- 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.

- Hahn, D. A. ve Denlinger, D. L. (2011). Energetics of insect diapause. *Annual Review of Entomology*, 56, 103-121.
- Hanson, R. W. ve Hakimi, P. (2008). Born to run; the story of the PEPCK-C mus mouse. *Biochimie*.
- Hanson, R. W. ve Reshef, L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (gtp) gene expression. *Annu. Rev. Biochem* (C. 66).
- Hao, Y. J., Zhang, Y. J., Si, F. L., Fu, D. Y., He, Z. B. ve Chen, B. (2016). Insight into the possible mechanism of the summer diapause of *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae) through digital gene expression analysis. *Insect Science*, 23(3), 438-451.
- Harris, D. L. (2006). Khapra Beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Insecta: Coleoptera: Dermestidae): EENY-372/IN667, 5/2006. *EDIS*, 2006(10).
- Harsimran Kaur Gill, Gaurav Goyal ve Gurminder Chahil. (2017). Insect Diapause: A Review. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, (7).
- Hatting, M., Tavares, C. D. J., Sharabi, K., Rines, A. K. ve Puigserver, P. (2018). Insulin regulation of gluconeogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc.
- Hayward, L. A. W. (1955). Losses associated with groundnuts infested with *Trogoderma granarium* Everts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 6(6), 337-340.
- Hein, S. ve Steinbüchel, A. (1996). Alcaligenes eutrophus possesses a second pyruvate dehydrogenase (E1). *European Journal of Biochemistry*, 237(3), 674-684.
- Hers, H. G. ve Hue, L. (1983). Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. www.annualreviews.org.
- Hiruma, K., Shimada, H., & Yagi, S. (1978). Activation of the prothoracic gland by juvenile hormone and prothoracicotropic hormone in *Mamestra brassicae*. *Journal of Insect Physiology*, 24(3), 215-220.
- Hodek, I. ve Hodková, M. (1988). Multiple role of temperature during insect diapause: a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 49(1-2), 153-165.
- Hodek, Ivo. (2002). Controversial aspects of diapause development. *European Journal of Entomology*, 99(2), 163-173.
- Hodek, Ivo. (2003). Role of water and moisture in diapause development (A review). *European Journal of Entomology*, 100(2), 223-232.
- Hodkova, M. ve Hodek, I. (1997). Temperature Regulation of Supercooling and Gut Nucleation in Relation to Diapause of *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *CRYOBIOLOGY* (C. 34).

- Homem, C. C. F., Steinmann, V., Burkard, T. R., Jais, A., Esterbauer, H. ve Knoblich, J. A. (2014). Ecdysone and mediator change energy metabolism to terminate proliferation in *Drosophila* neural stem cells. *Cell*, 158(4), 874-888.
- Horie, Y., Kanda, T. ve Mochida, Y. (2000). Sorbitol as an arrester of embryonic development in diapausing eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* (C. 46).
- Howe, R. W. (1952). Entomological problems of food storage in Northern Nigeria. *Bulletin of entomological Research*, 43(1), 111-144.
- Howe, R. W. (1965). A summary of estimates of optimal and minimal conditions for population increase of some stored products insects. *Journal of Stored Products Research*, 1(2), 177-184.
- Hucho, F. (1975). The pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 14(9), 591-601.
- Ikan, R., Stanic, V., Cohen, E. ve Shulov, A. (1970). The function the khapra of fatty acids in the diapause of beetle *Trogoderma granarium* Everts. *Biochem. Physiol* (C. 37). Pergamon Press.
- Istock, C. A., Wasserman, S. S. ve Zimmer, H. (1975). Ecology and Evolution of the Pitcher-Plant Mosquito: 1. Population Dynamics and Laboratory Responses to Food and Population Density. *Source: Evolution* (C. 29).
- Jett, M. F., Hue, L., & Hers, H. G. (1981). Pyruvate kinase phosphatase. *FEBS Lett*, 132(2), 183-186.
- Jood, S. ve Kapoor, A. C. (1993). Protein and uric acid contents of cereal grains as affected by insect infestation. *Food Chemistry* (C. 46).
- Kageyama, T., & Ohnishi, E. (1973). Carbohydrate metabolism in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. II. Anaerobiosis and polyol formation. *Development, Growth & Differentiation*, 15(1), 47-55.
- 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. ve 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., Karagianni, E. S. ve Papanikolaou, N. E. (2019). Life history of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) on peeled barley, peeled oats and triticales. *Journal of Stored Products Research*, 84.
- Kayne, F. J. (1973). 11 Pyruvate kinase. In *The enzymes* (Vol. 8, pp. 353-382). Academic Press.

- Kimura, S. ve Kobayashi, M. (1975). Prothoracotropic action of ecdysone analogues in *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol* (C. 21). Pergamon Press.
- Kiselyova, T. ve McHugh, J. v. (2006). A phylogenetic study of Dermestidae (Coleoptera) based on larval morphology. *Systematic Entomology*, 31(3), 469-507.
- Košťál, V. ve Shimada, K. (2001). Malfunction of circadian clock in the non-photoperiodic-diapause mutants of the drosophilid fly, *chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology* (C. 47).
- Košťál, V. (2006). Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*. 52(2), 113-127.
- Kukal, O., Duman, J. G., & Serianni, A. S. (1989). Cold-induced mitochondrial degradation and cryoprotectant synthesis in freeze-tolerant arctic caterpillars. *Journal of Comparative Physiology B*, 158, 661-671.
- Kukal, O., Denlinger, D. L. ve Lee, R. E. (1991). Developmental and metabolic changes induced by in diapausing and non-diapausing flesh fly pupae. *J Comp Physiol B* (C. 160).
- Kumar, S., Stecher, G. ve Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kunieda, T., Fujiyuki, T., Kucharski, R., Foret, S., Ament, S. A., Toth, A. L., Maleszka, R. (2006). Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect Molecular Biology*.
- Lee Jr, R. E., Zachariassen, K. E., & Baust, J. G. (1981). Effect of cryoprotectants on the activity of hemolymph nucleating agents in physical solutions. *Cryobiology*, 18(5), 511-514.
- Lee Jr, R. E., Chen, C. P., Meacham, M. H., & Denlinger, D. L. (1987). Ontogenetic patterns of cold-hardiness and glycerol production in *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of insect physiology*, 33(8), 587-592.
- Lees, A. D. (1956). The physiology and biochemistry of diapause. *Annual Review of Entomology*, 1(1), 1-16.
- Lefevre, K. S. ve De, C. A. D. (1989). Adult diapause in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: effects of external factors on maintenance, termination and post-diapause development. *Physiological Entomology* (C. 14).
- Lindgren, D., Vincent, L., & Krohne, H. (1955). The khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts. *Hilgardia*, 24(1), 1-36.
- Liu, G., Roy, J., Johnson, E. A., Liu, J. ve Roy, E. A. J. (2006). Identification and function of hypoxia-response genes in *Drosophila melanogaster*. *Physiol Genomics*, 25, 134-141.

- Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- 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.
- MacRae, T. H. (2010). Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Majd-Marani, S., Naseri, B., Nouri-Ganbalani, G. ve Borzoui, E. (2018). Maize hybrids affected nutritional physiology of the khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Stored Products Research*, 77, 20-25.
- Mansour, M. (2016). Irradiation as a phytosanitary treatment against *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). *Florida Entomologist*, 138-142.
- Mardani-Talaei, M., Zibaee, A., Abedi, Z. ve Golizadeh, A. (2017). Digestion and protein metabolism of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) fed on different barley varieties. *Journal of Stored Products Research*, 73, 37-41.
- Masaki, S. (1978). Seasonal and latitudinal adaptations in the life cycles of crickets. In *Evolution of insect migration and diapause* (pp. 72-100). New York, NY: Springer US.
- Masaki, S. (1980). Summer diapause. *Ann. Rev. Entomol* (C. 25). www.annualreviews.org.
- McMullen, D. C. ve Storey, K. B. (2008). Mitochondria of cold hardy insects: Responses to cold and hypoxia assessed at enzymatic, mRNA and DNA levels. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(3), 367-373.
- Melkonian, E. A., Asuka, E., & Schury, M. P. (2019). Physiology, gluconeogenesis.
- Méndez-Lucas, A., Duarte, J. A. G., Sunny, N. E., Satapati, S., He, T., Fu, X., Perales, J. C. (2013). PEPCK-M expression in mouse liver potentiates, not replaces, PEPCK-C mediated gluconeogenesis. *Journal of Hepatology*, 59(1), 105-113.
- Méndez-Lucas, A., Hyroššová, P., Novellasmunt, L., Viñals, F. ve Perales, J. C. (2014). Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability. *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), 22090-22102.
- Meola, R. W., & Adkisson, P. L. (1977). Release of prothoracicotropic hormone and potentiation of developmental ability during diapause in the bollworm, *Heliothis zea*. *Journal of Insect Physiology*, 23(6), 683-688.
- Michaud, M. R., & Denlinger, D. L. (2007). Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. *Journal of Comparative Physiology B*, 177, 753-763.

- Miyamoto, T., & Amrein, H. (2017). Gluconeogenesis: An ancient biochemical pathway with a new twist. *Fly*, 11(3), 218-223.
- Miyamoto, T. ve Amrein, H. (2019). Neuronal gluconeogenesis regulates systemic glucose homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, 29(8), 1263-1272.e5.
- Modak, J., Deckwer, W. D. ve Zeng, A. P. (2002). Metabolic control analysis of eucaryotic pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Biotechnology Progress*, 18(6), 1157-1169.
- Mohammadzadeh, M. ve Izadi, H. (2018). Cold acclimation of *Trogoderma granarium* Everts is tightly linked to regulation of enzyme activity, energy content, and ion concentration. *Frontiers in Physiology*, 9(OCT).
- Munro, J. W. (1935). The Khapra Beetle. *Journal of the Institute of Brewing*, 41(5), 373-374.
- Musa, A. (2009). Life cycle, morphometrics and damage assessment of the khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) on stored groundnut. *Journal of Agricultural Sciences UDC* (C. 54).
- Müller, H. J. (1976). Forms of dormancy in insects as mechanisms of ecological adaptations.
- Nair, K. S. S. ve Desai, A. K. (1972). Some new findings on factors inducing diapause in *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera, Dermestidae). *Journal of Stored Products Research*, 8(1), 27-54.
- Nair, K. S. S. ve Desai, A. K. (1973). The Termination of Diapause in *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera, Dermestidae). *J. stored Prod. Ref* (C. 8). Pergamon Press.
- Naseri, B. ve Borzoui, E. (2016). Life cycle and digestive physiology of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) on various wheat cultivars. *Annals of the Entomological Society of America*, 109(6), 831-838.
- Ng, F. ve Tang, B. L. (2014). Pyruvate dehydrogenase complex (PDC) export from the mitochondrial matrix. *Molecular Membrane Biology*, 31(7-8), 207-210.
- Numata, H. (2004). Environmental factors that determine the seasonal onset and termination of reproduction in seed-sucking bugs (Heteroptera) in Japan. *Applied entomology and zoology*, 39(4), 565-573.
- O'Brien, R. M., Lucas, P. C., Forest, C. D., Magnuson, M. A., & Granner, D. K. (1990). Identification of a sequence in the PEPCK gene that mediates a negative effect of insulin on transcription. *Science*, 249(4968), 533-537.
- Olson, R. L. O., Farris, R. E., Barr, N. B. ve Cognato, A. I. (2014). Molecular identification of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) using the 16s gene. *Journal of Pest Science*, 87(4), 701-710.

- Özberk, F., Özberk, İ., Yücel, A., Atlı, A. ve İzol, D. (2017). Khapra beetle (*Trogoderma granarium* Everts, 1898) in durum wheat (*Triticum durum* Desf): Impacts on some seed characteristics and marketing price. *Turkish Journal of Entomology*, 41(2), 207-207.
- Paini, D. R. ve Yemshanov, D. (2012). Modelling the Arrival of Invasive Organisms via the International Marine Shipping Network: A Khapra Beetle Study. *PLoS ONE*, 7(9).
- Papanikolaou, N. E., Kavallieratos, N. G., Kondakis, M., Boukouvala, M. C., Nika, E. P. ve Demir, N. (2019). Elucidating fitness components of the invasive dermestid beetle *Trogoderma granarium* combining deterministic and stochastic demography. *PLoS ONE*, 14(2).
- Patel, M. S., & Roche, T. E. (1990). Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes 1. *The FASEB Journal*, 4(14), 3224-3233.
- Patel, M. S., & Korotchkina, L. G. (2006). Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemical Society Transactions*, 34(2), 217-222.
- Patel, Mulchand S., Nemeria, N. S., Furey, W. ve Jordan, F. (2014). The pyruvate dehydrogenase complexes: Structure-based function and regulation. *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.
- Penkov, S., Raghuraman, B. K., Erkut, C., Oertel, J., Galli, R., Ackerman, E. J. M., Kurzchalia, T. v. (2020). A metabolic switch regulates the transition between growth and diapause in *C. elegans*. *BMC Biology*, 18(1).
- Poelchau, M. F., Reynolds, J. A., Denlinger, D. L., Elsik, C. G. ve Armbruster, P. A. (2013a). Transcriptome sequencing as a platform to elucidate molecular components of the diapause response in the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *Physiological Entomology*, 38(2), 173-181.
- Poelchau, M. F., Reynolds, J. A., Elsik, C. G., Denlinger, D. L. ve Armbruster, P. A. (2013b). RNA-Seq reveals early distinctions and late convergence of gene expression between diapause and quiescence in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *Journal of Experimental Biology*, 216(21), 4082-4090.
- Pilkis, S. J., El-Maghrabi, M. R., & Claus, T. H. (1988). Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annual review of biochemistry*, 57(1), 755-783.
- Ragland, G. J., Denlinger, D. L. ve Hahn, D. A. (2010). Mechanisms of suspended animation are revealed by transcript profiling of diapause in the flesh fly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14909-14914.
- Ragland, G. J., Egan, S. P., Feder, J. L., Berlocher, S. H. ve Hahn, D. A. (2011). Developmental trajectories of gene expression reveal candidates for diapause termination: A key life-history transition in the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella*. *Journal of Experimental Biology*, 214(23), 3948-3959.

- Rahman, K. A., Gurchar, G., A. N. Singh Sohi, A. N. S. S., & Amar Nath Sapra, A. N. S. (1945). Studies on stored Grain Pests in the Punjab. VI. Biology of *Trogoderma granarium* Everts. *Indian J. Agric. Sci.* 15, 85-92.
- Rako, L., Agarwal, A., Semeraro, L., Broadley, A., Rodoni, B. C. ve Blacket, M. J. (2021). A LAMP (loop-mediated isothermal amplification) test for rapid identification of Khapra beetle (*Trogoderma granarium*). *Pest Management Science*, 77(12), 5509-5521.
- Reeves, R. E. (1968). A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 243(11), 3202-3204.
- Rinehart, J. P. ve 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* (C. 9).
- Rinehart, J. P., Yocum, G. D. ve Denlinger, D. L. (2000). Developmental upregulation of inducible hsp70 transcripts, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (C. 30).
- Saitou, N. ve Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4), 406-425.
- Sakka, M. K., Gatzali, F., Karathanos, V. ve Athanassiou, C. G. (2022). Efficacy of low oxygen against *Trogoderma granarium* Everts, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Callosobruchus maculatus* (F.) in commercial applications. *Journal of Stored Products Research*, 97.
- Saunders, D. S. (1980). Some effects of constant temperature and photoperiod on the diapause response of the flesh fly, *Surcophugu argyrostoma*. *Physiological Entomology* (C. 5).
- Saunders, D. S., Lewis, R. D., & Warman, G. R. (2004). Photoperiodic induction of diapause: opening the black box. *Physiological Entomology*, 29(1), 1-15.
- Sgolastra, F., Bosch, J., Molowny-Horas, R., Maini, S. ve Kemp, W. P. (2010). Effect of temperature regime on diapause intensity in an adult-wintering Hymenopteran with obligate diapause. *Journal of Insect Physiology*, 56(2), 185-194.
- Shulov, A. (1955). A contribution to the ecology of *Trogoderma granaria* Everts. In *Proceedings/Indian Academy of Sciences* (Vol. 42, No. 1, pp. 1-13). New Delhi: Springer India.
- Sim, C. ve Denlinger, D. L. (2008). Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*. www.pnas.org/cgi/content/full.
- Sim, C. ve Denlinger, D. L. (2013). Insulin signaling and the regulation of insect diapause. *Frontiers in Physiology*.
- Spacht, D. E., Teets, N. M. ve Denlinger, D. L. (2018). Two isoforms of Pepck in *Sarcophaga bullata* and their distinct expression profiles through development, diapause, and in response to stresses of cold and starvation. *Journal of Insect Physiology*, 111, 41-46.

- Storey, J. M., & Storey, K. B. (1990). Carbon balance and energetics of cryoprotectant synthesis in a freeze-tolerant insect: responses to perturbation by anoxia. *Journal of Comparative Physiology B*, 160, 77-84.
- Storey, K. B. (1993). Molecular mechanisms of metabolic arrest in mollusks. In *Surviving hypoxia* (pp. 253-269). CRC Press.
- Storey, K. B. (1996). Metabolic Adaptations Supporting Anoxia Tolerance in Reptiles: Recent Advances. *Biochem. Physiol (C)*, 13).
- Storey, K. B. ve Storey, J. M. (2004). Metabolic rate depression in animals: Transcriptional and translational controls. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*.
- Szurmak, B., Stokovskaya, L., Mooney, B. P., Randall, D. D. ve Miernyk, J. A. (2003). Expression and assembly of *Arabidopsis thaliana* pyruvate dehydrogenase in insect cell cytoplasm. *Protein Expression and Purification*, 28(2), 357-361.
- Sivrikaya, H. (2023). Kapra böceği *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermastidae)'da çinko oksit nanoparçacıklarının insektisit etkinliğinin belirlenmesi (Master's thesis, Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Trogoderma granarium*, (2002). *EPPO Bulletin*, 32(2), 299-310. doi:10.1046/j.1365-2338.2002.00588.x.
- Trogoderma granarium*. (2013). *EPPO Bulletin*, 43(3), 431-448. doi:10.1111/epp.12080.
- Trogoderma granarium* (TROGGA) World distribution| *EPPO Global Database*., 2021,
- Tauber, M. J. ve Tauber, C. A. (1970a). Adult Diapause in *Chrysopa Carnea*: Stages, Sensitive to Photoperiodic Induction. *J. Insect Physic&* (C. 16). Pergamon Press.
- Tauber, M. J., Tauber, C. A. ve Denys, E. J. (1970b). Diapause In *Chrysopa Carvea* (Neuroptera: Chrysopidae) 11. Maintenance By Photoperiod.
- Tauber, M. J. ve Tauber, C. A. (1972). Geographic Variation in Critical Photoperiod and in Diapause Intensity of *Chrysopa Carnea* (Neuroptera). *J. Insect Physiol* (C. 18). Pergamon Press.
- Tauber, M. J., & Tauber, C. A. (1973). Nutritional and photoperiodic control of the seasonal reproductive cycle in *Chrysopa mohave* (Neuroptera). *Journal of Insect Physiology*, 19(4), 729-736.
- 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., Nechols, J. R., & Helgesen, R. G. (1982). A new role for temperature in insect dormancy: cold maintains diapause in temperate zone Diptera. *Science*, 218(4573), 690-691.
- Teets, N. M., Kawarasaki, Y., Lee, R. E. ve Denlinger, D. L. (2013). Expression of genes involved in energy mobilization and osmoprotectant synthesis during thermal and

- dehydration stress in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 183(2), 189-201. doi:10.1007/s00360-012-0707-2
- Thompson, S. N. (1995). Gluconeogenesis and effect of nutritional status on TCA cycle activity in the insect *Manduca sexta*. *Biochimica et Biophysica Acta* (C. 1245).
- Thompson, S. N. (2000). Pyruvate cycling and implications for regulation of gluconeogenesis in the insect, *Manduca sexta* L. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274(3), 787-793.
- Thompson, S. N. (2003). Trehalose the insect 'blood'sugar. *Advances in insect physiology*, 31(Supplement C), 205-285.
- Tougeron, K. (2019). Diapause research in insects: historical review and recent work perspectives. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. Blackwell Publishing Ltd.
- Vassilakos, T. N., Riudavets, J., Castañé, C., Iturralde-Garcia, R. D., Athanassiou, C. G. ve Neven, L. (2019). Efficacy of Modified Atmospheres on *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) and *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 112(5), 2450-2457.
- Vélez, M., Botina, L. L., Turchen, L. M., Barbosa, W. F. ve Guedes, R. N. C. (2018). Spinosad- and Deltamethrin-Induced Impact on Mating and Reproductive Output of the Maize Weevil *Sitophilus zeamais*. *Journal of Economic Entomology*, 111(2), 950-958.
- Viljoen, J. H. (1990). The occurrence of *Trogoderma* (Coleoptera: Dermestidae) and related species in southern africa with special reference to *T. granarium* and its potential to become established. *J. stored Prod. Res* (C. 26).
- Wilches, D. M., Laird, R. A., Floate, K. D. ve Fields, P. G. (2016). A review of diapause and tolerance to extreme temperatures in dermestids (Coleoptera). *Journal of Stored Products Research*. Elsevier Ltd.
- Wilches, D. M., Laird, R. A., Floate, K. D. ve 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.
- Wilches, D. M., Laird, R. A., Floate, K. D. ve Fields, P. G. (2019). Control of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) Using High Temperatures. *Journal of Economic Entomology*, 112(2), 963-968.
- Williams, J. A. ve Sehgal, A. (2001). Molecular components of the circadian system in *Drosophila*. www.annualreviews.org.
- Wu, Y., Domingue, M. J., McGraw, A. R., Vieira, K. A., Palmeri, M. Z. ve Myers, S. W. (2023). Development of an array of molecular tools for the identification of khapra beetle (*Trogoderma granarium*), a destructive beetle of stored food products. *Scientific Reports*, 13(1).

- Žďárek, J., & Denlinger, D. L. (1975). Action of ecdysoids, juvenoids, and non-hormonal agents on termination of pupal diapause in the flesh fly. *Journal of Insect Physiology*, 21(6), 1193-1202.
- Xu, W.-H. ve Denlinger, D. L. (2003). Molecular characterization of prothoracicotropic hormone and diapause hormone in *Heliothis virescens* during diapause, and a new role for diapause hormone. *Insect Molecular Biology* (C. 12).
- Yadav, S. K., Srivastava, C. ve Sabtharishi, S. (2020). Phosphine resistance and antioxidant enzyme activity in *Trogoderma granarium* Everts. *Journal of Stored Products Research*, 87.
- Yamashita, O. ve Hasegawa, K. (1970). Oijocyte age sensitive to the diapause hormone from the standpoint of glycogen synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*. *j. insect physiol* (c. 16). pwgamon press.
- Yang, J., Kalhan, S. C. ve Hanson, R. W. (2009). What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase? *Journal of Biological Chemistry*.
- Yilmaz, L. S. ve Walhout, A. J. (2017) Metabolic network modeling with model organisms. *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier Ltd.
- Yi-ping, L. I., He, G. O. N. G., & Park, H. Y. (2000). Enzymes of fatty acid metabolism in overwintering mature larvae of the pine needle gall midge, *The codiplosis japonensis*. *Insect Science*, 7(2), 135-141.
- Yocum, G. D., Joplin, K. H., & Denlinger, D. L. (1991). Expression of heat shock proteins in response to high and low temperature extremes in diapausing pharate larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 18(4), 239-249.
- Yocum, G D, Joplin, K. H. ve Denlinger, D. L. (1998). Upregulation of a 23 kDa small heat shock protein transcript during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (C. 28).
- Yocum, George D., Rinehart, J. P., Horvath, D. P., Kemp, W. P., Bosch, J., Alroobi, R. ve Salem, S. (2015). Key molecular processes of the diapause to post-diapause quiescence transition in the alfalfa leafcutting bee *Megachile rotundata* identified by comparative transcriptome analysis. *Physiological Entomology*, 40(2), 103-112.
- Young, J. W. (1977). Gluconeogenesis in Cattle: Significance and Methodology. *Journal of Dairy Science*, 60(1), 1-15.
- Zhou, Y. L., Nicholls, J. A., Liu, Z. H., Hartley, D., Szito, A., Slipiński, A. ve Zwick, A. (2022). Molecular Phylogeny of Dermestidae (Coleoptera) Reveals the Polyphyletic Nature of *Trogoderma Latreille* and the Taxonomic Placement of the Khapra Beetle *Trogoderma granarium* Everts. *Insect Systematics and Diversity*, 6(6).
- Zimmer, D. B., & Magnuson, M. A. (1990). Immunohistochemical localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in adult and developing mouse tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 38(2), 171-178.