



***RICANIA SIMULANS*'TA KİTİN SENTAZ 1
GENİNİN TRANSKRİPTOM ANALİZİ**

Serpil TURHAN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Semra ÇİÇEK

Yüksek Lisans Tezi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

2021

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

***RICANIA SIMULANS*'TA KİTİN SENTAZ 1 GENİNİN TRANSKRİPTOM ANALİZİ**
(Transcriptome Analysis of Chitin Synthase 1 Gene in *Ricania simulans*)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Serpil TURHAN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Semra ÇİÇEK

Erzurum
Ağustos, 2021

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Serpil TURHAN tarafından hazırlanan “*Ricania simulans*’ta Kitin Sentaz 1 Geninin Transkriptom Analizi” başlıklı çalışması 30 / 07/ 2021 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Abdülkadir ÇİLTAŞ
Atatürk Üniversitesi
Danışman: Dr. Öğr.Üyesi Semra ÇİÇEK
Atatürk Üniversitesi
Jüri Üyesi: Doç. Dr. Emre İLHAN
Erzurum Teknik Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Aslı Islak İmzalıdır

Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun
.../.../.... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FBA-2019-7479

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Dr. Öğr. Üyesi Semra ÇİÇEK danışmanlığında sunulan “*Ricania simulans*’ta Kitin Sentaz 1 Geninin Transkriptom Analizi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	15	30
Kuramsal Temeller	14	30
Materyal ve Yöntem	31	35
Bulgular	4	20
Tartışma	0	20
Tezin Geneli	18	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5’den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Serpil TURHAN	Dr. Öğr. Üyesi Semra ÇİÇEK
Tarih:02.07.2021	Tarih:02.07.2021
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından FBA-2019-7479 numaralı “*Ricania simulans*’ta Kitin Sentaz 1 Geninin Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı proje kapsamında yüksek lisans tezi olarak sunulmaktadır. Bu tez çalışmasına verdikleri desteklerden dolayı öncelikli olarak Atatürk Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi’ne teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bilimsel ve akademik yönlendirmeleri, önerileri, yorumları ile bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım, bana her türlü yardım ve desteği sağlayan çok değerli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Semra ÇİÇEK’e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmamın tüm deneysel süreçlerinde yardımını esirgemeyen, yol gösteren, değerli bilgileri ve yorumlarını benimle paylaşan Erzurum Teknik Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Emre İLHAN’a, Sayın Araş. Gör. Ayşe Gül KASAPOĞLU’na ve Real Time PCR çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehtap BAYIR’a ve Sayın Arş. Gör. Mustafa Özkan BALTACI’ya, laboratuvar sarf malzeme teminindeki yardımlarından dolayı Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvar Koordinatörü Sayın Doç. Dr. Murat AYDIN’a ve Araş. Gör. Esmâ YİĞİDER’e teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirdiğim Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) müdürü Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ’a ve buradaki çalışmalarım boyunca yardımcı olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER’e ve öğrencisi Sayın Melek ACAR’a ve çalışmalarımın diğer kısmını gerçekleştirdiğim Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (YÜTAM) müdürü Sayın Doç. Dr. Güven TURGUT’a teşekkür ederim.

Atatürk Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve çalışanlarına, çalışmalarımın her aşamasında fakültemizin ve bölümümüzün bütün imkânlarını esirgemeyen bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR’e teşekkür ederim.

Çalışmalarımın farklı aşamalarında yardımcı olan Sayın Arş. Gör. Şeyda ALBAYRAK, Sayın Erdal ÖZDEMİR, Sayın Muhammed Enes KINDİĞİLİ, Sayın İlyas ASAN, Sayın Sümeyra UÇAR’a ve diğer tüm grup arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, sevgileri ve varlıklarıyla her daim yanımda olan babam Sayın Nazmi TURHAN'a, annem Sayın Sevilay TURHAN'a, kardeşlerim Sayın Murat TURHAN'a, Sayın Duygu HAS'a, eniştem Sayın Halil İbrahim HAS'a, halam Sayın Nazmiye TURHAN'a ve kuzenlerim Sayın Esra Tuba TURHAN'a, Sayın Ayhan TURHAN'a ve Sayın Esin Nalan ÖRNEKÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Serpil TURHAN



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***RICANIA SIMULANS*'TA KİTİN SENTAZ 1 GENİNİN TRANSKRİPTOM ANALİZİ**

Serpil TURHAN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Semra ÇİÇEK

Amaç: Ülkemizin Karadeniz Bölgesi'nde özellikle ekonomik öneme sahip bitkisel ürünlerde ciddi kayıplara neden olan *Ricania simulans*'a yönelik etkinliği yüksek biyolojik mücadelede bulunabilme yöntemlerinden biri genetik susturma olarak öne çıkmaktadır. Bu nedenle canlının büyümesine engel olmak için sekans bilgisine ve kitin sentaz 1 geninin moleküler dizilimine ihtiyaç bulunmaktadır. Bu çalışmada *Ricania simulans*'ın yumurta, nimf ve ergin dönemlerinde transkriptom verilerinin elde edilmesi ve Kitin Sentaz 1 geninin moleküler diziliminin ortaya konması ve ekspresyon çalışmaları ile doğrulanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Yumurta, nimf ve ergin evrelerdeki *Ricania simulans* örneklerinden Total RNA izolasyonu yapılmıştır. Örnekler üzerinde RNA-seq transkriptom analizi yapılmıştır. Biyoinformatik araçlar kullanılarak örnek kalitesi, okuma kalitesi, farklı gen ekspresyonlarının belirlenmesi, ısı haritalarının çıkarılması gibi analizler yapılmıştır. Daha sonra kitin sentaz 1 gen ekspresyonu için real time çalışmaları yapılmıştır.

Bulgular: *Ricania simulans*'ın yumurta, nimf, ergin evre örnekleri için RNA-seq transkriptom analizi yapılmıştır ve 509137 sekans sayısı, 370106677 total uzunluk, en uzun sekans 35193 nt, en kısa sekans 178 nt, ortalama sekans uzunluğu 727 nt, %35.27 GC içeriği, %32.36 Adenin, %32.27 Timin, %17.50 Guanin, %17.77 Sitozin verileri elde edilmiştir. Kitin sentaz 1 genine yönelik sekans verisi elde edilmiştir ve Real Time PCR çalışmaları ile ekspresyon doğrulaması yapılmıştır.

Sonuç: Kitin sentaz 1 geninin canlının nimf ve ergin evresinde eksprese olduğu ortaya konarak genetik susturma çalışmalarında hedef gen olarak kullanım potansiyeli oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Ricania simulans*, Transkriptom analizi, Kitin sentaz 1 geni

Ağustos 2021, 80 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

TRANSCRIPTOM ANALYSIS OF THE CHITIN SYNTHASE 1 GENE IN RICANIA SIMULANS

Serpil TURHAN

Supervisor: Assis. Prof. Dr. Semra ÇİÇEK

Purpose: Genetic silencing stands out as one of the methods of biological control with high efficiency against *Ricania simulans*, which causes serious losses in especially economically important plant products in the Black Sea Region of our country. For this reason, sequence information and the molecular sequence of the chitin synthase 1 gene are needed to prevent the growth of the living thing. In this study, it was aimed to obtain transcriptome data in the egg, nymph and adult stages of *Ricania simulans* and to reveal the molecular sequence of the Chitin Synthase 1 gene and to verify it with expression studies.

Method: Total RNA was isolated from egg, nymph and adult stage samples of *Ricania simulans*. RNA-seq transcriptome analysis was performed on the samples. Analyzes such as sample quality, reading quality, determination of different gene expressions, and heatmaps were performed using bioinformatic tools. Then, real-time studies were performed for chitin synthase 1 gene expression.

Findings: RNA-seq transcriptome analysis was performed for egg, nymph and adult stage samples of *Ricania simulans* and sequence number of 509137, total length of 370106677, longest sequence 35193 nt, shortest sequence 178 nt, mean sequence length 727 nt, 35.27% GC content, 32.36% Adenine, 32.27% Thymine, 17.50% Guanine, 17.77% Cytosine data were obtained. Sequence data for the chitin synthase 1 gene were obtained and expression confirmation was performed by Real Time PCR studies.

Results: By demonstrating that the chitin synthase 1 gene is expressed in the nymph and adult stages of the organism, the potential for use as a target gene in genetic silencing studies has been established.

Keywords: *Ricania simulans*, Analysis of transcriptome, Chitin synthase 1 gene

August 2021, 80 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xii
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	4
<i>Ricania simulans</i>	4
<i>Ricania simulans</i> 'ın Zararı.....	6
<i>Ricania simulans</i> 'a Yönelik Mücadele Yöntemleri	6
Kitin	9
Kitin Sentezi.....	10
Kitin Sentaz Enzimi	12
Kitin Sentaz 1 Geni	13
Transkriptom (RNA-seq)	14
Böceklerde Kitin Sentaz 1 Genine Yönelik Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları	16
MATERYAL VE METOT	18
Kullanılan Kimyasallar	18
Kullanılan Materyaller ve Cihazlar	18
Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	19
Örneklerin Toplanması.....	19
Örneklerin Çalışmaya Hazırlanması	20
Toplam RNA İzolasyonu	20
Toplam RNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi	21
Toplam RNA'dan cDNA Eldesi	21
cDNA Örneklerinin Kantitatif ve Kalitatif Analizi.....	22
RNA-seq Transkriptom Analizi için RNA Örneklerinin Hazırlanması.....	22

Biyoinformatik Analizler	24
Real Time PCR Çalışması.....	25
ARAŞTIRMA BULGULARI	26
Örneklerin RNA Kalite Değerleri	26
RNA-seq Transkriptom Analiz Sonuçları.....	28
Ham Okumaların Kalite Kontrolü.....	31
De Novo Birleştirmeleri	33
Gen İfade Seviyeleri.....	34
Temel Bileşenler Analizi.....	35
Farklı İfade Olmuş Genlerin (DEGs) Tespiti.....	35
RNA-seq Transkriptom Çalışması ile <i>Ricania simulans</i> 'ta Kitin Sentaz 1 Genine ait Dizilimin Elde Edilmesi.....	40
Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) ile Kitin Sentaz 1 Gen İfadesinin Doğrulanması	40
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	42
Tartışma ve Sonuç.....	42
Sonuç ve Öneriler.....	52
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	65

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Tez Dahilinde Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	18
Tablo 2. Tez Dahilinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar	18
Tablo 3. Tez Dahilinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	19
Tablo 4. cDNA Eldesi İçin Hazırlanan Çalışma Solüsyon Karışımı	22
Tablo 5. Çalışmada Kullanılan qRT-PCR Primerlerine Ait Bilgiler	25
Tablo 6. Real Time PCR Protokolü	25
Tablo 7. Örnek Test Sonuçları	26
Tablo 8. Okumaların İstatistik Sonuçları	29
Tablo 9. Transkriplerin kalite metriksleri	33
Tablo 10. De Novo Tamlık Değerlendirme Sonuçları	34
Tablo 11. Hizalama (Alignment) Sonuçları	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nimf ve ergin <i>Ricania simulans</i> 'a ait mikroskop görüntüleri.....	1
Şekil 2. <i>Ricania simulans</i> 'a ait tek sıra halinde dizili yumurtalar.....	5
Şekil 3. <i>Ricania simulans</i> 'a ait nimfler	5
Şekil 4. <i>Ricania simulans</i> 'a ait erginler	6
Şekil 5. Kitin oluşum aşamaları	11
Şekil 6. Kitin yapısı.....	11
Şekil 7. Kitin sentezi	12
Şekil 8. <i>Tetranychus urticae</i> 'de Kitin sentaz	13
Şekil 9. BGI örnek hazırlama rehberi.....	23
Şekil 10. Yumurta örnek kalitesi.....	26
Şekil 11. Nimf1 örnek kalitesi.....	27
Şekil 12. Nimf2 örnek kalitesi.....	27
Şekil 13. Ergin1 örnek kalitesi	28
Şekil 14. Ergin2 örnek kalitesi	28
Şekil 15. Yumurta örneği için a) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca baz yüzde dağılımı b) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca kalite dağılımı	29
Şekil 16. Nimf1 örneği için a) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca baz yüzde dağılımı b) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca kalite dağılımı	30
Şekil 17. Nimf2 örneği için a) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca baz yüzde dağılımı b) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca kalite dağılımı	30
Şekil 18. Ergin1 örneği için a) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca baz yüzde dağılımı b) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca kalite dağılımı	31
Şekil 19. Ergin2 örneği için a) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca baz yüzde dağılımı b) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca kalite dağılımı	31
Şekil 20. FastQC: ortalama kalite skorları	32
Şekil 21. FastQC: Sekans başına GC içeriği	32

Şekil 22. FastQC: Sekans başına kalite skorları.....	33
Şekil 23. FastQC: Sekans çoğaltma seviyeleri.....	33
Şekil 24. Tam ve kayıp ortologların dağılımı.....	34
Şekil 25. Temel bileşenler analizi	35
Şekil 26. Örneklerin farklı eksprese olmuş genler açısından karşılaştırılmaları.....	36
Şekil 27. DEG'lerin MA plot ve Volcano plot şeklindeki gösterimi	37
Şekil 28. DEG'lerin serpilme diyagramları.....	38
Şekil 29. DEG'lerin ısı haritaları.....	39
Şekil 30. Yumurta, nimf ve ergin evrelerindeki <i>Ricania simulans</i> 'ta kitin sentaz 1 gen ifade karşılaştırmaları.....	41
Şekil 31. 70°C'de iki dakikalık ısı denatürasyonundan sonra, <i>A. mellifera</i> beyin RNA profili.....	43
Şekil 32. Böceklerde ribozomal alt birimlerinde rRNA'nın değerlendirilmesi	44
Şekil 33. De Novo birleştirme prosesi.....	48

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
µm	: Mikrometre
5,TMS	: Beş Transmembran Sarmalın Transmembran Segmenti
CD	: Katalitik Alan
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CHS	: Kitin Sentaz
CHS1	: Kitin Sentaz 1
CHS2	: Kitin Sentaz 2
CTR	: C- Terminal Bölgesi
DEG	: İfade Olmuş Gen
DEPCH₂O	: Dietilpirocarbonat Su
dk	: Dakika
DNB	: DNA Nanotop
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EST	: İfade Edilmiş Sekans Etiketi
g	: Gram
g	: Gravite
g/mol	: Gram/ Mol
Gapdh	: Gliseraldehid 3- Fosfat Dehidrogenaz
Gb	: Giga Baz
Inc RNA	: Uzun Kodlanmayan RNA
L	: Litre
miRNA	: Micro RNA
mL	: Mililitre

ng	: Nanogram
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
PM	: Peritrofik Membran
RNAi	: RNA ile Susturulmuş
SAGE	: Gen İfadesinin Seri Analizi
sn	: Saniye
TBE	: Tris-borat
UTR	: N- Terminal Bölgesi
UV	: Ultraviyole Işın
µg/mL	: Mikrogram/ Mikrolitre



GİRİŞ

Ricaniidae ailesi, dünya çapında 46 cins ve 450 tür içeren bir hemipter böcek (kan ve bitki özsuyu emerek yaşayan, birinci çift kanatlarının son yarısı, ikinci çiftin tümü zarımsı olan hortumlu böcekler topluluğu, yarım kanatlılar) grubudur. Bu aile çoğunlukla tropikal Afrika, Asya ve Avusturalya'da bulunmaktadır (Xu *et al.* 2006). Bu böceklerin çoğu opak veya hassas kahverengi desenli üçgen kanatlara sahiptir.

Ricaniidae familyasında yer alan ve halk dilinde vampir kelebek olarak adlandırılan *Ricania simulans* (Walker 1851) sırasıyla yumurta, nimf ve ergin halde bulunmaktadır. Ergin dişiler yılda ortalama 50 yumurta (beyaz renkte, şeffaf ve tek sıra halinde) bırakmaktadır (Alev 2014). Nimfler 5 nimf aşamaya sahiptir ve Mayıs ayı sonunda ortaya çıkmaktadır. Ergin olanlar ise Temmuz ayı başlarında ortaya çıkar ve yumurtalarını Ağustos ayı başlarında bırakmaya, yumurta sahnelerine geçmeye ve bir yılda bir nesil vermeye başlamaktadır (Göktürk vd 2017) (Şekil 1). *R. simulans* nimf ve ergin evreleri, tüm tarımsal bitkileri, çalıları ve genç ağaçları ev sahibi olarak tercih etmektedir ve bu bitkilerin öz suyuyla beslenmektedir.



Şekil 1. Nimf ve ergin *Ricania simulans*'a ait mikroskop görüntüleri

R. simulans son 10-12 yıldır ülkemizde özellikle Karadeniz Bölgesi'nde (Artvin, Rize, Trabzon, Giresun ve Ordu illerinin bulunduğu sahil şeridi boyunca) giderek artan bir ilgiyle takip edilmektedir. Çünkü bu Ricaniia türü, bu bölgedeki başta çay üretimi olmak üzere çok sayıda bitki türüne (kivi, mandalina, asma, fasulye vb.) ciddi zarar veren ve bunun sonucunda

ekonomik kayıplara neden olan bir polifagdır (birçok çeşit besinle beslenen organizma). Ayrıca son zamanlarda *R. simulans*'ın Marmara Bölgesi'nde de görülmeye başlandığı ifade edilmektedir (Göktürk ve Mıhlı, 2015; Göktürk vd 2017; 2018).

R. simulans 'a karşı en yaygın kontrol seçeneği kimyasal pestisit uygulamasıdır. Ancak Karadeniz Bölgesi'nde çay ve fındık üretimi nedeniyle kimyasal pestisit kullanımının yasaktır. Bu nedenle *R. simulans* için alternatif mücadele yöntemleri, yeni stratejiler araştırılmaktadır. Ülkemizde bu amaçla ışık tuzakları, bazı bitki türlerinden (*Achillea biebersteinii*, *Origanum onites*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia pratensis*, *Satureja hortensis* ve *Tanacetum balsamita*) elde edilen esansiyel yağlar, bazı bakteriler (*Brevibacillus brevis*, *Bacillus thuringiensis subsp. Kenyae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Bacillus sphaericus* ve *Beauveria bassiana*) kullanılmıştır (Göktürk ve Mıhlı, 2015; Göktürk vd 2017; 2018).

Ancak giderek yayılan *R. simulans* ile mücadele için alternatif yolların araştırılmasına ihtiyaç vardır. Nitekim Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından Ar-Ge Destek Programı kapsamında 13. Proje Başvuru Çağrısı'nda “*Ricania* sp. ile kimyasal haricinde diğer mücadele olanaklarının araştırılması” şeklinde çalışma konusuna yer vermiştir. Dolayısıyla, *R. simulans* 'a yönelik çalışmalar ülkemizin öncelikli konularındandır. Şimdiye kadar, mekanik kontrol dışında bu zararlıya karşı etkili bir kontrol mekanizması kullanılamamıştır. Bu nedenle, bu zararı ekonomik zarar verme seviyesinin (EIC: economic injury level) altında tutmak için etkili bir kontrol mekanizması geliştirilmelidir.

R. simulans ile gen susturma teknikleri aracılığıyla moleküler anlamda mücadele etmek için *R. simulans* 'a ait ilgili genlerin sekans diziliminin belirlenmesi gerekmektedir. 21.07.2021 tarihinde bakıldı ve güncel verilere tekrar bakıldığında da National Center for Biotechnology Information (NCBI)'da *Ricania* için yapılan nükleotit dizilimi taramalarına göre oldukça az sonuç bulunmaktadır: *Ricania shantungensis* (129), *Ricania japonica* (15), *Ricania marginalis* (6), *Ricania simulans* (6)

B-1,4 glikosidik bağlarla bağlanmış N-asetilglukozaminlerin doğrusal bir homopolimeri olan kitin, selülozdan sonra doğada en bol bulunan ikinci biyolojik polisakkarittir (Merzendorfer ve Zimoch 2003). Mantarlarda, süngerlerde, nematodlarda, yumuşakçalarda, eklembacaklılarda, balıklarda, amfibiyanlarda ve bazı alglerde yaygın olarak bulunmaktadır (Daimon *et al.* 2003; Minamoto *et al.* 2015; Tang *et al.* 2015). Böceklerde, kitinin, kütikül, beslenme kanalı, trakeal sistem, genital kanallar ve çeşitli dermal bezlere ait kanalların önemli bir yapısal bileşeni olduğu ve vücut şeklinin korunmasında, dış mekanik bozulmalardan korunmada büyük rol oynadığı doğrulanmıştır (Hedegus *et al.* 2009;

Moussian, 2010; Zhu *et al.* 2016). Büyüme ve gelişme için, böcekler periyodik olarak eski dış yapılarını sindirmeli ve bu sindirme sırasında yeni ve daha gevşek bir dış yapı üretmelidir (Merzendorfer 2006). Kitin sentaz (Chitin synthase: CHS; EC 2.4.1.16), kitin sentez yolunun son aşamasında yer alan hayati bir enzimdir. CHS, kitin içeren tüm organizmalarda bulunan yüksek oranda korunmuş bir enzimdir (Arakane *et al.* 2012; Alvarenga *et al.* 2016). Böcek CHS'leri, aile 2 glikoziltransferazlara ait büyük transmembran proteinleridir. Bugüne kadar, CHS'ler, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Orthoptera*, *Hemiptera* ve *Diptera* dahil olmak üzere familyalarına ait, çeşitli böcek türlerinde klonlananmış ve sekanslanmıştır (Zhang *et al.* 2010; Qu and Yang 2011; Ampasala *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2012; Liu *et al.* 2012; Bansal *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012; Chen *et al.* 2013; Yang *et al.* 2013; Zhuo *et al.* 2014; Alvarenga *et al.* 2016; Shang *et al.* 2016; Shi *et al.* 2016; Macedo *et al.* 2017; Wang *et al.* 2019). Sekans benzerliği, dağılımı ve fizyolojik fonksiyonlarına dayanarak, böcek kitin sentazları iki türe ayrılmaktadır: CHS1 ve CHS2 (Merzenfonder *et al.* 2011). CHS1, birincil olarak hem kütikül ve trakealarda, hem de ön bağırsak ve kalın bağırsak astarlarında kullanılan kitin oluşumundan sorumlu iken CHS2, orta bağırsağın peritrofik membranında (PM) kitin sentezinden sorumludur. Bugüne kadar, CHS genlerinin işlevleri, *Tribolium castaneum*, *Anthonomus grandis*, *Spodoptera exigua*, *Bactrocera dorsalis*, *Drosophila melanogaster*, *Locusta migratoria*, *Laodelphax striatellus* ve *Nilaparvata lugens* gibi hem tam metabolik hem de yarı metabolik böceklerde RNA ile susturma (RNA interference: RNAi) kullanılarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Arakane *et al.* 2005; 2008; Tian *et al.* 2009; Wang *et al.* 2012; 2015; Zhang *et al.* 2010; Liu *et al.* 2012; Yang *et al.* 2013; Firmino *et al.* 2013; Moussian *et al.* 2015). Bu sonuçlar, CHS genlerinin hayatta kalma, ekdiz, doğurganlık ve yumurtadan çıkma için gerekli olduğunu göstermiştir. Özetlemek gerekirse, kitin biyosentezi, böcek büyümesi ve gelişimi için çok önemlidir ve kitin biyosentezine katılan CHS enzimleri, böcek zararlılarının kontrolü için yeni stratejilerin tasarımı için umut verici hedeflerdir.

R. simulans'ta CHS1 genine yönelik herhangi bir karakterizasyon ve sekanslama çalışması bulunmamaktadır. *R. simulans*'ta bulunma olasılığı yüksek olan bu genlere ait nükleotit dizilimi çalışılmadığı için yine bu genlerle ilgili genetik susturma amacıyla bir çalışmada yapılamamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada *R. simulans* için RNA-seq transkriptom analizi ile CHS1 genine yönelik moleküler bir karakterizasyon elde edilmesi amaçlanmıştır.

KURAMSAL TEMELLER

Ricania simulans

Ricania simulans'a ait taksonomik sınıflandırma şu şekildedir:

Alem	: Hayvan
Şube	: Arthropoda
Altşube	: Hexapoda
Sınıf	: Böcek
Takım	: Hemiptera
Üst familya	: Fulgoroidea
Familya	: Ricaniidae
Cins	: <i>Ricania</i>
Tür	: <i>Ricania simulans</i> (Walker, 1851)

Tropik ve Palearktik bölgelerde pek çok *Ricania* türü görülmektedir ve en yaygın yaşadığı yerler Çin, Gürcistan, Japonya, Rusya, Güney Kore, Tayvan ve Ukrayna olarak belirtilmektedir (Tsaur 2005; Urban and Cryan, 2007). *R. simulans*'ın anavatanı Güney Asya'dır ve 1900'lerde Rusya'ya 1950'lerde Gürcistan'a ve 2006'da Türkiye'de Doğu Karadeniz Bölgesi'ne özellikle Artvin, Rize, Trabzon, Giresun ve Ordu'ya göç etmiştir (Avidzba and Bobokhidze 1982; Demir 2009; Göktürk ve Aksu 2014; Göktürk vd 2017).

R. simulans'ın hayat döngüsü, yumurta evresi, mimf evresi ve ergin evresi olmak üzere 3 evreden oluşmaktadır. Yumurta evresinde ergin *R. simulans*'lar bölgeye göre Ağustos ayının başında yılda bir kez, bir dölde 50 adet yumurta/dişi bırakmaktadırlar. Renkleri şeffaf beyaz olan yumurtalar genellikle çay, mandalina, asma, kivi ve fasulye gibi bitkilere tek sıra halinde bırakılmaktadır (Şekil 2). Ağustos ve Haziran ayları arasındaki dönemi yumurtalar bu şekilde bitki üzerinde geçirerek Haziran ayında nimf evresine geçmektedirler (Alev 2014).



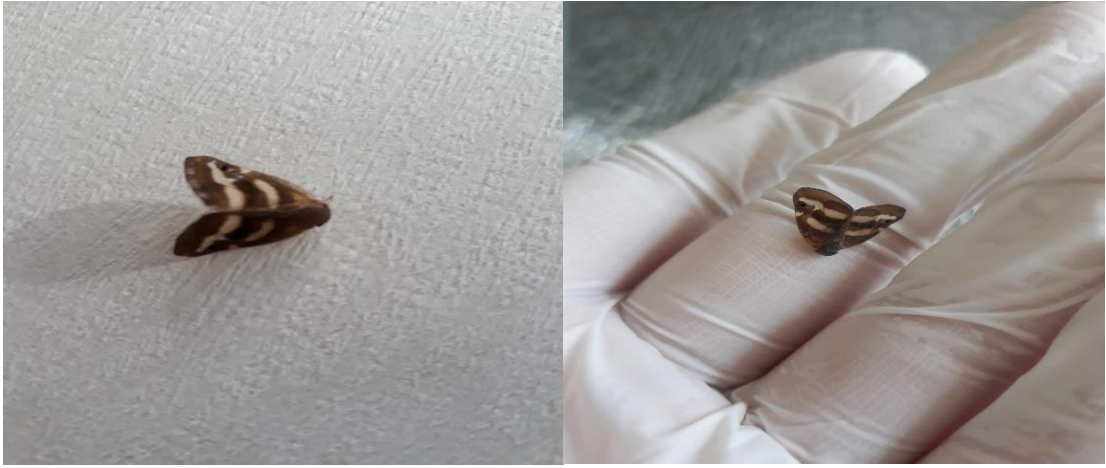
Şekil 2. *Ricania simulans*'a ait tek sıra halinde dizili yumurtalar

Nimf evresine geçen ve ortalama boyları 4 mm olan *R. simulans*'lar Mayıs ayı sonunda ve Haziran ayı başlarında ortaya çıkmaktadırlar. 5 farklı nimf evresinde iken vücutlarının arka kısımlarındaki beyaz tüyleri kamuflaj amacıyla kullanmaktadırlar (Şekil 3).



Şekil 3. *Ricania simulans*'a ait nimfler

Temmuz ayının ortalarında ergin forma geçen ve boyları ortalama 7-13 mm olan, opak veya kahverengi desenli üçgen kanatlara sahip *R. simulans*'lar Ağustos ayının başlarında çiftleşme dönemini geçirdikten sonra yumurtalarını bitkiye bırakırlar ve yaklaşık üç ay canlılıklarını sürdürürler (Göktürk vd 2017) (Şekil 4). *R. simulans* nimf ve ergin evreleri, tüm tarımsal bitkileri, çalıları ve genç ağaçları ev sahibi olarak tercih etmektedir ve bu bitkilerin öz suyuyla beslenmektedir.



Şekil 4. *Ricania simulans*'a ait erginler

***Ricania simulans*'ın Zararı**

R. simulans nimf ve ergin dönemlerinde tarım bitkileri, çalılar, genç ağaçların kök, yaprak, meyve ve dalları üzerine konarak bitki öz suyunu emerek ve yumurtalarını tek sıra halinde bırakarak zarar vermektedir (Göktürk ve Mihli 2016). Trabzon, Rize ve Artvin illerinde tarımsal faaliyet değerlendirildiğinde; fındık üretiminin %10'u, kivi üretiminin %61'i ve çay üretiminin %97'si bu illerde yapılmaktadır (Paksoy ve Memiş 2006; Yavuz 2007; Kontas 2012). Bu ekonomik öneme sahip bitkiler, meyve ağaçları, bu bölgede yetişen diğer bitki türlerinin çoğunluğu ve özellikle *Solanum carolinense* adlı yabancı ot türü *R. simulans* tarafından potansiyel tehdit altındadır. Türkiye'de Karadeniz Bölgesi'nde yetişen ürünlerde herhangi bir kimyasal mücadele yöntemi uygulanmamaktadır (Gokturk ve Aksu 2014). Bu nedenle özellikle Karadeniz Bölgesi'nde yer alan tarım alanlarında *R. simulans*'a karşı kimyasal mücadele yöntemi oldukça sınırlı kalmaktadır (Torun ve Taluğ 2005).

R. simulans için en çok önerilen kontrol yöntemi yumurtlama yapılan çit bitkileri, çalı bitkileri ve çok yıllık otsu bitkilerin temizlendiği ve biyolojik mücadelelerin uygulandığı kontrol yöntemleridir. Bu alanda çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

***Ricania simulans*'a Yönelik Mücadele Yöntemleri**

Güçlü vd (2010) tarafından yapılan çalışmada entomopatojenik mantar olan *Lecanicillium muscarium*'un *R. simulans*'a karşı etkinliği laboratuvar ve arazi şartlarında araştırılmıştır. Laboratuvar şartlarında *L. muscarium*'un 6 izolatu çay yaprakları üzerine tek doz (1×10^7 /mL) olarak uygulanmıştır. Bir haftalık periyotta *L. muscarium* kaynaklı *R. simulans* ölüm oranları %50,95- %74,76 arasında değişmiştir. Ortalama ölümcül süre (LT50) değerleri ise 2,34-3,90 gün arasındadır. Alan şartlarında *L. muscarium* suşu Lm4 nimf ve yetişkin *R. simulans*'a karşı kivi meyve ağaçlarına tek doz (1×10^7 /mL) halinde uygulanmıştır. LT50 değerleri nimf ve yetişkin *R. simulans* için sırasıyla 4,18 ve 6,49 gün olarak tespit

edilmiştir. Araştırmacılar, çalışma sonucunda alan çalışmalarında nimflerin yetişkinlere kıyasla bu mantara karşı daha zayıf olduğunu, *L. muscarium* suşu Lm4'ün *R. simulans*'ın biyolojik kontrolü için çevre dostu bir yaklaşım olabileceğini önermişlerdir.

Ak vd (2013) tarafından yapılan çalışmada azadirachtin ve spinosad etki maddeli biyopestisitlerin *R. simulans*'a karşı etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada 2009-2011 yılları arasında Hopa (Kemalpaşa) ve Rize (Merkez)'de *R. simulans*'a karşı bu ilaçların farklı dozları, 3 tekerrürlü olacak şekilde değerlendirilmiştir. Çalışmada 60x80 cm boyutlarına sahip ve içinde 20 adet nimf bulunan kafesler, *R. simulans* ile tanışmamış kivi sürgünlerine yerleştirilmiştir. Daha sonra farklı dozlarda (Azadirachtin için; 250-300-350-400 ml/100 lt; Spinosad için; 15-20-25-30-35 ml/100 lt) ilaç uygulamaları yapılmıştır. 1, 2, 3 ve 7. gün sonunda kafeslerdeki canlı ve ölü nimfler sayılarak istatistiksel analiz yapılmıştır. Araştırmacılar, çalışma sonunda biyopestisitlerden azadirachtin'in en yüksek dozunun (400ml/100lt) sadece %30 oranında bir etkiye sahip olduğunu, spinosad'ın ise 35 ml/100lt dozunun %71,2-78,7 oranında etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Kibar vd (2014) tarafından yapılan çalışmada böcek patojeni olan *Conidiobolus coronatus*'un, nimf *R. simulans*'lara karşı laboratuvar ve alan şartları altında etkisi araştırılmıştır. Laboratuvarda, *C. coronatus*'a ait üç izolat (Cc1, Cc2, Cc3) farklı dozda (1×10^7 /mL) çay yaprakları üzerine nimf *R. simulans*'lara karşı uygulanmıştır. 6 günlük bir periyottan sonra ölüm oranları %100'e ulaşmıştır ve ortalama ölüm zamanı değerleri (LT50) 3,19 ile 3,66 gün arasındadır. Alan şartlarında, *C. coronatus* suşu Cc3 tek doz halinde (1×10^7 /mL) elma ağaçları üzerinde nimf *R. simulans*'lara karşı uygulanmıştır. LT50 değeri alan çalışmasında 4,33 gün olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar, çalışma sonunda, *C. coronatus* suşu Cc3'ün *Ricania simulans*'a karşı potansiyel bir entomopatojenik ajan olabileceğini önermişlerdir.

Göktürk ve Mihli (2015) tarafından yayınlanan çalışmada 2013 ve 2014 yıllarında Artvin ili, Hopa ilçesi, Kemalpaşa beldesinde temmuz ve ağustos aylarında ergin *R. simulans*'ların bazı tuzaklar ile toplanmasına yönelik veriler raporlanmıştır. Bu tuzaklar, 53.34x4.06 cm ebatlarında olan 8 adet Huqing marka çift taraflı yapışkan özellikli tutkal alaşımlı bantlar, ışık tuzağı olarak da huni tabanlı mor ışık bulunduran 1 litrelik toplama kabı olan tuzaklar ve 21:00-06:00 arası çalıştırılan 4 adet ışık tuzağı olarak tasarlanmıştır. Tuzaklar 5-6 günde bir kez toplamda 13 kez kontrol edilmiştir ve düşen ve yapışan *R. simulans* sayıları Bağımsız İki Örnek t-Testi ile değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, çalışma sonucunda ışık tuzaklarına asılış süresi boyunca 4-694 adet *R. simulans* ergini düştüğünü, yapışkan bantlara

ise 6-33 arası *R. simulans* yapıştığını belirterek ışık tuzaklarının en azından bireysel mücadelede kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Çetin ve Sezen (2016) tarafından yapılan çalışmada, *R. simulans*'ın bakteriyel biyota biyolojik mücadele amacıyla araştırılmıştır. Çalışma doğrultusunda 12 bakteri izolatu hazırlanmıştır: *Pseudomonas oleovorans* (Rs1), *Pseudomonas parafulva* (Rs2, Rs3 ve Rs5), *Pseudomonas sp.* (Rs4, Rs7, Rs9), *Pantoea sp.* (Rs6), *Microbacterium paraoxydans* (Rs8), *Bacillus safensis* (Rs10), *Chryseobacterium indoltheticum* (Rs11) ve *Bacillus thuringiensis* (Rs12). Çalışmada nimf *R. simulans*'lar üzerine beş farklı doz uygulaması (1.8×10^5 bakteri/mL, 1.8×10^6 bakteri/mL, 1.8×10^7 bakteri/mL, 1.8×10^8 bakteri/mL, 1.8×10^9 bakteri/mL) yapılırken ergin *R. simulans* üzerine üç farklı doz uygulaması (1.8×10^7 bakteri/mL, 1.8×10^8 bakteri/mL, 1.8×10^9 bakteri/mL) yapılmıştır. Araştırmacılar, çalışma sonunda 10 gün içinde en fazla ölüm oranının (%82) nimf *R. simulans*'larda Rs4 uygulamasıyla elde edildiğini ve ergin *R. simulans* için %80 ölüm oranının Rs10 uygulamasıyla sağlandığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, Rs4'ün *R. simulans*'ın biyolojik kontrolü için potansiyel bir ajan olabileceğini önermişlerdir.

Göktürk ve Mihli (2016) tarafından yapılan çalışmada *R. simulans*'a karşı Pyrethrum (Spruzit Neu) (150ml/100 lt, 300 ml/100 lt, 600 ml/100 lt dozlarda) ve *Bacillus thuringiensis* (Dipel DF) (100 g/100 lt, 300 g/100 lt, 500 g/100 lt dozlarda) biyopestisitleri kullanılmıştır. 2015 yılında yaz aylarında Artvin'de nimf ve ergin *R. simulans*'lara belirtilen dozlarda yapılan biyopestisit uygulamasında elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi ve Duncan testi ile analiz edilmiştir. Araştırmacılar, çalışma sonunda nimf *R. simulans* üzerinde en etkili sonuçların 100 g/100 lt Dipel DF, 300 g/100 lt Dipel DF, 500 g/100 lt Dipel DF (%99 etkinlik oranı), ergin *R. simulans* üzerinde ise en etkili sonuçların 600 ml/100 lt Spruzit Neu (%96 etki oranı) ve 500gr/100 lt Difel DF (%93 etki oranı) ile elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Göktürk vd (2017) tarafından yapılan çalışmada *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae), *Origanum onites* L. (Lamiaceae), *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), *Salvia pratensis* L., (Lamiaceae), *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) ve *Tanacetum balsamita* L. (Asteraceae)'den elde edilen esansiyel yağlar *R. simulans*'ın nimf ve ergin formlarına karşı biyolojik mücadelede denenmiştir. Kontrol olarak etanol ve steril su karışımı, pozitif kontrol olarak Neemazal da kullanılmıştır. Esansiyel yağlar etanol ve su karışımında çözündürülmüştür ve *R. simulans* üzerine 10, 15 ve 20 µL/petri doz olacak şekilde sprey ile aktarılmıştır. Araştırmacılar, çalışma sonunda 20 µL/petri konsantrasyonunda 96 saatlik bir maruziyetten sonra, nimf ve ergin *R. simulans*'ın ölüm oranları sırasıyla% 42,5-74,1 ve %

23,3-50,8 olarak rapor etmişlerdir. Ayrıca, *R. officinalis* esansiyel yağının 0,15, 20 µL/petri dozlarının 24, 48, 72 ve 96 saat sonunda nimf *R. simulans*'ta sırasıyla %8,33, %26,6, %47,5, %74,1 ölüm oranı ile en yüksek etki gösterdiği bildirilmiştir.

Göktürk vd (2018) tarafından yayınlanan çalışmada *Brevibacillus brevis*'in 2 suşu (CP-1, FD-1), *Bacillus thuringiensis* (FDP-1), *Bacillus thuringiensis* alt suşu *Kenya*'nin 2 suşu (FDP-8, FDP-42), *Bacillus thuringiensis* alt suşu *Kurstakii*'nin 2 suşu (FDP-41, BAB-410), *Bacillus subtilis* (EK-7), *Pseudomonas chlororaphis* (NEM28), *Bacillus sphaericus* GC alt grubu D (FD-49) ve *Beauveria bassiana* (ET 10) olmak üzere toplamda 10 bakteri suşu *R. simulans*'a yönelik biyolojik mücadelede denenmiştir. Bu biyolojik ajanlar, *R. simulans*'ın nimf ve ergin formları üzerine sprey ile aktarılmışlardır. Araştırmacılar, çalışma sonunda *B. thuringiensis subsp. kenya*, *B. brevis* ve *B. sphaericus* GC altgrup D'nin nimf *R. simulans* üzerine en etkili biyolojik ajan olduklarını, *B. thuringiensis* alt suşu *kurstakii*, *P. chlororaphi*, *B. Brevis*'in ergin *R. simulans* üzerine en etkili biyolojik ajan olduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, kontrollü şartlar altında, ölüm oranlarının nimf uygulamalarında % 19,58-% 42,08 oranında ergin uygulamalarında ise %6-18 oranında değiştiğini rapor etmişlerdir.

Kitin

Yunanca "kiton" kelimesinden türetilen ve zırh anlamına gelen kitin ilk olarak Charles Hatchett tarafından 1799'da deniz hayvanlarının kabukları üzerinde yaptığı deneyler sırasında, böcek kütikülündeki "olağan kimyasala özellikle dirençli bir materyalin" varlığı ile ifade edilerek keşfedilmiştir (Hatchett 1799; Crini 2019). 1811'de kitin, Henri Braconnot tarafından mantarların su, alkol ve seyreltik alkali fongin/fungin ile ekstraksiyonundan sonra kalan çözünmez kalıntı olarak ifade edilmiştir (Braconnot 1811a, 1811b; Crini, 2019). Daha sonra kitin Odier tarafından 1823'te Cockchafer elytra'nın potasyum hidroksit uygulamasından sonra elde edilen boynuzsu bir materyal olarak raporlanmıştır (Odier 1823; Crini 2019). Kitin ilk olarak Braconnot tarafından "fongine" daha sonra Odier tarafından "chitine" olarak isimlendirilmiştir (Braconnot 1811a; Odier 1823; Crini 2019).

Kitin (β - (1-4) -poly-N-asetil-D-glukozamin) dünyadaki tüm canlı organizmaların % 70'inden fazlasında bulunabilen biyolojik olarak önemli bir biyopolimerdir ve selülozdan sonra en bol bulunan ikinci polisakkarittir (Kaya vd 2017). Kitin nötral pH şartlarında zayıf çözünürlüğe sahip olmakla birlikte toksik olmayan, hidrofobik, biyobozunur ve biyoyumlu polimerdir (Esteban *et al.* 2000; Cuesta *et al.* 2003; Jung and Park 2014; Seyyar 2018). Kitin, kimyasal özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde enzim immobilizasyonu, aljinat varlığında antikor immobilizasyonu, yara sargısı, anti kanser ajan, doku mühendisliği, kanser tanıları

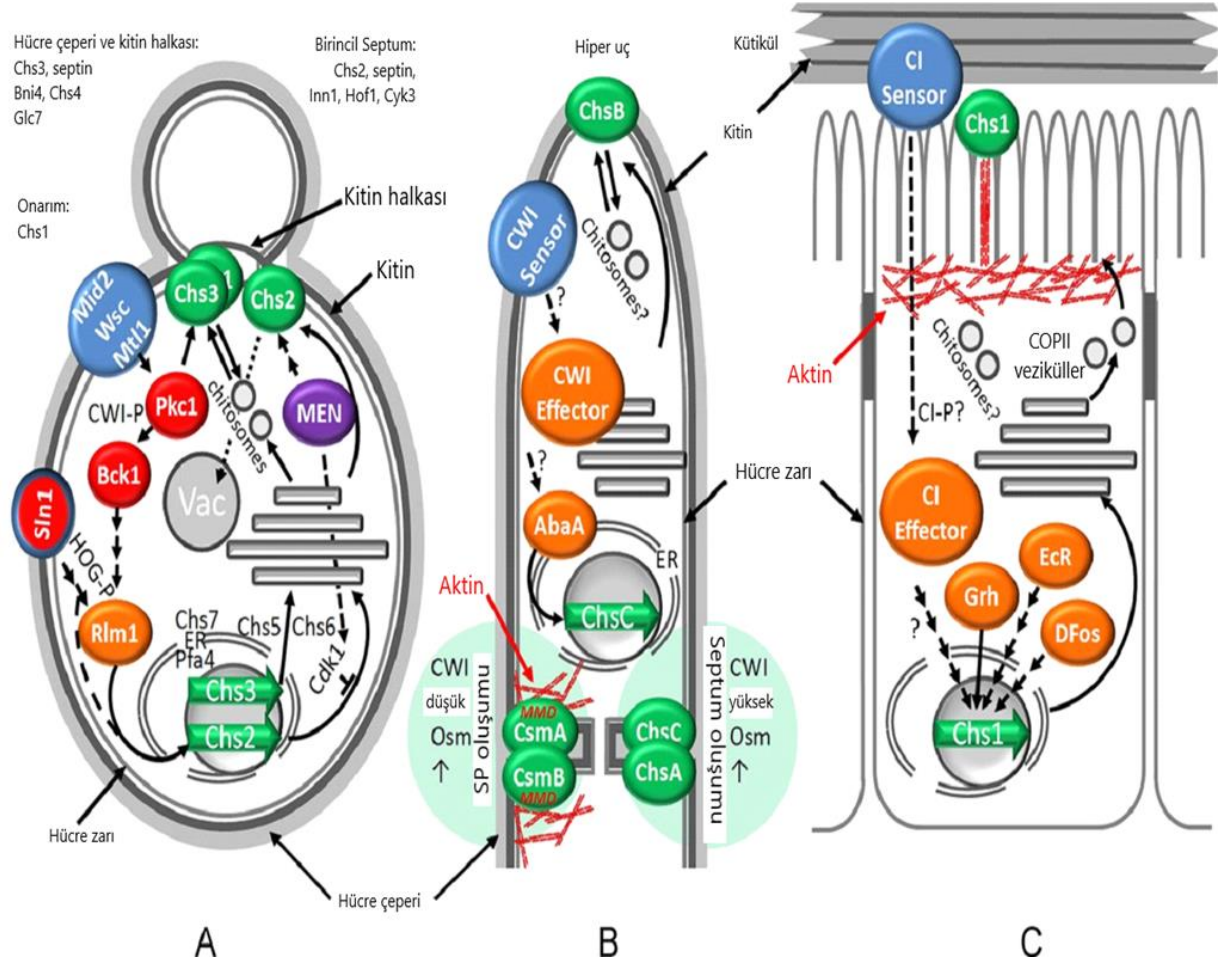
gibi birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılmaktadır (Jayakumar *et al.* 2010; Zdarta *et al.* 2015; Badwan *et al.* 2015; Azuma *et al.* 2015a; 2015b). Doğada sıralı makrofibriller halinde bulunan kitin, kabuklular, yengeçler, karidesler, böceklerin dış iskeletlerinde, beslenme kanalı, trakeal sistem, genital kanallar ve çeşitli dermal bezlerin kanallarında, nematodların yumurta kabuklarında, ayrıca bakteri ve fungusların hücre duvarlarında bulunan ana yapısal bileşeni oluşturmaktadır (Ayyaru and Venkatesan 2006; Lee *et al.* 2008; Brodaczewska *et al.* 2015). Kitin, bu canlılarda sert (olumsuz) çevre şartlarından koruma ya da anti parazit ve anti patojen immun tepkisinin gösterilmesi gibi işlevlere sahiptir (Lee *et al.* 2008, Elieh Ali Komi *et al.* 2018).

Kitin polimerleri kitin sentaz tarafından hücre içinde sentezlenmektedir, daha sonra plazma membranına taşındıktan sonra katı kristal formları için birleşmektedir ve son olarak organizmaların kitin kısımları şekillenmektedir (Cohen 2001; Elieh Ali Komi *et al.* 2018). Kitin, mikrofibrillerin farklı dönüşümlerinden kaynaklı olarak α -kitin (en iyi karakterize edilen), β -kitin, ve γ -kitin (mantarlarda bulunur) şeklinde üç polimerik forma sahiptir (Elieh Ali Komi and Hamblin 2016). Eklem bacaklılar, yengeç, istakoz ve karides izole edilen α -kitin, doğada en çok bulunan ve en iyi karakterize edilen polimerik katmanları anti paralel şekilde konumlanan kristal kitin formudur. Mürekkep balığından izole edilen β -kitin, daha az bilinen, monoklinik kristal yapıda olan, molekül içi kuvvetleri zayıf olan, hidrojen bağı içermeyen paralel yapıda konumlanan kristal kitin formudur. Küf ve mayalardan elde edilen γ -kitin, iki paralel bir anti paralel zincir halinde konumlanmış kristal kitin formudur (Atasever 2019)

Kitin Sentezi

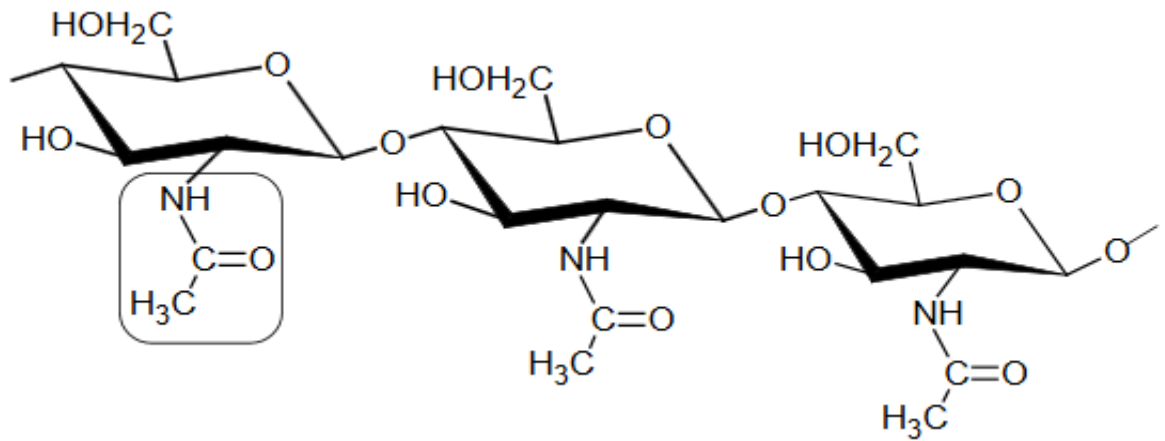
Kitin, fibriler yapı iskelesi olarak hareket eden yaklaşık 20 tek şeker zincirinin sözde kristal mikrofibrillerini oluşturan β -(1-4)-poly-N-asetil-D-glukozamin polimeridir (Şekil 5). Kitin, β - glikosiltransferazlar ailesine ait bir integral membran proteini olan kitin sentaz (EC 2.4.1.16) tarafından UDP- N- asetilglukozamin (UDP- GlcNAc) öncülleri kullanılarak sentezlenmektedir (Merzendorfer 2006). Ökaryotlarda kitin sentezi, dört enzimatik reaksiyon içeren bir dizide UDP- GlcNAc, fruktoz 6 fosfattan sentezlenmektedir. Glukozamin 6 fosfat sentaz (EC 2.6.1.16) enzimi ile Fruktoz 6 fosfat, Glukozamin 6 fosfat'a dönüştürülmektedir. GlcNAc-6-fosfat elde etmek için bir asetiltransferaz (EC 2.3.1.4) aracılığıyla asetil-koenzim A'dan bir asetil grup transferi yapılmaktadır. Fosfoasetilglukozaminmutaz (EC 5.4.2.3) tarafından katalize edilen GlcNAc- 1- fosfat izomerizasyonu ve UDP - GlcNAc pirofosforilaz (EC 2.7.7.23) tarafından UDP- GlcNAc ile sonuçlanan GlcNAc-1-fosfatın üridilasyonu yapılmaktadır. Bununla birlikte kitin sentezindeki şeker parçasının UDP-

GlcNAc'den büyüyen şeker zincirinin indirgenmeyen ucuna aktarılması şeklindeki kilit reaksiyon, kitin sentaz tarafından katalizlenmektedir (Merzendofer 2013).



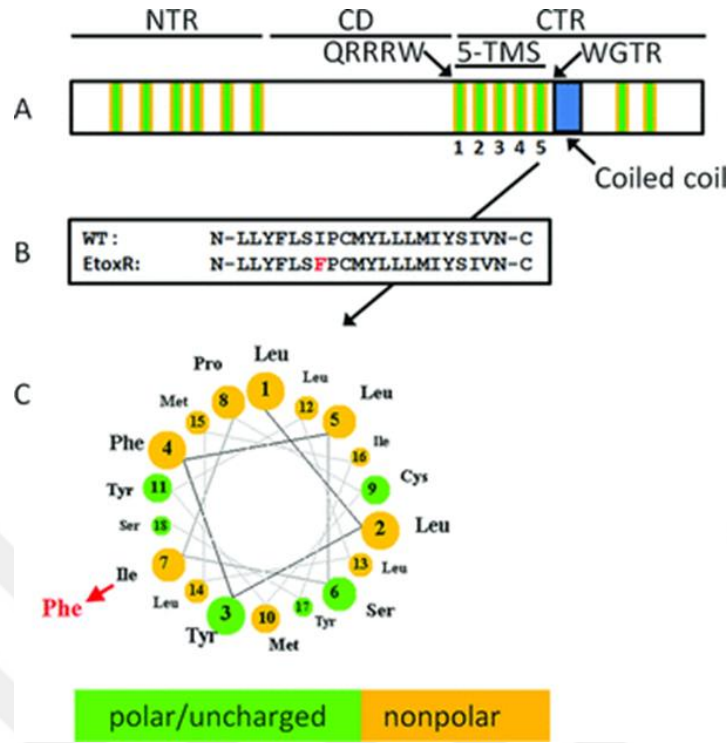
Şekil 5. Kitin oluşum aşamaları

A:hücre içi oluşum B: hücre membranına taşınması C:Hücre membranında yapının şekillenmesi



Şekil 6. Kitin yapısı (Çağlar 2005; Chaudhary *et al.* 2013)

sitoplazmaya dönük olduğu tahmin edilmektedir (Merzefonder, 2006; 2013) (Şekil 8). Bu enzim sadece Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Ca^{+2} gibi iki değerlikli katyonların varlığında aktif olmaktadır.



Şekil 8. *Tetranychus urticae*'de Kitin sentaz

1; A: Dikey çubuklar transmembran heliksleri göstermektedir. Oklar kitin sentaz imzaları olan QRRRW ve WGTR'yi ve tahmini bir sarmal bobin motifini (mavi) göstermektedir. NTR; N-terminal bölgesi, CD; katalitik alan, CTR; C-terminal bölgesi, 5-TMS; beş transmembran sarmalın transmembran segmenti. B: Yabani tip ve etoksazole dirençli *T. urticae* suşlarında 5-TMS kümesindeki 5. sarmalın amino asit dizileri. C: 5-TMS kümesinin 5. sarmalının sarmal tekerlek modeli (Merzendorfer, 2013).

Kitin Sentaz 1 Geni

Kitin sentaz enzimleri, kitin sentaz 1 (CHS-1) ve kitin sentaz 2 (CHS-2) geni olmak üzere iki gen tarafından kodlanmaktadır (Kumar *et al.* 2008). CHS1 geni, kütikülde ve trakeal hücrelerde kitin üretimini katalizlemek için gerekli olan enzimleri kodlayan epidermal hücrelerde eksprese olmakta iken CHS 2 geni, böcek orta bağırsağında kitin üretimi için enzimleri düzenleyen peritrofik membranda ifade olmaktadır (Zimoch and Merzefonder 2003; Zimoch *et al.* 2005; Moreira *et al.* 2007; Arakane *et al.* 2008; Mansur *et al.* 2014; Souza-Ferreira *et al.* 2014). Bu genler böcek büyüme ve gelişmesi boyunca farklı şekilde ifade edilir ve düzenlenirler (Wang *et al.* 2012).

Böcek CHS-1 geninin, CHS1a ve CHS1b şeklinde iki alternatif splayz varyant üretimi ile sonuçlanan alternatif ekzon içerdiği belirtilmiştir. İki varyant, şu ana kadar incelenen tüm böceklerde 59 amino asit kalıntısını kodlayan 177 baz çifti olan bir bölgede farklıdır (Shirk *et al.* 2015; Zhu *et al.* 2016; Wang *et al.* 2019). Bununla birlikte, CHS 2 geni için alternatif

splayz varyantlarına dair bir rapor şu ana kadar bulunmamaktadır (Zhang *et al.* 2010; Wang *et al.* 2012; Yang *et al.* 2013; Wang *et al.* 2019).

CHS-1 geni kütikülde ifade olduğundan dolayı birçok böcekte bulunmaktadır ancak peritrofik membranda ifade olan CHS-2 geni bazı böceklerde özellikle Hemiptera'larda peritrofik membran eksikliğinden dolayı daha az böcekte bulunmaktadır (Bansal *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012; Shang *et al.* 2016; Zhao *et al.* 2018; Ullah *et al.* 2020). Bu nedenle kitin biyosentezinin baskılanması için CHS-1 geni RNAi (RNA interference; RNA susturma) tabanlı böcek kontrolü için anahtar aday gendir (Wang *et al.* 2019).

Bu sonuçlar, CHS genlerinin hayatta kalma, ekdiz, doğurganlık ve yumurtadan çıkma için gerekli olduğunu göstermiştir. Özetlemek gerekirse, kitin biyosentezi, böcek büyümesi ve gelişimi için çok önemlidir ve kitin biyosentezine katılan CHS enzimleri, böcek zararlılarının kontrolü için yeni stratejilerin tasarımı için umut verici hedeflerdir.

Transkriptom (RNA-seq)

RNA molekülleri, tüm canlı hücrelerin temel bileşenleridir. Belirli bir koşul altında belirli bir hücrede bulunan her bir RNA molekülünün kimliğini ve miktarını anlamak, RNA araştırmalarının nihai amacıdır. RNA hakkında bildiklerimizin çoğu, az sayıda spesifik molekülün analiz edildiği biyokimyasal yöntemlerin kullanıldığı çalışmalardan gelmektedir. RNA dizilerinin geniş ölçekte analiz edilmesini sağlayan yüksek verimli yaklaşımlar 1990'ların başında ortaya çıkmıştır. Adams *et al.* (1992) tarafından geliştirilen ifade edilmiş sekans etiketi (expressed sequence tag: EST) yöntemi, tamamlayıcı DNA (cDNA) klonlarını kısmen dizileyerek gen ifadesini incelemektedir ve bu ifadeye karşılık gelen RNA'ların hem sekansını hem de miktarını ortaya çıkarmaktadır (Adams *et al.* 1992; Hrdlickova *et al.* 2017). EST verileri, 1990'larda genomlardaki yeni genlerin tanımlanmasında çok önemli bir rol oynamıştır. Bununla birlikte, yöntemin yüksek sekanslama maliyeti, ifade analizinde kullanımını sınırlandırmıştır. Ayrıca bu verilerin büyük ölçüde yarı-kantitatif olduğuna dair ciddi görüşler bulunmaktadır. Velculescu *et al.* (1995) tarafından geliştirilen Gen İfadesinin Seri Analizi (Serial Analysis of Gene Expression: SAGE) yöntemi ile cDNA başına yalnızca kısa bir etiket bölgesinin sıralaması sayesinde, gen başına esasına göre ifade analizinin maliyeti önemli ölçüde düşürülmüştür (Velculescu *et al.* 1995; Hrdlickova *et al.* 2017). 1990'ların ortalarında DNA mikrodizi teknolojisinin ortaya çıkması büyük ölçekli çalışmalar için daha uygun fiyatta olması gibi avantajları sayesinde gen ifade analizleri için kullanılan EST ve SAGE yöntemlerinin geride kalmasını sağlamıştır (Schena *et al.* 1995; Lockhart *et al.* 1996; Hrdlickova *et al.* 2017). Gen ifadelerinin DNA mikrodizi analizleri, transkriptlerden türetilen floresan etiketli hedeflerin, baskı veya yerinde sentez yoluyla katı bir yüzeye

tutturulmuş problemlere hibridizasyonuna dayanmaktadır. Ancak, yöntem genom çapında transkriptlerin araştırılmasını sağlarken, mikrodizi proplarının tasarlanması için bir öncü sekans bilgisinin veya referans genomların/transkriptlerin mevcut olması gerekliliği ve çapraz hibridizasyon ve arka plan sinyallerinin sıklıkla bazı genler için düşük spesifikliğe veya düşük hassasiyete yol açması bu teknolojinin geliştirilmesini ve uygulanmasını sınırlamıştır (Hrdlickova *et al.* 2017).

2000'li yılların başlarında yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing: NGS) olarak da bilinen büyük miktarda paralel sekanslama (dizileme) yöntemi ortaya çıkmıştır. Kısa sürede büyük miktarda veriyi elde etme avantajından dolayı biyoloji ve tıp alanlarında devrim niteliğinde övgü alan yeni nesil dizileme yöntemi RNA araştırmalarını da hızla geliştirmiştir. RNA dizileme (RNA-seq) artık gen ifadesini incelemek ve yeni RNA türlerini tanımlamak için tercih edilen yöntemdir (Nookaew *et al.* 2012; Adiconis *et al.* 2013; Li *et al.* 2014; Han *et al.* 2015).

Transkriptom, hem tip hem de miktar açısından bir hücredeki tüm transkriptler kümesidir (Yamada *et al.* 2003; Bertone *et al.* 2004; David *et al.* 2006). RNA-seq, yüksek verimli DNA sekanslama teknolojileri kullanılarak tamamlayıcı DNA'nın (cDNA) doğrudan (direkt olarak) sekanslanmasını ve sekanslama haritasını takiben genom okumasını içermektedir. RNA-seq, eksonların ve intronların tanımlanmasında, sınırlarının haritalanmasında, genlerin 5' ve 3' uçlarının tanımlanmasına izin vermesi bakımından ökaryotik karmaşıklığı konusunda şimdiye kadar mümkün olandan daha kapsamlı bir anlayış sağlamaktadır. Aynı zamanda RNA-seq transkripsiyon başlangıç alanlarının tanımlanmasına, yeni splayz varyantlarının tanımlanmasına, allel ifadesinin izlenmesine, ekzon ifadesinin ve splayz varyantlarının net bir şekilde sayısal ölçümüne de izin vermektedir (Cloonan *et al.* 2008; Marguerat *et al.* 2008; Morin *et al.* 2008; Mortazavi *et al.* 2008; Nagalakshmi *et al.* 2008; Shendure 2008; Wilhelm *et al.* 2008; Wang *et al.* 2009; Tsuchihara *et al.* 2009; Nagalakshmi *et al.* 2010).

Diğer teknolojilerle kıyaslandığında, RNA-seq çok yüksek bir sinyal-gürültü oranı ve çok geniş bir dinamik aralık sağlamaktadır. RNA-seq aynı zamanda biyolojik ve teknik kopyalar arasında yüksek bir korelasyon sağlayarak çok-tekrarlanabilir özelliktedir (Cloonan *et al.* 2008; Mortazavi *et al.* 2008; Nagalakshmi *et al.* 2008; Nagalakshmi *et al.* 2010). Yeterince sekanslanmış ve haritalanmış okunmalarla birlikte, hücre başına 1 ila 10 RNA molekülü bolluğunda bulunan nadir ancak fizyolojik olarak alakalı olan transkript türleri dahi tespit edilebilmektedir ve ölçülebilmektedir (Mortazavi *et al.* 2008). Bu nedenlerden dolayı, RNA-seq, transkriptomun yapısını tek baz çifti çözünürlükte analiz etmek, genomu açıklamak

ve genom ölçeğinde gen ifadesini ölçmek için güçlü bir yaklaşımdır (Nagalakshmi *et al.* 2010).

RNA-seq, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Bacillus halodurans* dahil olmak üzere birçok organizmada başarıyla kullanılmıştır (Nagalakshmi *et al.* 2008; Wilhelm *et al.* 2008; Cloonan *et al.* 2008; Mortazavi *et al.* 2008; Marioni *et al.* 2008; Lister *et al.* 2008; LaDeana *et al.* 2009).

Böceklerde Kitin Sentaz 1 Genine Yönelik Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları

Bolognesi *et al.* (2005) tarafından yapılan çalışmada *Spodoptera frugiperda*'da kitin sentaz geni için klonlama çalışması yapılmıştır. Birkaç transmembran segmenti içeren 1523 amino asit bir proteini kodlayan tüm cDNA sekansı (4,6 kb) elde edilmiştir. Bu veriler AY525599 erişim numarası ile GenBank veritabanında sunulmaktadır.

Wang *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada *Laodelphax striatellus* ve *Nilaparvata lugens*'te kitin sentaz 1 genleri klonlanmıştır. *L. striatellus*'daki *CHS1*'e ait cDNA sekansı 5084 bp'dir ve 4722 bp'lik bir açık okuma çerçevesi (ORF) ile tahmini molekül ağırlığı 180.8 kDa olan 1573 amino asit kalıntı peptidini kodlama potansiyeline sahiptir. Herhangi bir sinyal peptidi öngörülmemiştir. *N. lugens*'deki *CHS1*'in ORF'si 4737 bp uzunluğundadır ve muhtemel molekül ağırlığı 181 kDa olan 1578 amino asit kalıntı peptidini kodlama potansiyeline sahiptir.

Yang *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışmada *Bactrocera dorsalis*'de kitin sentaz 1 geni ve bu genin iki varyantına yönelik klonlama çalışması yapılmıştır. Tam uzunluklu cDNA, 1592 amino asit kalıntısından oluşan proteini kodlayan 4776 bp'lik ORF'ye sahip 5,552 nt'ten oluşmaktadır. cDNA, başlangıç kodonunun (ATG) 685 nt akış yukarısında yer alan 5' kodlanmayan bölgeyi (untranslated region (UTR) ve bir poli (A) kuyruğunda biten 88 nt'lik 3' UTR'yi içermektedir. Tahmini moleküler ağırlığı 180.7 kDa ve izoelektrik noktası 6,50 olan siyal peptidi olmayan amino asit dizisi elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada 3 alan öngörülmüştür: 10 transmembran sarmallı bir N-terminal alanı (A alanı), EDR ve QRRRW olmak üzere iki motifli, yüksek oranda korunmuş bir merkezi bölge (B bölgesi) ve ilave yedi transmembran sarmal içeren bir C-terminal bölgesi (C bölgesi). Yine bu çalışmada, 21, 911, 955 ve 1311 nt konumlarındaki dört potansiyel N-glikosilasyon bölgesi (N-X-S/T), ExPASy Proteomics web sitesinden NetNGLyc 1.0 yazılımı kullanılarak tahmin edilmiştir.

Shang *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada *Toxoptera citricida*'da kitin sentaz geni klonlanmıştır. Tam uzunluk doğrulama deneyleri kitin sentaz geninin cDNA dizisinin

tahmin edilen moleküler kütlesi 175,0 kDa ve izoelektrik noktası 6,31 olan 1567 amino asit kalıntısını kodlayan 4704 bp'lik bir ORF içerdiği gösterilmiştir. Kitin sentaz genlerinde 3 alan tahini yapılmıştır: dokuz transmembran sarmallı bir N-terminal bölgesi (A bölgesi), EDR (863–865) ve QRRRW (900–904) olmak üzere iki motifli yüksek oranda korunmuş bir merkezi alan içerdiği varsayılan katalitik bölge (B bölgesi), ilave yedi transmembran sarmalı içeren bir C terminal bölgesi (C bölgesi). Ayrıca, bu çalışmada NetNGLyc 1.0 yazılımı kullanılarak 12 N-glikosilasyon bölgesi tahmini yapılmıştır.

Wang et al. (2019) tarafından yapılan çalışmada *Sogatella furcifera*'de kitin sentaz 1 geni ve bu gene ait 2 varyant klonlanmıştır. İki varyantın (CHS1a ve CHS1b) 1572 amino asit kodlayan 4719 bp ORF içeren cDNA uzunlukları 6408 bp'dir. Elde edilen cDNA'lar 283 bp ve 1406 bp arasında 5' ve 3' kodlamayan bölgelere sahiptir. İki varyant, 4115 ve 4291 bp arasındaki cDNA dizisinde aynı pozisyonda meydana gelmektedir ve 59 amino asiti kodlayan ancak amino asit seviyesinde %74,6 özdeşlik gösteren 177 nükleotitten oluşmaktadır.

Shao et al. (2020) tarafından yapılan çalışmada *Glyphodes pyloalis Walker*'da kitin sentaz genleri (kitin sentaz A ve kitin sentaz B) klonlama çalışması yapılmıştır. NCBI GenBank veri tabanına kitin sentaz A geni verileri MN915086 ve kitin sentaz B geni MN915087 erişim numaralarıyla kayıt edilmiştir. Kitin sentaz A geninin tam uzunluğu 5955 bp'dir ve tahmin edilen molekül kütlesi 178.52 kDa ve izoelektrik noktası 6.54 olan 1564 amino asit proteinini kodlayan 4695 bp'lik bir ORF bölgesi içermektedir. Kitin sentaz B geninin tam uzunluğu 5896 bp'dir ve tahmin edilen molekül kütlesi 174.99 kDa ve izoelektrik noktası 6.27 olan 1529 amino asit proteinini kodlayan 4590 bp'lik bir ORF bölgesi içermektedir.

MATERYAL VE METOT

Kullanılan Kimyasallar

Tablo 1. Tez Dahilinde Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

KİMYASAL ADI	TEMİN EDİLEN ŞİRKET
Trizol Plus RNA Purification Kit	Thermo
Mops Bioperformance Certified, Cell Culture Tested,99	Sigma
Formamide	Merck
miSCRIPT II RT Kit	Qiagen
Beta-actin Antibody(C4)	Santra Cruz
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master MIX(2X)	Thermo
Primer	Oligomer
Merkaptoetanol	Sigma
Etil Alkol	Isolab
Sodyum Asetat	Merck
EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit)	ZAG Kimya
NaOH	Merck
Agarose	Sigma
Gel Loading Dye Blue (6X)	Biolabs
1 Kb DNA Ladder	GeneDirex
Ethidium bromide	Sigma
Formamide	Merck
TE Buffer	Invitrogen

Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

Tablo 2. Tez Dahilinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar

MATERYAL VE CİHAZLAR	MARKA
Etüv	Memmert
Buzdolabı+4°C	Arçelik
Derin Dondurucu -20 °C	Uğur
Derin Dondurucu -80 °C	Esco
Elektroforez	Biometra
Elektroforez Güç Kaynağı	Biometra
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Heidoph
pH Metre	Ohaus
Çeker Ocak	Labcaire
Real Time PCR	Qiagen
Doku Parçalayıcı	Qiagen
Vortex	Wisemiks
Hassas Terazı	Shimadzu
Manyetik Karıştırıcı	Wisestir
Su Banyosu	Wise Circu
PCR	Bioer
Mini Santrifüj	Lab-Met
Elektronik UV Görüntüleme	Ultra Lum Inc
Buz Makinesi	Scotsman
Saf Su Cihazı	GFL2001/2
Otoklav	Wiseclave
Mikrodalga Fırın	Arçelik
Aura PCR Kabini	Bioair
Pipetler	Eppendorf

Tablo 2. (Devamı)

Pipet uçları	Isolab
Mikrosantrifüj Tüpü (2 ML /1.5 ML)	Isolab
PCR Tüpü	Isolab
Strip Tüp	Qiagen
Saklama Kutusu	Isolab

Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı**Tablo 3. Tez Dahilinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı**

ÇÖZELTİ ADI	İÇERİK
Lizis Tamponu % 1-β Merkaptoetanol	RNA izolasnunda kullanılmak üzere 1mL Lizis buffer üzerine 10μL Merkaptoetanol eklenerek hazırlandı.
20 X mops	
1 X mops	10 mL 20 X MOPS 190 mL DEPC H2O ile seyreltili.
Mops jel	0.7 gr AGARÖZ 4.38 mL 20X MOPS 66.5 mL DEPC H2O 15.6 mL FORMAMİD Mikrodalga’da kaynatıldı ve musluk altında soğutuldu. 12.8 mL Et Br eklendi.
10X TBE tamponu	700 mL distile su içerisinde 108 g Tris-base, 55 g Borik asit ve 40 mL 0,5 M EDTA çözölmüştür. Toplam hacim 1000 mL’ye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır.
0,5X TBE tamponu	(50 mL 10X TBE Tamponu + 950 mL saf su) 0,5X TBE tamponu hazırlanmıştır.
Primerlerin Hazırlanması	Kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solösyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar ile 1 μM olacak şekilde çalışma solösyonları hazırlanmıştır.
% 1.8’lik agaroz	1.8 g agarose tartıldı 100 mL saf su ile çözöldü.
% 1’lik agaroz	1 g agarose tartıldı 100 mL saf su ile çözöldü.
%70’lik Etil Alkol	30 mL saf su üzerine 70 mL etil alkol eklenerek hazırlandı.
DEPC H2O	0.1 mL DEPC 100 mL suya eklendi ve alt üst edildi. 37 °C’de 12 saat bekletildikten sonra 15 dakika otoklav yapılarak kullanıma hazır hale getirildi.

Örneklerin Toplanması

Çalışmada kullanılan canlı materyalin (*Ricania simulans*) yumurta formu Rize’de Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi bahçesinden, nimf ve ergin formları ise Artvin’den temin edilmiştir. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Faköltesi Bitki Koruma Bölümü, Entomoloji Anabilim dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Erol YILDIRIM tarafından canlının *R. simulans* olduğu

doğrulanmıştır. Bu organizma için yapılan bu tezde etik kurul belgesine gerek duyulmamaktadır.

Örneklerin Çalışmaya Hazırlanması

Rize'den alınan yumurtalar ve Artvin'den canlı olarak getirilen nimf ve ergin formlar ependorf tüplerine alınmıştır. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden temin edilen sıvı azot ile bu örnekler dondurulmuştur. Örnekler daha sonra çalışmada kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Toplam RNA İzolasyonu

Örneklerden toplam RNA izolasyonu TRIzol® Plus RNA Saflaştırma Kiti (Katolog No: 12183555) kullanılarak steril kabin içerisinde yapılmıştır. İşlem basamakları kit protokolüne göre aşağıda verildiği şekilde takip edilmiştir:

1. Örneklerin parçalanması ve fazların ayrılması: Örneklerin 20-100 mg doku kütlesi için 1 mL TRIzol™® ilave edilmiştir ve bir homojenizatör kullanılarak homojenizasyon işlemi yapılmıştır. Nükleoprotein kompleksinin tamamen ayrışması için 5 dk boyunca inkübe edildikten sonra lizis için kullanılan 1 mL TRIzol™® reaktifi başına 0,2 mL kloroform eklenmiştir ve ependorf tüpü kapatılmıştır. 2-3 dk inkübasyon süresinden sonra örnekler 15 dk için $12,000 \times g$, 4°C koşullarında santrifüj edilmiştir. Karışım en altta kırmızı fenol-kloroform, ara faz ve en üstte renksiz sulu faz olacak şekilde ayrılmıştır. RNA'yı içeren renksiz sulu fazın yaklaşık 600 µL'si yeni bir tüpe aktarılmıştır. Tüpe eşit hacimde %70 etanol eklenmiştir ve vortekslenmiştir.
2. RNA'nın membrana bağlanması: 700 µL örnek bir spin kartuşuna (toplama tüpü ile birlikte) aktarılmıştır ve $12,000 \times g$ 'da 15 sn boyunca santrifüjlenmiştir. Toplama tüpünde geçen akıt atılarak spin kartuşu tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Tüm örnek işlenene kadar bu adımlar tekrarlanmıştır.
3. Membran üzerindeki RNA'nın yıkanması: 700 µL Yıkama Tamponu I (Wash Buffer I) spin kartuşuna eklenmiştir ve $12,000 \times g$ 'de 15 sn boyunca santrifüjlenmiştir. Toplama tüpünde geçen süpernatant atılarak spin kartuşu tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir. 500 µL Yıkama Tamponu II (Wash Buffer II) spin kartuşuna ilave edilmiştir ve $12,000 \times g$ 'de 15 sn boyunca santrifüjlenmiştir. Toplama tüpünde geçen süpernatant atılarak spin kartuşu tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Tüm örnek işlenene kadar bu adımlar (Yıkama Tamponu II kullanımından itibaren) tekrarlanmıştır.

4. RNA'nın ayrıştırılması: Membranı kurutmak için $12,000 \times g$ 'de 1 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Toplama tüpü atılarak spin kartuşu başka bir geri kazanım tüpü içine konulmuştur. Spin kartuşun ortasına gelecek şekilde $30 \mu L - 3 \times 100 \mu L$ (her bir $100 \mu L$ ile 3 ardışık elüsyon) RNase içermeyen su ilave edilmiştir. 1 dk inkübe edildikten sonra $12,000 \times g$ 'de 2 dk boyunca santrifüj işlemi yapılmıştır. Spin kartuş atılmıştır. Geri kazanım tüpü içerisinde saflaştırılmış RNA elde edilmiştir. RNA $-80^\circ C$ 'de muhafaza edilmiştir.

Toplam RNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi

Toplam RNA'nın nanodrop ölçümleri Doğu Anadolu İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM) yer alan Çift Işınlı Spektrofotometre/Thermo Electron Corporation Nicolet Evolution 100 ile ölçülmüştür.

Toplam RNA'nın elektroforezde yürütme işlemleri için aşağıdaki çözeltiler hazırlanmıştır:

1. 20xMOPS Çözeltisi: 41.9 gr MOPS, 6.8 gr sodyum asetat, 2.6 gr EDTA, 15 mL DEPC H₂O kullanılarak çözelti hazırlanmıştır. NaOH ile pH 7.0'a ayarlama yapılmıştır.
2. 1xMOPS Çözeltisi: 20xMOPS çözeltisinden 10 mL alınarak 190 mL DEPC H₂O kullanılarak yapılmıştır ve yürütme tamponu olarak kullanılmıştır.

Elektroforez işlemi için jel hazırlığı için 0,7 gr agaroz, 4,38 mL 20X MOPS, 66,5 mL DEPC'li su, 15,6 ml formamid mikrodalgada ısıtılmıştır ve musluk altında soğutulmuştur. 12,8 mL Etidyum Bromür (EtBr) ilave edildikten sonra jel dökülmüştür ve donması beklenmiştir. Bu esnada etüv $65^\circ C$ 'ye ayarlanmıştır. PCR tüplerine 0,5 mL MOPS, 5 mL formamid, 1 mL RNA örneği eklenmiştir ve vortekslenmiştir. 15 dk boyunca etüvde bekletilmiştir. Jel elektroforez küvetine yerleştirilmiştir. Örnekler boyanarak kuyulara aktarılmıştır. 90 V'da 30 dk yürütülmüştür ve değerlendirilmesi yapılmıştır.

Toplam RNA'dan cDNA Eldesi

RNA örnekleri miScript II RT Kit (Katolog No: 218193) ile steril kabin içerisinde çalışılmıştır. İşlem basamakları kit protokolüne göre aşağıda verildiği şekilde uygulanmıştır:

1. RNA'ları cDNA'ya çevirmek için kullanılan kit içerisindeki bufferlardan 5X miScript HiSpec Buffer seçilmiş ve çözeltiler buz üzerinde çözündükten sonra çalışmaya başlanmıştır. Bozulma riskini en aza indirmek için tüm reaksiyonlar buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kit içerisinde enzim bulunduğu için tüplere hafifçe vurularak

karışması sağladıktan sonra tüplerin kenarlarında kalan sıvıları toplamak amacıyla kısa santrifüj yapılarak çözeltiler tekrar buz üzerine alınmıştır.

2. Kit protokolüne uygun olarak çalışma solusyonu hazırlanmıştır. Tablo 4'te belirtilen miktarlara göre çalışma solusyonu hazırlandıktan sonra her bir örnek için toplam hacim RNase-free water ile 20µL'ye tamamlanmıştır.

Tablo 4. cDNA Eldesi İçin Hazırlanan Çalışma Solüsyon Karışımı

5X miScript HiSpec Buffer	4µL
10X miScript Nucleus Mix	2µL
miScript Reverse Transcriptase Mix	2µL
Template RNA	1µL
RNase-free Water	11µL
Toplam Reaksiyon Hacmi	20µL

Hazırlanan örnekler Reverse Transcriptase PCR yapılarak cDNA'lar oluşturulmuştur. RT-PCR şartları şu şekildedir: Birinci aşama: 37,0°C 60 dk, ikinci aşamada 95,0°C 5 dk, üçüncü aşamada ise 4,0°C ∞ işlem başlatılmıştır. Elde edilen cDNA örnekleri çalışmanın yapılacağı güne kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

cDNA Örneklerinin Kantitatif ve Kalitatif Analizi

Hazırlanan cDNA'nın elektroforezde yürütme işlemleri için aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir:

1.0 gr agaroz 100-110 mL 0.5 X TBE ile mikrodalgada ısıtılmıştır ve musluk altında soğutulmuştur. 3 µL EtBr ilave edildikten sonra jel dökülmüştür ve donması beklenmiştir. Küvet 0,5X TBE tampon ile doldurularak donan jel elektroforez küvetine yerleştirilmiştir, ilk kuyuya 2µL örnekler boyanarak kuyulara aktarılmıştır. 90 V'da 30 dk yürütülmüştür ve görüntüleme cihazında UV altında görüntülenerek değerlendirmesi yapılmıştır.

RNA-seq Transkriptom Analizi için RNA Örneklerinin Hazırlanması

RNA-seq transkriptom analizi, Genoks Teknoloji (Anonymous p 2021) aracılığı ile BGI-HONGKONG CO. LIMITED (Çin, Hong Kong) şirketinde hizmet alımı ile yaptırılmıştır. 1 yumurta, 2 nimf ve 2 ergin form için elde edilen toplam RNA örnekleri (ilgili örnekler için 150 yumurta, 60 nimf ve 60 ergin *R. simulans* kullanılmıştır) ökaryotik RNA-seq transkriptom analizi için hazırlanmıştır. Bu örnekler 2 mL'lik ependorf tüplerine konulmuştur ve isimlendirme içeren etiketleme yapılmıştır. Nanodrop ölçüm verileri bu etiketlere ilave edilmiştir. Şekil 8'de BGI tarafından talep edilen miktarlar dikkate alınarak hazırlanan toplam RNA örneklerini içeren ependorf tüpleri, 50 mL'lik santrifüj tüpleri

içerisine hareket etmesini önleyecek şekilde desteklenerek (kağıt havlu, pamuk vasıtasıyla) yerleştirilmiştir. Daha sonra bu santrifüj tüpleri kuru buz içerisinde Genoks Teknoloji'ye ulaştırılmıştır ve analize yönelik süreç başlamıştır.

Sample Submission Guideline

Document NO.: SOP-SMM-003 Version NO.: A5 Page 18 of 58

Table 7: Requirements of Illumina Platforms-RNA samples

Product Name	Library Type	Sample Type	Remarks	Agilent Bioanalyzer			
				Volume Range	Quantity	Concentration, RIN, 28S/18S(23S/16S)	NanoDrop™
Transcriptome Resequencing, de novo Transcriptome Assembly, Strand Specific Transcriptome	Eukaryotic Transcriptome Library	Total RNA of Fungi	Strongly Recommended	15 µL - 100 µL	m≥2 µg	≤40 ng/µL; RIN≥6.5; 28S/18S≥1.0	The baseline is smooth and 5S peak is normal. OD260/280≥1.8; OD260/230≥1.8
		Total RNA of Plant	Strongly Recommended	15 µL - 100 µL	m≥2 µg	≤20 ng/µL; RIN≥6.5; 28S/18S≥1.0	The baseline is smooth and 5S peak is normal. OD260/280≥1.8; OD260/230≥1.8
		Total RNA of Insect	Strongly Recommended	15 µL - 100 µL	m≥2 µg	≤20 ng/µL	The baseline is smooth and 5S peak is normal. N/A
		Total RNA of Human, Rat and Mice	Strongly Recommended	15 µL - 100 µL	m≥0.4 µg	≤20 ng/µL; RIN≥7.0; 28S/18S≥1.0	The baseline is smooth and 5S peak is normal. N/A
		Total RNA of other Animals	Strongly Recommended	15 µL - 100 µL	m≥2 µg	≤20 ng/µL; RIN≥7.0; 28S/18S≥1.0	The baseline is smooth and 5S peak is normal. N/A
		dsDNA except PCR products and fragmented samples.	Strongly Recommended	15 µL - 100 µL	m≥2 µg	≤15 ng/µL	Mainly fragment>1K. 1.8≤OD260/280≤2.2
			Required		1 µg≤m<2 µg		
			Required		1 µg≤m<2 µg		

Şekil 9. BGI örnek hazırlama rehberi

RNA-seq transkriptom dizileme yöntemi 6 aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar:

1. RNA Depletion (azaltma): RNA dizileme için hedef RNA'ya göre RNA'larda azaltma yapılmaktadır. mRNA ve uzun kodlanmayan RNA'lar (long-noncoding RNA:lncRNA) benzer uzunlukta olduğu için aynı kütüphane ve sekans çipi ile çalışılmaktadır. Ancak, daha az baz çifti içeren miRNA'lar (microRNA) mRNA ve lncRNA'lar ile aynı kütüphane ve çip kullanılarak çalışmaya dahil edilmemektedir ve ara işlem basamakları gerektirmektedir. İş akışındaki ilk adım, poli-T oligoya bağlı manyetik boncuklar kullanarak poli-A içeren mRNA moleküllerinin saflaştırılmasını içermektedir.
2. Parçalama: RNA azaltılmasından sonra mRNA, yüksek sıcaklık altında iki değerli katyonlar kullanılarak küçük parçalara ayrılmaktadır. Bu işlem enzim veya ses ile yapılabilir.
3. cDNA Sentezi: Bölünmüş RNA fragmanları, ters transkriptaz ve rastgele primerleri kullanarak tek zincirli cDNA'ya çevirmektedir. Bunu DNA Polimeraz I ve RNase H kullanarak ikinci iplikli cDNA sentezi izlemektedir.
4. Kütüphane Hazırlığı: Manyetik boncuklarla toplanan bu DNA parçalarının uçları onarılmaktadır (son onarım) ve 3' uçlarına adenin eklenmektedir. Bir sonraki

adımında ligasyona temelli olarak fragmanlara adaptörler ve barkodlar eklenmektedir ve ilk PCR adımı başlatılmaktadır.

5. Daireselleştirme: Standart teknolojilerin aksine, ikinci PCR aşaması, DNA'yı "daireelleştirme" adı verilen bir aşama ile yuvarlak bir zincire dönüştürerek aynı zincir üzerinde DNA Nanoball (DNB) oluşturmaktadır ve böylece PCR hatalarını en aza indirmektedir. DNA'yı dairesel hale getirmek için bir splint oligo da kullanılabilir.
6. Dizileme: Oluşturulan her bir DNB, DNBSEQ G-400 dizileme platformundaki akış hücresindeki (Pattern Array) noktalara yerleştirilmektedir. Akış hücresinde (Flow Cell) sekans işlemi gerçekleştirilmektedir. Klasik dizileme yönteminde olduğu gibi, farklı boylarla işaretlenmiş modifiye edilmiş dNTP'leri içeren reaksiyon çözeltisi akış hücresine yüklenmektedir. DNBSEQ G-400 cihazı, cPAS veya CoolMPS teknolojisini kullanarak her Nanoball'daki bazların okunmasını sağlamaktadır. Dizileme süreci primer bağlama ve dizileme solüsyonunun akış hücresine yüklenmesi, primer sonrası bazın bağlanması, görüntüleme, ayrılma, ortamdaki bağlı olmayan bazların kaldırılması gibi aşamalardan oluşmaktadır. cPAS dizileme teknolojisi, DNB üzerindeki DNA'ya floresansla modifiye edilmiş dNTP ekleyerek yüksek çözünürlüklü dijital görüntüleme prensibi üzerinde çalışmaktadır. CoolMPS dizileme teknolojisinde, dizileme floresan dNTP'ler ile değil, özel olarak tasarlanmış "antikorlar" ile yapılmaktadır. Her iki sekanslama teknolojisinde de sinyalizasyon artarken hata oranı azaltılmaktadır. DNBSEQ G-400 cihazında aynı anda 2 çip (Flow Cell) çalıştırılarak, okumaya göre maksimum 1440 Gb (1,4TB)'ye kadar değişken ve yüksek veri çıkışı elde edilebilmektedir.

Biyoinformatik Analizler

Temiz okumaları elde etmek için ilk önce, düşük okuma değerlerininin, adaptör okumaları, bilinmeyen bazların okumaların (N bazları %5'ten fazla) filtrelenmesi yapılmaktadır. Daha sonra bu temiz okumalar ile yeni gen tahmini yapılmaktadır. Son olarak, örnekler arasındaki farklı şekilde ifade (ekspres) edilmiş genleri tespit edilmektedir ve kümeleme analizi ve işlevsel ek açıklamalar yapılmaktadır.

1. Transkriptom Sekanslama Prosedürü: İlk olarak, düşük kaliteli okumalar (%20 den fazlası 10'dan az kalite skoruna sahip fragmentler), adaptör içeren fragmentler, bilinmeyen baz içeren fragmentler (%5'ten fazla N içerenler) filtrelenmektedir. Ardından bu okumalar, referans genoma hizalanmaktadır ve özgün gen analizi

yapılmaktadır. Ardından da kümeleme ve fonksiyonel anotasyon işlemleriyle görselleştirmeler yapılmaktadır.

2. Genom Haritalama: Hizalama işlemi HISAT2 (Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts) ile yapılmaktadır. HISAT2 RNA-Seq veri setleri için hassas bir hizalama olanağı sağlamaktadır.
3. Özgün Transkript Analizi: Transkriptler StringTie ile yeniden bir araya getirilip, birleştirilmiş bir GTF dosyası elde edilerek, ardından örneklerin birleştirilmiş GTF ile kıyaslanmasıyla özgün transkriptler bulunmasında kullanılmaktadır.

Real Time PCR Çalışması

Yumurta, nimf ve ergin *R. simulans* örneklerinde kitin sentaz 1 geninin ifade çalışması için transkriptom çalışmasından elde edilen kitin sentaz 1 genine ait dizilime özgü primerler kullanılarak Real time PCR çalışması yapılmıştır.

Çalışmada housekeeping gen olarak Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (Gapdh) kullanılmıştır. Bu gene ait primerler yine transkriptom çalışmasından elde edilen Gapdh genine ait dizilimden yararlanılarak dizayn edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada Kullanılan qRT-PCR Primerlerine Ait Bilgiler

Gen Adı	İleri Primer	Geri Primer
CHS1	GAAGACACCCATTGCAGCAAG	CTTCACACGTACCATGCATGC
GAPDH	AAAGATGGAGCTGCGAGGATC	ACACTGTCAGGCTGGAGAAAG

Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(2x) kiti kullanılarak auro PCR kabini içerisinde PCR tüpleri içerisine 10µL SYBR Green, 4.2 µL DNase/RNase free saf su, 0.4 µL ileri primer, 0.4 µL geri primer ve 5 µL örnek cDNA’sı eklenmiştir. Çalışmalar iki tekerrürlü olarak yürütülmüştür (Böhne 2012).

Tablo 6’da çalışmada kullanılan real time PCR protokolü verilmiştir.

Tablo 6. Real Time PCR Protokolü

Program	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Ön denetasyon	1	90	15 dk
		95	20 sn
Döngü	40	60	30 sn
		72	30 sn

Real Time PCR çalışması sonunda Rotor Gene cihazının analiz programına göre amplifikasyon grafikleri değerlendirilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI

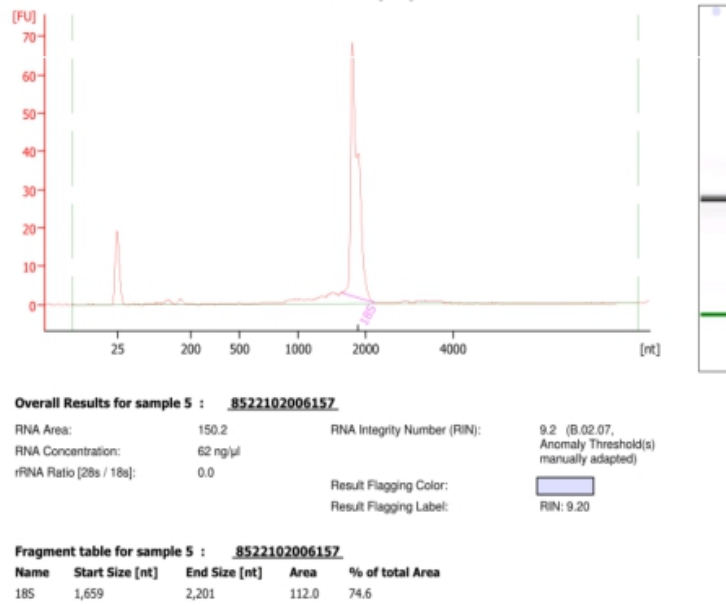
Örneklerin RNA Kalite Değerleri

BGI şirketine gönderilen toplam RNA örneklerinin kalitesi Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı ile Agilent RNA 6000 nanoReagents Part 1 kiti kullanılarak belirlenmiştir. Ölçüm sonuçları Tablo 7’de gösterilmiştir.

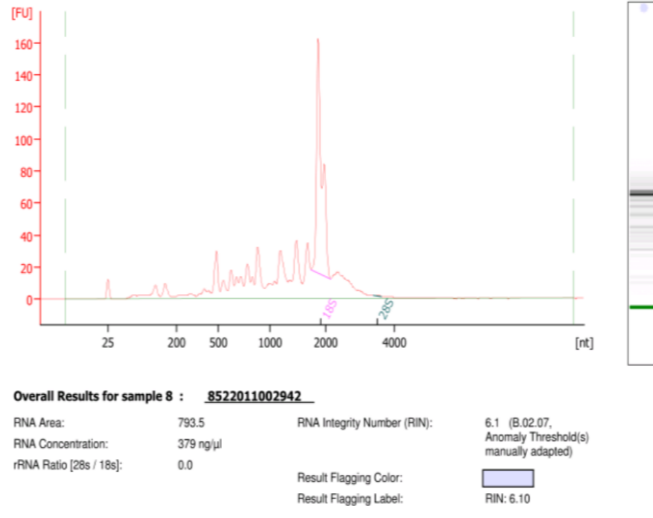
Tablo 7. Örnek Test Sonuçları

Örnek	Konsantrasyon (ng/μL)	Hacim (μL)	Total Kütle (μg)	RNA Bütünlük Sayısı	28S/18S	Kütüphane Tipi
Yumurta	62	66	4.09	9.2	0.0	DNBSEQ Transkriptom
Nimf1	379	70	26.53	6.1	0.0	DNBSEQ Transkriptom
Nimf2	341	184	62.74	6.1	0.0	DNBSEQ Transkriptom
Ergin1	117	37	43.29	9.2	0.1	DNBSEQ Transkriptom
Ergin2	640	138	88.32	7.2	0.1	DNBSEQ Transkriptom

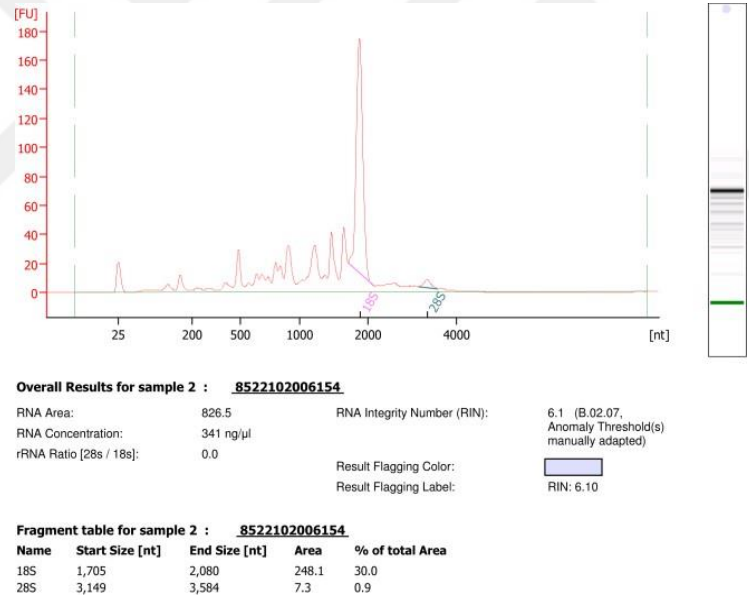
Toplam RNA örneklerinin Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı ve parça analizörü (Fragment Analyzer) ile kalite ölçüm grafikleri yumurta, nimf1, nimf2, ergin1 ve ergin2 için sırasıyla Şekil 10, Şekil 11, Şekil 12, Şekil 13 ve Şekil 14’te verilmiştir.



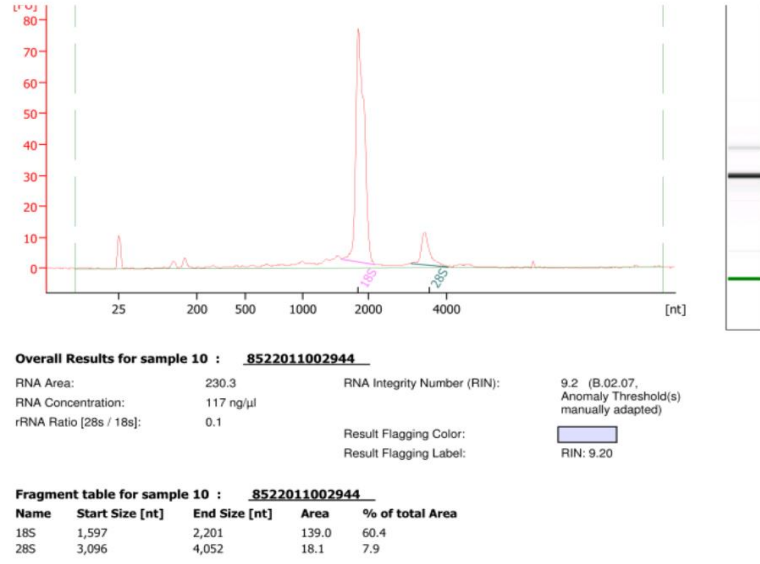
Şekil 10. Yumurta örnek kalitesi



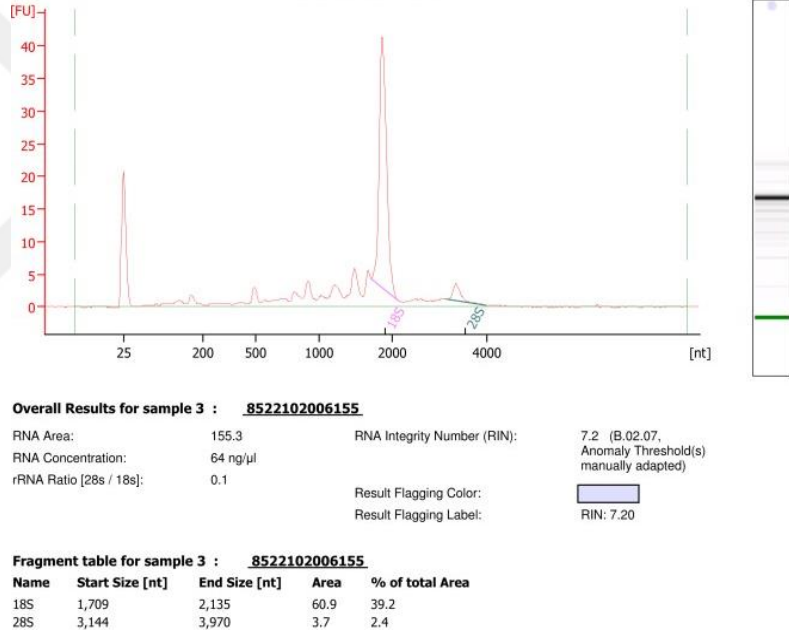
Şekil 11. Nimf1 örnek kalitesi



Şekil 12. Nimf2 örnek kalitesi



Şekil 13. Ergin1 örnek kalitesi



Şekil 14. Ergin2 örnek kalitesi

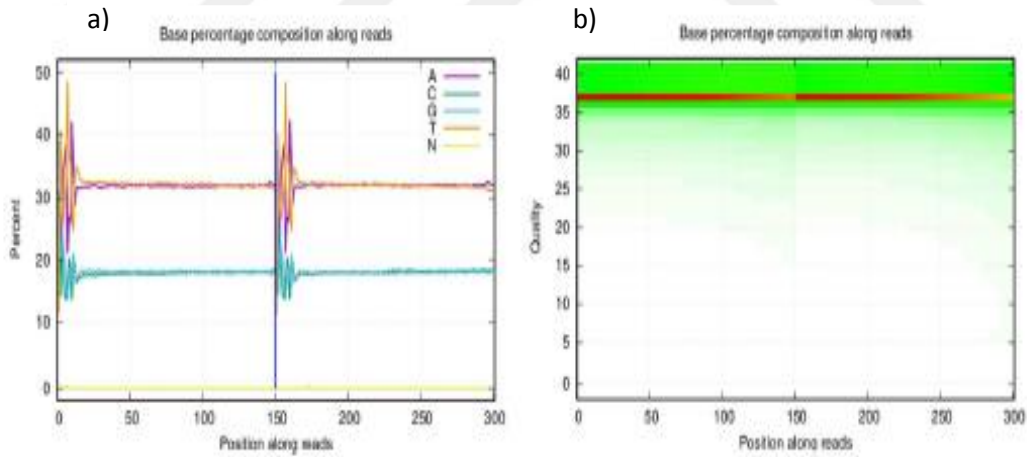
RNA-seq Transkriptom Analiz Sonuçları

Yumurta, nimf1, nimf2, ergin1 ve ergin2 örneklerinden elde edilen Total RNA örnekleri üzerinden iki uçlu sekanslama stratejisi ile MGI-Seq 2000 dizileme platformunda toplamda yaklaşık 38 Gb veri üretilmiştir. Tüm örneklerin bir araya getirilmesinden sonra 509.137 dizi elde edilmiştir. Transkriptlerin toplam uzunluğu, ortalama uzunluğu, N50 değeri ve GC içeriği sırasıyla 370106677 bp, 727 bp, 1203 bp ve %35, 27'dir. Okumaların istatistik sonuçları Tablo 6'da verilmiştir. Transkriptlerin açıklamaları TRAPID 2.0 web uygulaması kullanılarak yapılmıştır ve KEGG ve GO fonksiyonel veri tabanlarına not edilmiştir.

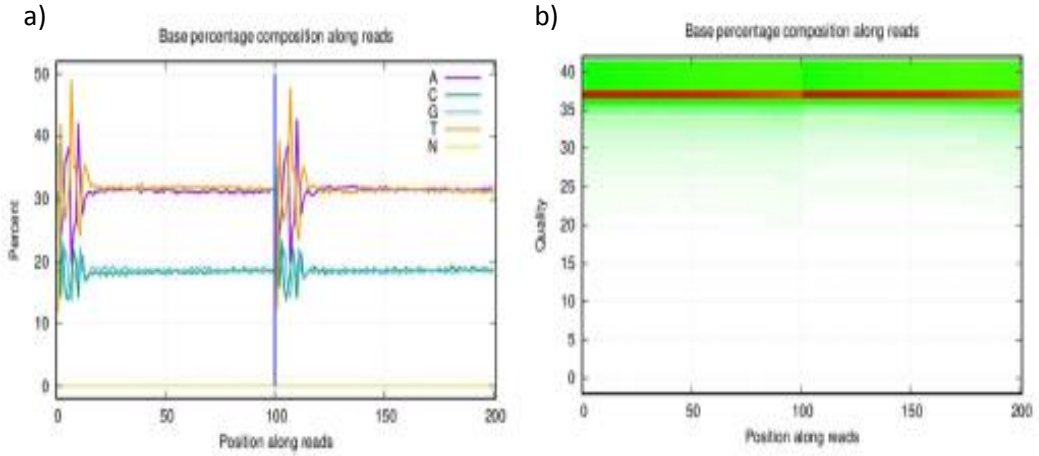
Tablo 8. Okumaların İstatistik Sonuçları

Örnek	Okunan Baz Miktarı	Toplam Uzunluk	Ortalama Uzunluk (Fragman Sayısı)	Q20(%)	Q30(%)
Yumurta (ileri okuma)	20.577.392	3.086.608.800	150.0	97.28	89.52
Yumurta (geri okuma)	20.577.392	3.086.608.800	150.0	96.46	88.12
Nimf1 (ileri okuma)	56.090.598	5.609.059.800	100.0	98.03	91.23
Nimf1 (geri okuma)	56.090.598	5.609.059.800	100.0	98.48	92.94
Nimf2 (ileri okuma)	20.516.932	3.077.539.800	150.0	97.37	89.87
Nimf2 (geri okuma)	20.516.932	3.077.539.800	150.0	96.73	88.95
Ergin1 (ileri okuma)	46.113.167	4.611.316.700	100.0	98.12	91.42
Ergin1 (geri okuma)	46.113.167	4.611.316.700	100.0	98.38	92.41
Ergin2 (ileri okuma)	20.086.160	3.012.924.000	150.0	97.31	89.59
Ergin2 (geri okuma)	20.086.160	3.012.924.000	150.0	96.30	87.72

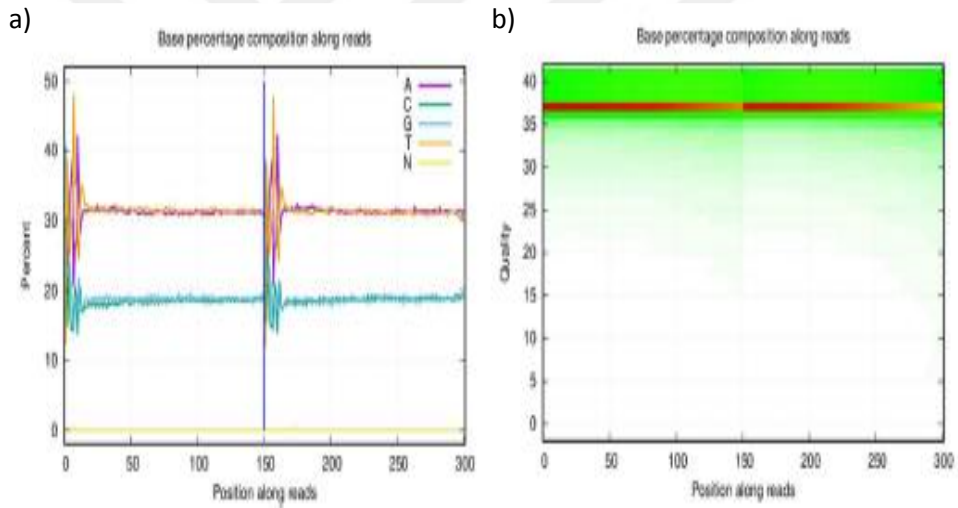
Veri filtrelemedeki okumalar boyunca baz yüzdesi ve kalite dağılımı yumurta, nimf1, nimf2, ergin1 ve ergin2 örnekleri için sırasıyla Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18 ve Şekil 19’da verilmiştir.



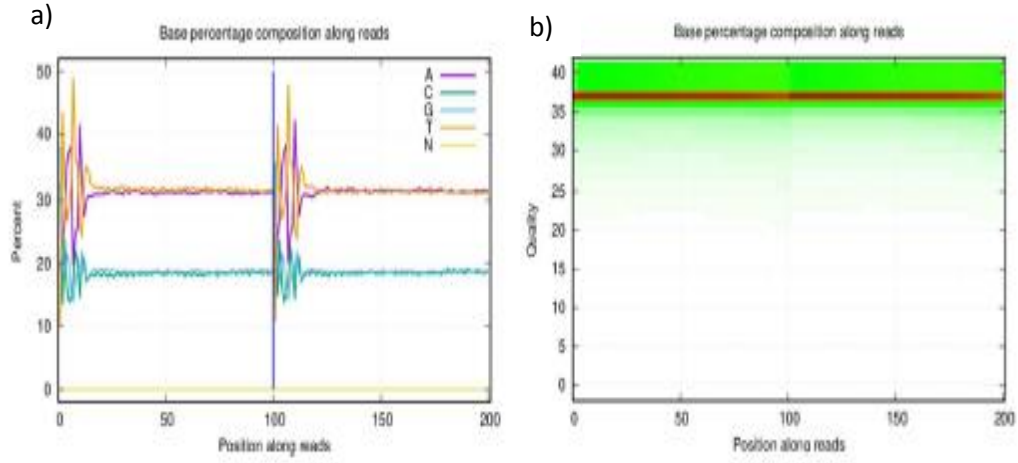
Şekil 15. Yumurta örneği için a) numunenin filtrenmesinden sonra okumalar boyunca baz yüzde dağılımı b) numunenin filtrenmesinden sonra okumalar boyunca kalite dağılımı



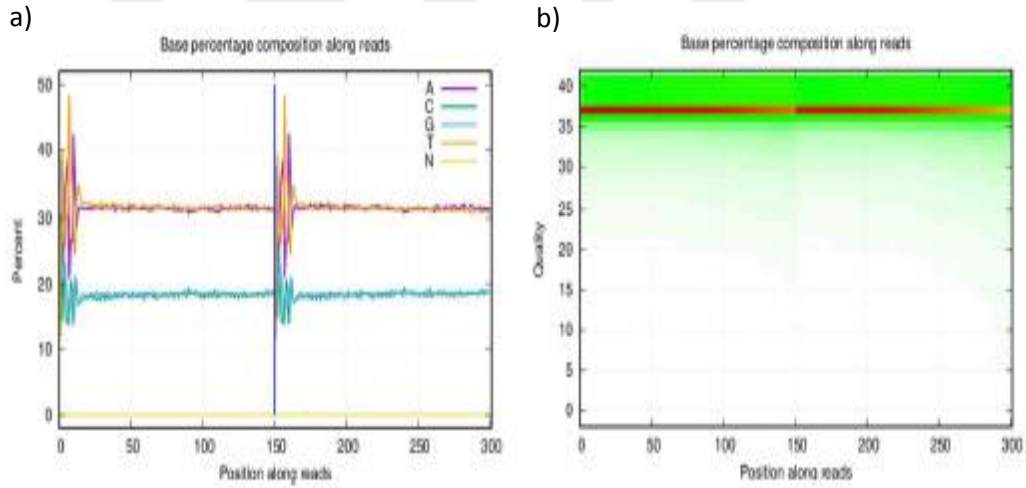
Şekil 16. Nimf1 örneği için a) numunenin filtrenmesinden sonra okumalar boyunca baz yüzde dağılımı b) numunenin filtrenmesinden sonra okumalar boyunca kalite dağılımı



Şekil 17. Nimf2 örneği için a) numunenin filtrenmesinden sonra okumalar boyunca baz yüzde dağılımı b) numunenin filtrenmesinden sonra okumalar boyunca kalite dağılımı



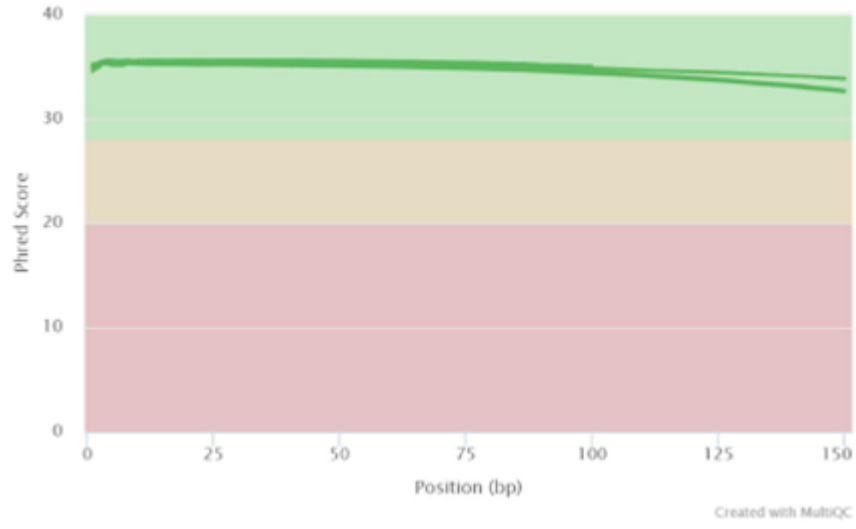
Şekil 18. Ergin1 örneği için a) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca baz yüzde dağılımı b) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca kalite dağılımı



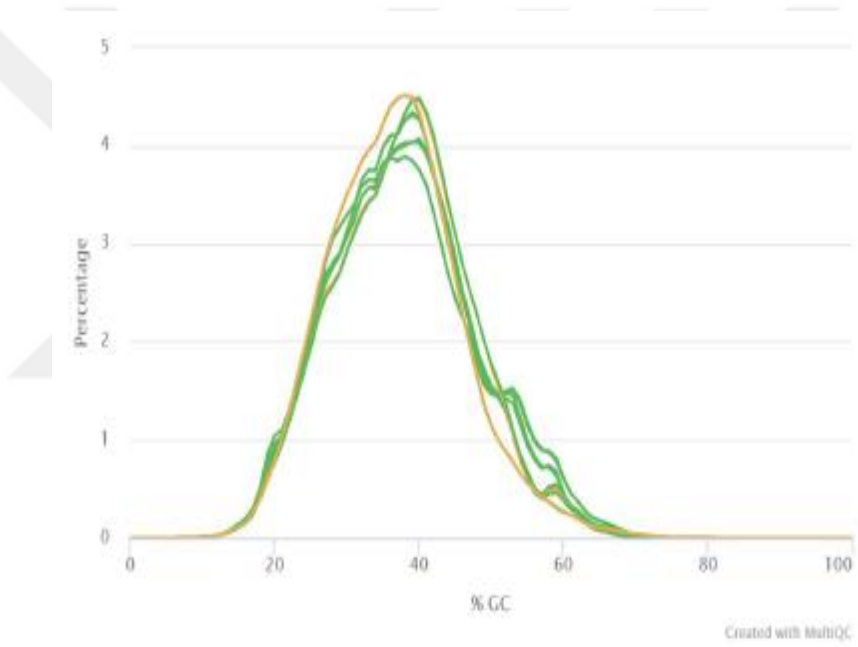
Şekil 19. Ergin2 örneği için a) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca baz yüzde dağılımı b) numunenin filtrelenmesinden sonra okumalar boyunca kalite dağılımı

Ham Okumaların Kalite Kontrolü

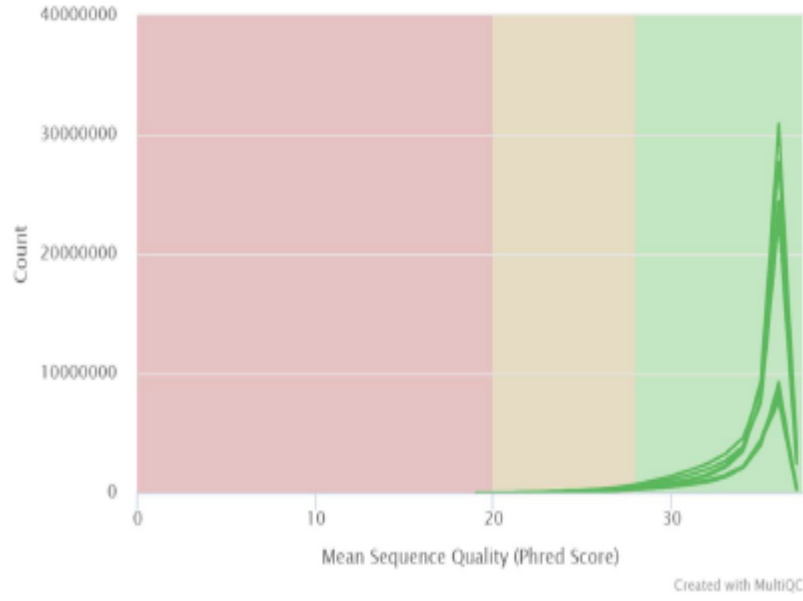
Sekanslamadan sonra, okumaların kalite kontrolü FastQC (v0.11.9) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Her okumanın kalite kontrolünden sonra, MultiQC (v1.10.1) FastQC sonuçlarını birleştirmek için kullanılmıştır. MultiQC'den elde edilen istatistikler olan FastQC: ortalama kalite skorları, sekans başına GC içeriği, sekans başına kalite skorları ve sekans çoğaltma seviyeleri sırasıyla Şekil 19, Şekil 20, Şekil 21 ve Şekil 22'de verilmiştir.



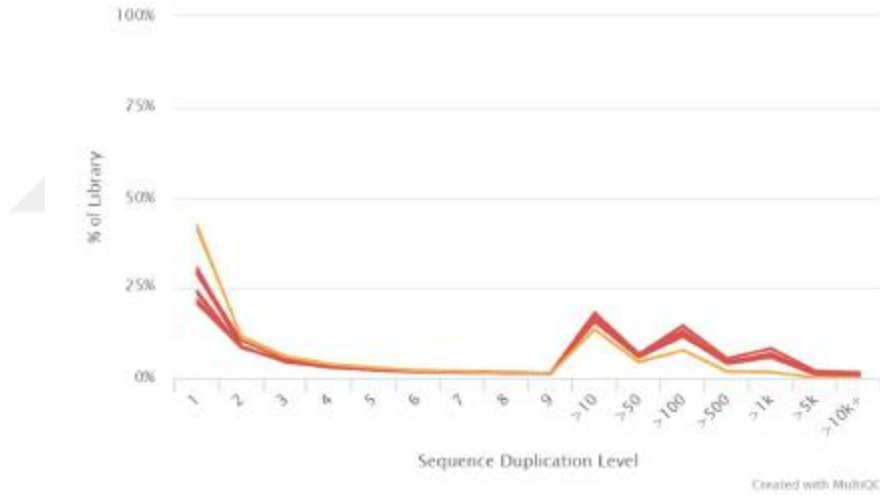
Şekil 20. FastQC: ortalama kalite skorları



Şekil 21. FastQC: Sekans başına GC içeriği



Şekil 22. FastQC: Sekans başına kalite skorları



Şekil 23. FastQC: Sekans çoğaltma seviyeleri

De Novo Birleştirmeleri

Referans genomu olmayan bu canlı için, 163.384.249 iki uçlu okuma, sonraki analiz için referans dizisini almak üzere 590.137 transkript halinde birleştirilmiştir. Temiz okumalarla de novo montajı gerçekleştirmek için Trinity kullanılmıştır, transkriptlerin kalitesi metrikleri Tablo 9’da gösterilmektedir:

Tablo 9. Transkriplerin kalite metrikleri

Örnek	Sekans Sayısı	Toplam Uzunluk (nt)	Ortalama Uzunluk (nt)	N50(nt)	GC(%)
Trinity.fasta	509137	370106677	727	1203	35.27

De novo transkriptom tamlık (eksiksizlik) analizi BUSCO v.5'in (Arthropoda)'nın çevrimiçi aracı gVolante2 kullanılarak yapılmıştır ve Tablo 10'da verilmiştir. Ayrıca tam ve kayıp ortologların dağılımı Şekil 24'te verilmiştir.

Tablo 10. De Novo Tamlık Değerlendirme Sonuçları

Parametre	
Sorgulanan toplam çekirdek gen sayısı	1013
Tespit edilen çekirdek genlerin sayısı	Tam 999(%98.62) Tam+Kısmi 1008 (%99.51)
Kayıp çekirdek genlerin sayısı	5(%0.49)
Çekirdek gen başına ortalama ortolog sayısı	2.62
Bir ortologtan daha fazlasına sahip çekirdek genlerin %'si	61.46
BUSCO formatında skorlar	C:%98.6 [S:%38.0, D:%60.6], F:%0.9, M:%0.5



Şekil 24. Tam ve kayıp ortologların dağılımı

Gen İfade Seviyeleri

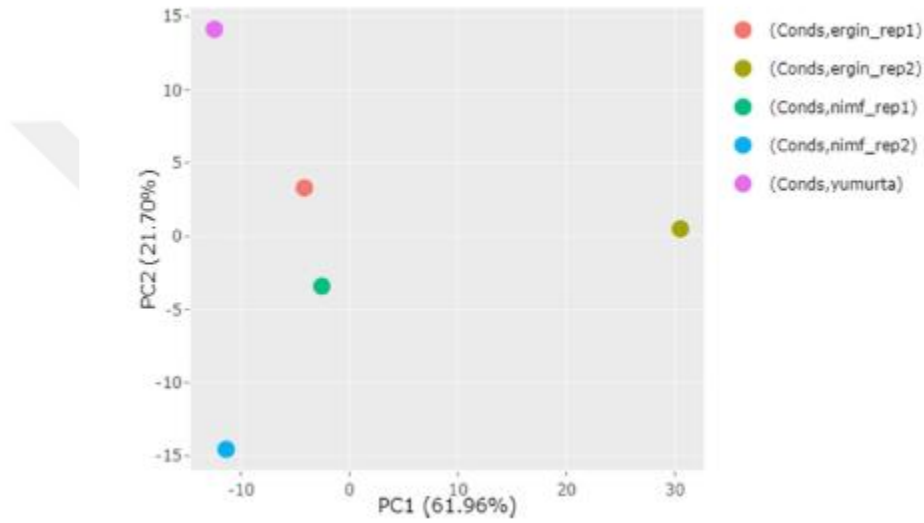
Değerlendirme sonuçlarına dayalı olarak her örnek için yapılan bütün temiz okumalar Bowtie2 yazılımı ile haritalanmıştır ve gen ekspresyon seviyeleri RSEM ile hesaplanmıştır. Hizalama (alignment) sonuçları Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Hizalama (Alignment) Sonuçları

Örnek	Toplam baz	Toplam okuma	Toplam haritalanan okuma	Haritalanmayan okumalar
Yumurta	3.086.608.800	20.577.392	14.324.602	6.252.790
Nimf1	5.609.059.800	56.090.598	45.790.794	10.299.804
Nimf2	3.077.539.800	20.516.932	14.842.990	5.673.942
Ergin1	4.611.316.700	46.113.167	38.750.542	7.362.625
Ergin2	3.012.924.000	20.086.160	14.310.776	5.775.384

Temel Bileşenler Analizi

Temel bileşenler analizi (PCA), muhtemelen ilişkili değişkenlerin bir dizi gözlemini, temel bileşenler adı verilen doğrusal olarak ilişkisiz değişkenlerin bir dizi değerine dönüştürmek için ortogonal bir dönüşüm kullanan çok değişkenli bir istatistiksel prosedürdür. Temel bileşenlerin sayısı, orijinal değişkenlerin sayısından az veya ona eşittir. Transkriptom dizileme verilerinin analizinde, PCA, aykırı değerleri ve yüksek benzerlik kümelerini tanımlamak için karşılaştırma için büyük miktarda gen bilgisini birkaç bağımsız temel bileşene indirgemektedir. Temel bileşenler analiz sonuçları Şekil 24'te verilmiştir.



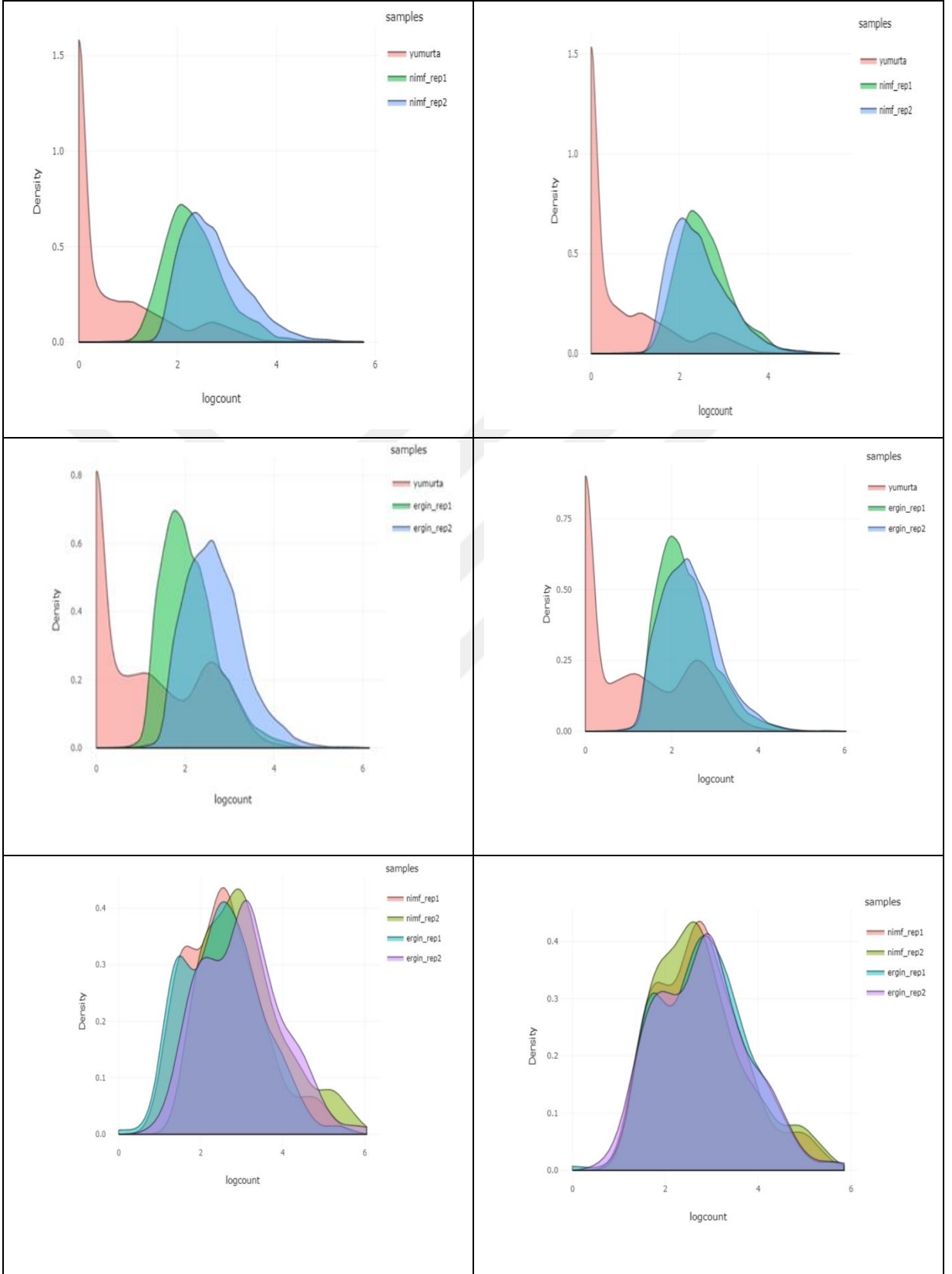
Şekil 25. Temel bileşenler analizi

Farklı İfade Olmuş Genlerin (DEGs) Tespiti

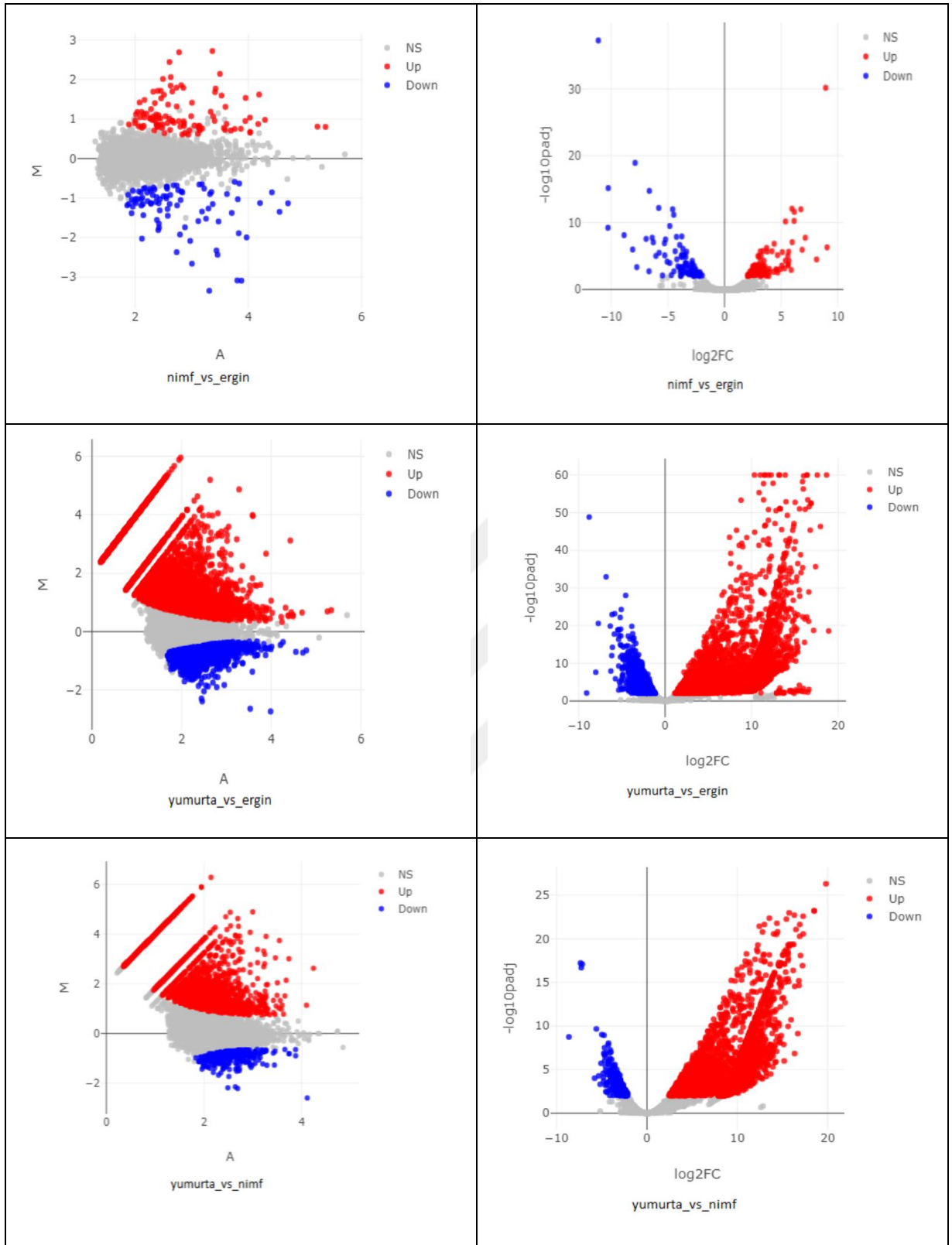
Gen ifade seviyesine dayalı olarak, DEG'ler (Differential expression genes) 3 evre (yumurta, nimf ve ergin) arasında tanımlanmıştır. DESeq2 algoritması ile DEBrowser kullanılarak elde edilen DEG'ler karşılaştırılan gruplarla birlikte Şekil 26'da verilmiştir.

MA grafiği, genomik verilerin görsel temsili için bir Bland-Altman grafiğinin bir uygulamasıdır. Çizim, verileri M (log oranı) ve A (ortalama) ölçeklerine dönüştürerek ve ardından bu değerleri çizerek iki numunede alınan ölçümler arasındaki farkları görselleştirmektedir. Orijinal olarak çift yönlü DNA mikrodizi gen ifade verileri bağlamında uygulanmasına rağmen, MA grafikleri ayrıca yüksek verimli dizileme analizini görselleştirmek için kullanılmaktadır. Volcano grafiği, değişimin büyüklüğüne (Fold change: kat değişimi) karşı istatistiksel önemi (P value: P değeri) gösteren bir dağılım grafiği türüdür. İstatistiksel olarak da önemli olan büyük kat değişiklikleriyle genlerin hızlı görsel olarak

tanımlanmasını sağlamaktadır. DEG'lere ait MA ve Volcano grafikleri Şekil 27'de verilmiştir.

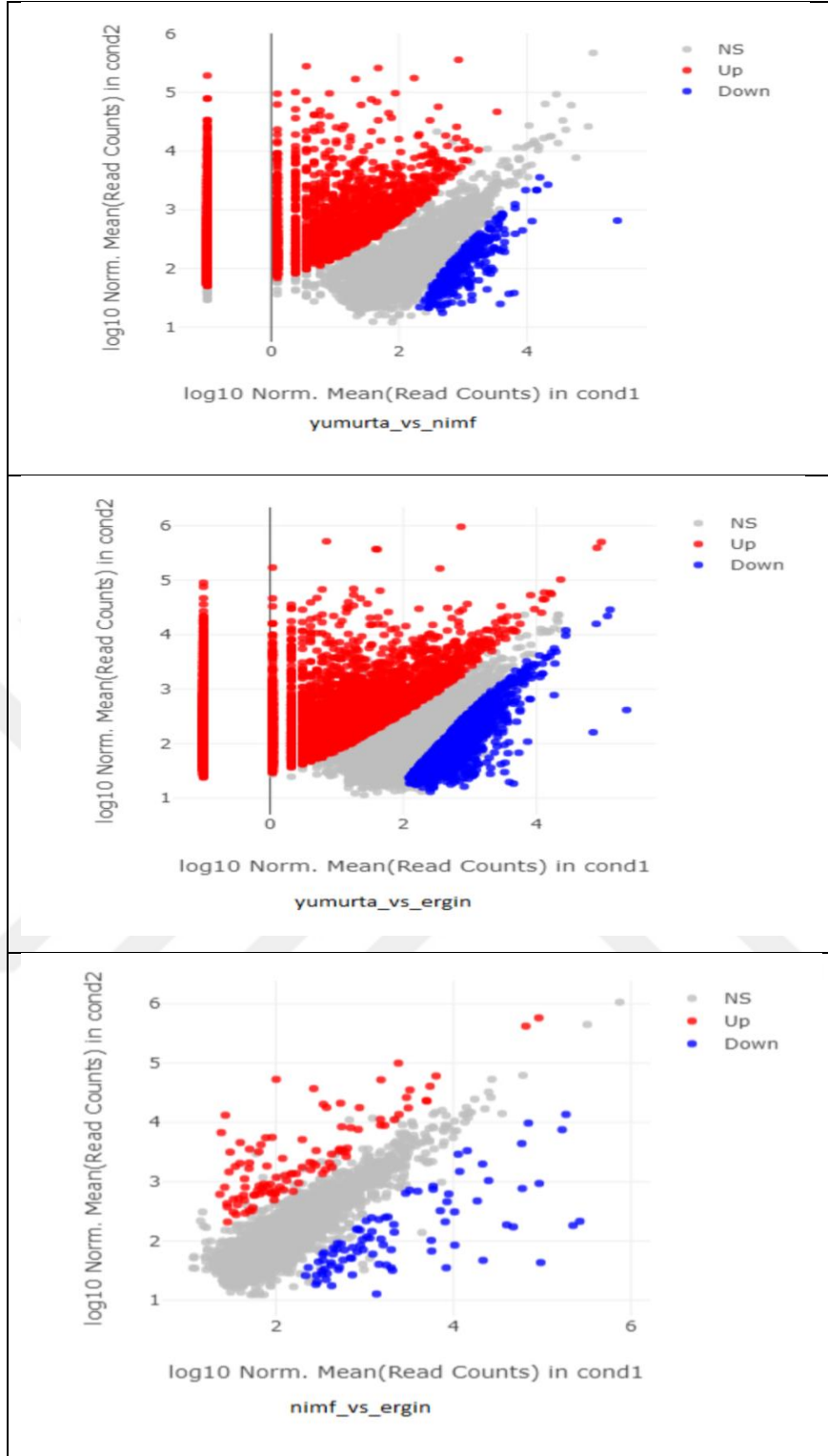


Şekil 26. Örneklerin farklı eksprese olmuş genler açısından karşılaştırılmaları



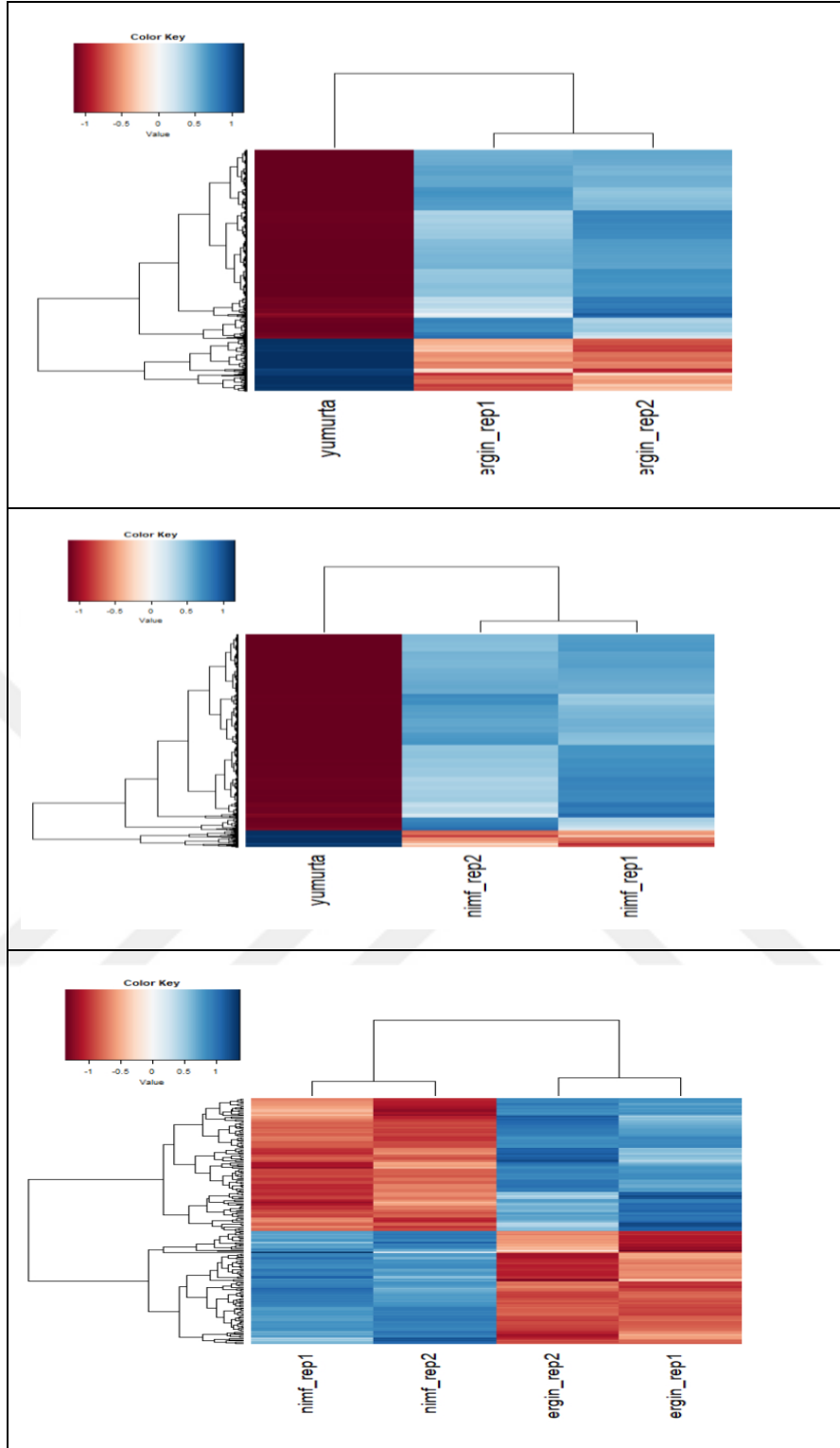
Şekil 27. DEG'lerin MA plot ve Volcano plot şeklindeki gösterimi

Scatter grafiği (dağılım grafiği, serpilme diyagramı) bir veri kümesi için tipik olarak iki değişkenin değerlerini görüntülemek için kartezyen koordinatları kullanan bir çizim veya matematiksel diyagram türüdür. RNA-seq transkriptom analizinden elde edilen DEG'lerin serpilme diyagramları Şekil 28'de verilmiştir.



Şekil 28. DEG'lerin serpilme diyagramları

Heatmap (ısı haritası) tekniği, bir olgunun büyüklüğünü iki boyutlu olarak renk olarak gösteren bir veri görselleştirme yöntemidir. Renkteki varyasyon, ton veya yoğunluğa göre olabilmektedir ve okuyucuya olgunun nasıl kümelendiği veya uzayda nasıl değiştiği hakkında açık görsel ipuçları vermektedir. DEG'lerin ısı haritaları Şekil 29'da verilmiştir.



Şekil 29. DEG'lerin ısı haritaları

Isı haritaları (heatmap) her rengin belirli bir değer kümesini temsil ettiği sürekli bir renk haritasıdır (Bedre et al. 2015).

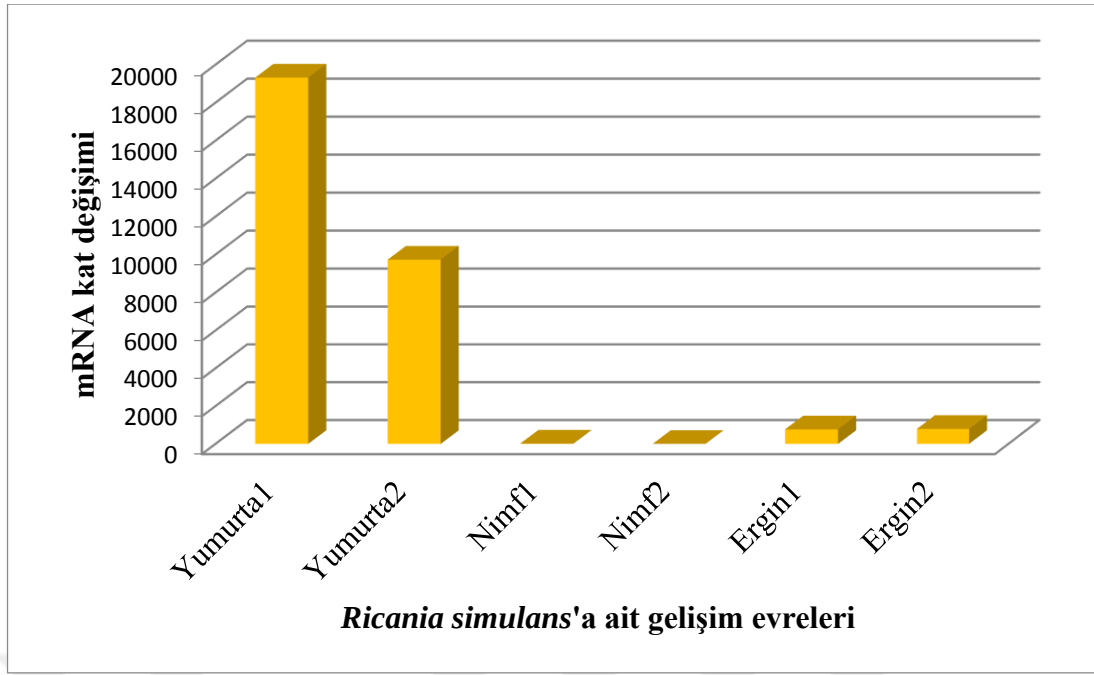
RNA-seq Transkriptom Çalışması ile *Ricania simulans*'ta Kitin Sentaz 1 Genine ait Dizilimin Elde Edilmesi

RNA-seq transkriptom çalışması ile *Ricania simulans*'ta kitin sentaz 1 genine ait elde edilen dizilim şu şekildedir:

```
CTGAGTGCACCGGGAAGCACAGTGATATAGCCAAAACTGACTCGAGAGGCTTG
TCCAGAATGTTGGACATTTTGTACTCAAAGTTCTGAGAAGCAACTAGGGGGTTGA
GGAGACTAGAGCCGTACTTGCCCTTCATGGCCTTGATCTCACCACATGCGCCGGC
CACGTTAGAGTCGGTATCAAAGGCCTTCCAAAGGTGGTAGAGGGATTTCGCGCCA
GGGCGGGTACCAACATCGAGCAAAATGCAGATATTGGGGTTAAGTGCCCGGCCA
AAGGCGTTGAAGAACCATCTGTGAGAGTTGAGCTTGCCACGGTTCTTTTCCTTGA
GGCAGAAAATCATCTGGCAAGGGACAATGCCCATCTCAGCACCTTGAATTTGAG
ATCCGAGTCAAGAGACACCTGAGTGGTGTACTCGTAAACATGAGCTTGGACGGC
GCGGTTGTTGACAAAGTTCTTGGCAATACCGTGTTGGAAGACACCCATTGCAGCA
AGGGCATCAAGTGTACGGGGGTGGATTTTGGGGCGACCATCGCAAATAATGCAG
ACGACAATCTTGTGCCAGCCAGTCTCGCCCCAAGTTCGCGAACGAGATCGGGAGC
AAAAGTGTGAAATATTCTTCATGACAGCATGCATGGTACGTGTGAAGCAAATTC
GTCCTCGTTGTACATGGTGATGCAAATGAAGAGTTCTGTCTCTCGAGTAGTTCCG
CCGATGTATTGTCTAAGATGGTATCCTCTCTCAACAAAGTCATCAGGGTCGCAAG
TGACGGCA
```

Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) ile Kitin Sentaz 1 Gen İfadesinin Doğrulanması

Şekil 30'da qRT-PCR çalışmaları sonucunda yumurta, nimf ve ergin *R. simulans* örneklerinde kitin sentaz 1 genine yönelik ifade karşılaştırmaları görülmektedir.



şekil 30. Yumurta, nimf ve ergin evrelerindeki *Ricania simulans*'ta kitin sentaz 1 gen ifade karşılaştırmaları

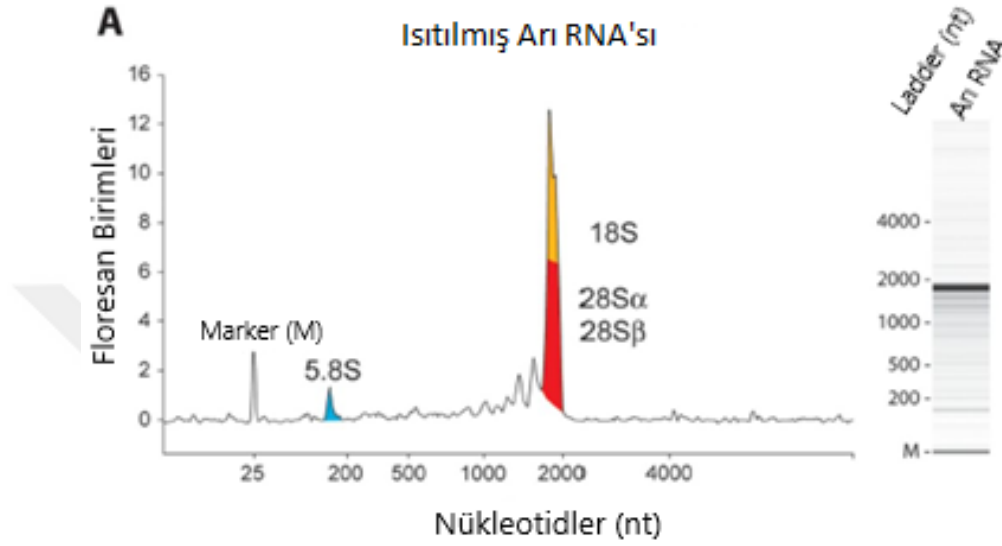
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Tartışma ve Sonuç

RNA sekanslama için örnek kalite standartlarına dayalı olarak test örneğinin kütüphane oluşturmak için gereklilikleri sağlayıp sağlamadığını anlamak için örnekler analize tabi tutulmuştur. Standart RNA-seq kitlerinin çoğu minimum 10-100 ng/μL toplam RNA miktarı gerektirmektedir (Zhao et al. 2016). Tablo 7'e göre örneklerin konsantrasyon aralıkları 62-640 ng/μL arasında değişirken toplam kütle aralıkları 4.09-88.32 μg arasında değişmektedir. Güvenilir ve tekrarlanabilir RNA-seq verileri elde etmek için RNA kalitesi çok önemlidir. RNA molekülünün doğal kararsızlığı nedeniyle, saha çalışmalarında toplanan numunelerden izole edilen RNA kalitesi genellikle doku nekrozundan etkilenmektedir ve bu, durum RNA'nın bozulma durumunu hızlandırabilmektedir. RNA kalitesini değerlendirmek için çoğu laboratuvar, Agilent BioAnalyzer, Agilent TapeStation veya Advanced Analytics Fragment Analyzer dahil olmak üzere elektroforetik tabanlı bir sistem kullanmaktadır. Bu araçların tümü bir RNA bütünlük puanı (RIN) üretmektedir. BioAnalyzer'da RIN puanı 1- 10 (10 mükemmel) arasında değişmektedir ve çoğu laboratuvar standart RNA-seq yöntemleri için RIN > 6'yı kabul edilebilir olarak değerlendirmektedir (Zhao et al. 2016). Bu çalışmada örnek kalitesini değerlendirmek için Agilent 2100 Bioanalyzer kullanılmıştır. Yapılan ölçümlerin yer aldığı Tablo7'e göre örneklerin RIN değerleri 6,1-9,2 arasında değişmektedir. Belirtilen değerler (konsantrasyon, toplam kütle, RIN) dikkate alındığında çalışmada kullanılan örneklerin kütüphane oluşturmak için uygun oldukları anlaşılmaktadır. Kaliteli ifadesi, örneğin kütüphane oluşturma ve sekans için gerekli olan şartları sağladığını gösterirken, riskli ifadesi örneğin kütüphane oluşturma ve sekans için gerekli olan şartları tam olarak taşımadığını, BGI'nın kitaplık oluşturmaya çalışabileceği ancak sekans kalitesini garanti edemeyeceğini göstermektedir. Bu çalışmada Nimfl örneği hariç diğer örnekler kaliteli olarak sınıflandırılmıştır. Nimfl örneği riskli olarak sınıflandırılmıştır. Ancak bu örnekten başarılı bir şekilde kütüphane oluşturulmuş ve sekans elde edilebilmiştir.

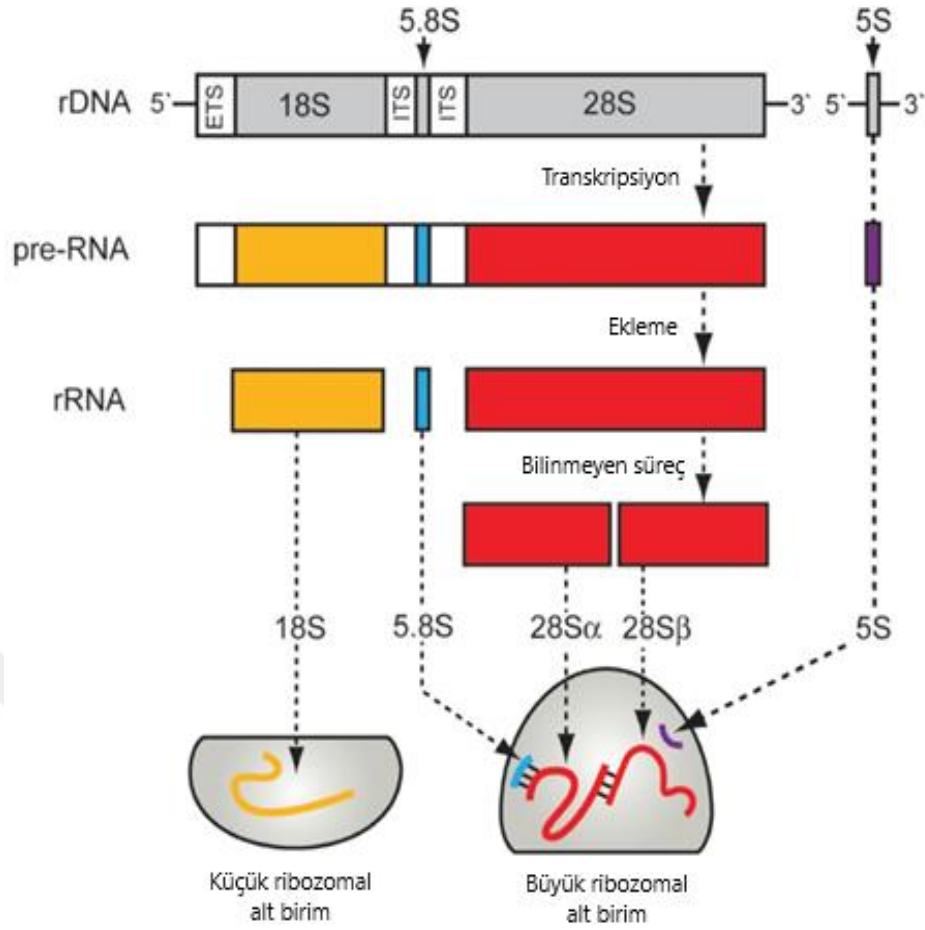
Böceklerde 28S rRNA'nın ısı kaynaklı parçalanma raporları ilk olarak Lepidoptera ve Diptera'da tanımlanmıştır (Applebaum et al. 1966; Greenberg 1969; Rubinstein ve Clever 1971; Ishikawa and Newburgh 1972). RNA'nın birkaç dk 40-60 °C'de ısıtılmasından sonra 28S rRNA fraksiyonlarının 18S rRNA fraksiyonunun yanında aniden çökeldiği, 18S rRNA'nın ise etkilenmediği bulunmuştur. Yapılan ilk çalışmalarda 28S rRNA'nın bu hızlı ısı

dönüşümü saptanabilir ara maddeler olmadan meydana geldiği ve yüksek oranda tekrarlanabilir olduğu ifade edilmiştir. Bu nedenle daha sonra 28S rRNA, α ve β olarak adlandırılan benzer uzunlukta iki parçaya ayrılmayla sonuçlanan molekülün merkezine yakın belirli bir bölünmeye atfedilmiştir (Şekil 31). Ayrıca, 28S ve 18S rRNA arasındaki baz bileşimindeki fark ısı parçalanmasında bile korunduğu için 28S fragmentlerinin 18S rRNA'dan farklı olduğu gösterilmiştir (Ishikawa and Newburgh 1972).



Şekil 31. 70°C'de iki dakikalık ısı denatürasyonundan sonra, *A. mellifera* beyin RNA profili (Winnebeck et al. 2010)

RNaz inhibitörleri kırılmayı önlemede etkisiz olduğundan ve *E.coli*, sıçan ve hamster gibi diğer organizmalardan elde edilen rRNA'larda ısı kaynaklı bir parçalanma görülmemesinden dolayı, bu ısı kaynaklı kırılmanın ekstraksiyon yönteminden kaynaklı olmadığı düşünülmüştür. Daha sonra, bu kırılmanın bazı böceklerde 28S rRNA'larının içsel bir özelliği olarak, RNA omurgasında önceden var olan bir "gizli kırılma" olabileceği önerilmiştir. Parçalanma koşullarının analizleri kovalent olmayan RNA etkileşimlerinin, özellikle hidrojen bağlarının büyük olasılıkla 28S rRNA'yı bir arada tuttuğunu ve böylece başarılı bir şekilde kırılmanın gizlendiği gösterilmiştir (Şekil 10).



Şekil 32. Böceklerde ribozomal alt birimlerinde rRNA'nın değerlendirilmesi

Şekil 10, 11, 12, 13 ve 14'te yer alan grafiklerde örneklerin ribozomal RNA alt birimlerinin (çekirdek büyük-28S, küçük-18S, sitoplazmik, mitokondriyal ve kloroplastik (daha alt küçük birimler) pik yoğunluğunu göstermektedir. Her örnek için elektroforetik jel görüntüsü alt birim bantlarını ya da bozunmayı (yayılma) göstermek için şekillerin sağında bulunmaktadır. Bu şekillerde x-eksenini nt (ladder'e dayalı olarak tahmini nükleotid sayısı) y-eksenini ise FU (floresans birimi: pik yoğunluğu) oluşturmaktadır (Jordan-Thaden et al. 2015). Şekil 10'da yumurta örnek kalitesini gösteren grafikte 25. nükleotit üzerindeki pik marker'a aittir. 200. nükleotidden önce çok hafif 2 pik bulunmaktadır. Bu pikler 5S ve 5.8S bölgesinde bulunmaktadır. Ribozomal RNA'ya ait 18S ifadesi 1,659. nükleotidden başlayarak 2,201. nükleotitte son bulmaktadır. Bu grafikte 28S alanı belirtilmemiştir. Yukarıdaki paragraflarda yapılan açıklamalardan dolayı burada bir degradasyon ifadesi kullanılmamaktadır. Ortaya çıkan rRNA profili, böcek yumurtasına ait rRNA'nın endojen bileşimini (gizli kırılmayı) yansıtmaktadır (Winnebeck et al. 2010). Ayrıca hızlı bölgede pikler bulunmamaktadır. Bu piklerin yokluğu ile RIN değerinin 9.2 olması (güçlü) uygunluk göstermektedir.

Şekil 11’de nimf1 örnek kalitesini gösteren grafikte 18S rRNA 1,734. Nükleotidden başlayarak 2,120. Nükleotitte son bulurken 28S rRNA 3,385. Nükleotidden başlayarak 3,626. nükleotidde son bulmaktadır. Hızlı bölge olarak ifade edilen alanda yoğun pikler görülmektedir. Burada rRNA’nın belirli oranlarda degrade olduğunu ve daha küçük rRNA parçalarına ayrıldığı anlaşılmaktadır. Bu piklerin varlığı ile RIN değerinin 6.1 olması (zayıf) uygunluk göstermektedir. Şekil 12’de nimf2 örnek kalitesini gösteren grafikte 18S rRNA 1,705. Nükleotidden başlayarak 2,080. Nükleotitte son bulurken 28S rRNA 3,149. Nükleotidden başlayarak 3,584. nükleotidde son bulmaktadır. Hızlı bölge olarak ifade edilen alanda pikler görülmektedir. Burada rRNA’nın yine Şekil 10’daki gibi belirli oranlarda degrade olduğunu ve daha küçük rRNA parçalarına ayrıldığı anlaşılmaktadır. Bu piklerin varlığı ile RIN değerinin 6.1 olması (zayıf) uygunluk göstermektedir. rRNA’ların bozulmaya başlamasıyla birlikte daha küçük rRNA parçaları oluşmaya başlamaktadır ve bu durumu takiben 18S rRNA pikinde bir düşüş olmaktadır. (Gayral et al. 2011) Şekil 11 ve Şekil 12 incelendiğinde 18S rRNA piklerinin uzunluğu diğer piklere kıyasla 160-180 FU arasında ancak görülebilmektedir.

Şekil 13’te ergin1 örnek kalitesini gösteren grafikte 18S rRNA 1,597. nükleotidden başlayarak 2,201. Nükleotitte son bulurken 28S rRNA 3,096. Nükleotidden başlayarak 4,052. nükleotidde son bulmaktadır. Hızlı bölge olarak ifade edilen alanda pikler görülmemektedir. Bu nedenle rRNA’nın oldukça kaliteli olduğu anlaşılmaktadır. Bu piklerin yokluğu ile RIN değerinin 9,2 olması da (güçlü) uygunluk göstermektedir. Şekil 14’te ergin2 örnek kalitesini gösteren grafikte 18S rRNA 1,709. Nükleotidden başlayarak 2,135. Nükleotitte son bulurken 28S rRNA 3,144. Nükleotidden başlayarak 3,970. nükleotidde son bulmaktadır. Hızlı bölge olarak ifade edilen alanda pikler görülmektedir. Ancak bu pikler Şekil 11’daki gibi yoğun değildir. Dolayısıyla burada rRNA’nın hafif degradasyona uğradığı ifade edilebilmektedir (Gayral et al. 2011). Bu piklerin varlığı ile RIN değerinin 7,2 olması da (zayıf) uygunluk göstermektedir.

Veri analizlerinden önce yüksek düzeyde bilinmeyen baz içeriğine ve bağdaştırıcı (adapter) dizisine içeren ham okumalar ve düşük kalitedeki okumalar filtrelenmektedir. Bir bağdaştırıcı okuma bağdaştırıcı bazlarını içeren bir okuma olarak tanımlanmaktadır. Eğer bir okumada bazların yarısından çoğu düşük kalitede ise baz kalitesi ≤ 5 olarak tanımlanmaktadır ve düşük kaliteli okuma olarak ifade edilmektedir. Filtreleme adımlarını bağdaştırıcı okumalarının kaldırılması, düşük kaliteli okumaların kaldırılması, bilinmeyen bazların %10’dan fazla olduğu okumaların çıkarılması işlemleri oluşturmaktadır. Daha sonra biyoinformatik analizler temiz okumalar üzerinden yapılmaktadır (Batut et al. 2018).

FastQC, Cambridge'deki Babraham Enstitüsü'nde Simon Andrews tarafından yazılmış, yüksek verimli dizi verileri için bir kalite kontrol aracıdır. FastQC, sekans okumaları hakkında genel kalite ölçümleri sağlamaktadır. Temel sekans içeriği (%A/T/G/C), adaptör kirliliği ve aşırı temsil edilen diziler başına okumalar arasındaki kalite puanı dağılımı hakkında bilgi sunmaktadır (Anonymous b 2021). Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17 Şekil 18 ve Şekil 19'da örnekler için veri filtrelemedeki okumalar boyunca baz yüzdesi ve kalite dağılımı verilmiştir. Bu şekillerde yer alan a) ve b) grafiklerindeki x eksenini okumalar boyunca baz pozisyonunu y eksenini ise a) grafiklerinde baz içerik %'sini b) grafiklerinde ise baz kalite değerini vermektedir. Yüksek kaliteli sekans okumalar dikkate alındığında baz çiftleşmesi prensibine uygun olarak Adenin (A) bazı eğrisi ile Timin (T) bazı eğrisi ve Guanin (G) bazı eğrisi ile Sitozin (C) kesinlikle örtüşmelidir. Çoğu RNA-seq kütüphanesi hazırlama protokolünde ilk 6-12 nükleotid için bazların düzgün olmayan net dağılımı vardır ve bu durum normal olarak kabul edilmektedir. Çünkü sekanslama platformlarında cDNA'yı sentezlemek için rastgele hekzamer primer kullanımı söz konusu olabilmektedir (BGI 2016; Wang et al. 2016). Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18 ve Şekil 19'da a) grafikleri dikkate alındığında ilk 6-12 nükleotitte düzgün olmayan net bir dağılım gözlenirken A ile T eğrilerinin örtüştüğü, G ile C eğrilerinin örtüştüğü görülmektedir. Ayrıca, ileri ve geri okumalarda birbiriyle uyumlu eğrilerin elde edildiği, örneklerin A ve T içeriklerinin %30'un üzerinde iken G ve C içeriklerinin %20'nin altında olduğu anlaşılmaktadır. Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18 ve Şekil 19'da b) grafikleri dikkate alındığında görüntüdeki her nokta okumalar boyunca karşılık gelen bazların belirli kalite değerleri ile toplam bazın sayısını temsil etmektedir. Daha koyu nokta rengi daha büyük baz sayısı anlamına gelmektedir. Görüntüdeki her nokta okumalar boyunca karşılık gelen bazların belirli kalite değerleri ile toplam bazın sayısını temsil etmektedir. Daha koyu nokta rengi daha büyük baz sayısı anlamına gelmektedir. Düşük kaliteli (<20) bazların yüzdesi yüksek ise, bu örneğin sekans kalitesi de kötüdür (BGI 2016; Wang et al. 2016). Bu çalışmadaki örneklerin okumalar boyunca kalite dağılımlarının 35'in üzerinde olduğu anlaşılmaktadır.

Şekil 20'de yer alan FastQC: ortalama kalite skorları grafiği tüm okumaların her bir baz çiftindeki Phred puanlarını temsil etmektedir. X eksenini her okumadaki baz pozisyonu iken y eksenini tüm okumalardaki nükleotidlerin ortalama baz ifadeli puanı (phred ölçekli)'dir. Phred ölçek kalitesi bazın yanlış olma olasılığını (p) göstermektedir. Bir phred puanı (Q), $Q = -10 \log_{10} p$ 'deki p'nin tam sayı eşleşmesidir. Kısaca, 10 phred puanı her 10 baz'da bir hataya veya %90 doğruluğa karşılık gelmekte iken 20 phred puanı her 100 bazda 1 hataya veya %99 doğruluğa denk gelmektedir. Maksimum phred puanı 40'tır (Delhomme et al. 2014). Grafikte yer alan arka plan renkleri yaklaşık kalite aralıklarını temsil etmektedir. Yeşil kısım kabul

edilebilir kalite, turuncu kısım şüpheli ve kırmızı kısım kötü olarak kabul edilmektedir. Genelde ilk 5 ya da daha fazla bazın makinenin kalibrasyon adımları olarak okunanların geri kalanından biraz daha düşük kaliteye sahip olduğu görülmektedir. Okumanın büyük kısmı ~35 bazdan sonra yapılmaktadır. Sekanslama reaktifleri döngüler sırasında tükenmeye başladığından okumanın son 10-20 bazının okumanın ortasındaki daha düşük kaliteli baz ifadelerine sahip olduğunun görülmesi normaldir. Ayrıca, sekans verilerinin geri okumaları (reverse reads) aynı nedenlerden dolayı genellikle uçlarda ileri okumalardan daha düşük olmaktadır (Anonymous b 2021) (Khetani et al. 2015). Şekil 20’de yer alan grafik incelendiğinde elde edilen skorların yeşil renkli arka planda olduğu, ilk birkaç bazın phred puanının düşük olduğu sonraki bazlar için phred puanının arttığı ancak son bazların kalite skorlarında düşüş olduğu görülmektedir. Okumalardaki her bir baz konumundaki ortalama kalite değeri sürekli olarak Q30’un üzerinde bulunmaktadır ve bu da yüksek kaliteli sekans okumalarını göstermektedir (Gombos et al. 2021).

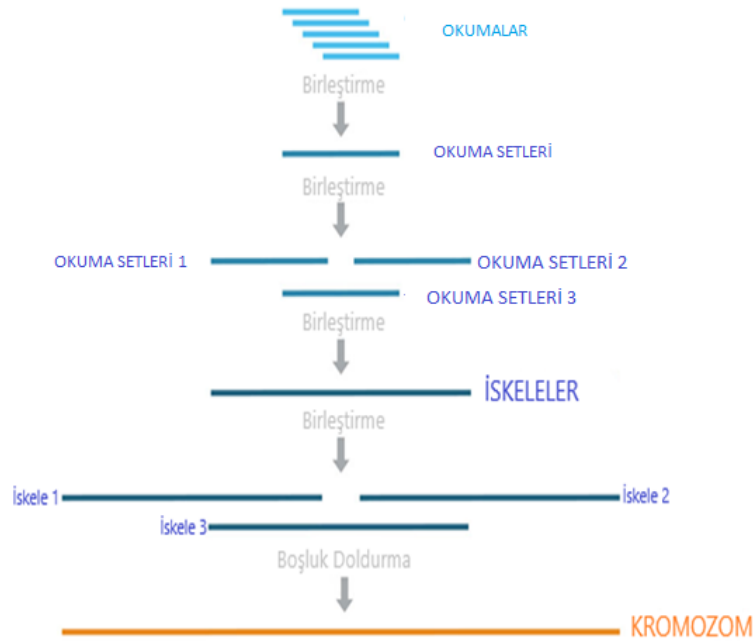
Şekil 21’de yer alan FastQC: Sekans başına GC içeriği grafiği ortalama % GC içeriğini ve okuma yüzde sayısı göstermektedir (Anonymous b 2021). Gözlenen GC dağılımı teorik dağılımdan çok saparsa FastQC bu durumu başarısız olarak adlandırmaktadır. Ancak bazı durumların varlığında bu sapmalar meydana gelebilmekte ve göz ardı edilebilmektedir. Bu durumlardan biri RNA sekanslamada, transkriptler arasında ortalama GC içeriğinin daha fazla veya daha az dağılımının olabilmesi ve bunun gözlemlenen bir grafiğin idealleştirilmiş bir normal dağılımdan daha geniş ve daha dar olmasına yol açabilmesidir (Anonymous h 2021). Yumurta, nimf ve ergin evrelerin teorik dağılıma yakın değerlere sahip olduğu görülmektedir.

Şekil 22’de yer alan FastQC: Sekans başına kalite skorları grafiği tüm okuma kalitesinin bir histogramıdır. X eksenini ortalama okuma kalitesi puanıdır (okumanın tüm temellerini tek bir değerde özetler) ve y eksenini Phred puanıyla okuma sayısıdır. 27-35 arasında okumaların çoğunluğu ile bir zirve görülmesi kalite skorlarının uygunluğunu göstermektedir (Anonymous b 2021).

Şekil 23’te yer alan FastQC: Sekans çoğaltma (duplikasyon) seviyeleri grafiği, haritalanan okumaların kümelenme faktörüne veya duplikasyon oranına bakılmasıdır. FastQC bir kütüphanenin ilk 100.000 okuma sekansını almaktadır ve kütüphanenin geri kalanında bir okuma dizisinin ne sıklıkta tekrarlandığına bakmaktadır. İyi bir kütüphanenin çok düşük oranlarda duplikasyon göstermesi gerekmektedir (okumaların çok büyük çoğunluğunun duplikasyon oranı 1’dir) ve "yüksek karmaşıklık" veya çok sayıda benzersiz okuma ve faydalı veri sunmaktadır. Bu durum grafikte dik bir düşüş olarak temsil edilmektedir ve yaklaşık 2 ya

da 3'lük duplikasyon oranında çok küçük eğriler ve daha sonra yüksek duplikasyon oranları için yaklaşık 0'da devam eden bir çizgi görünümü bulunmaktadır (Anonymous b 2021). Şekil 23'teki grafik değerlendirildiğinde böyle bir görünümün olmadığı görülmektedir. Duplikasyonların görülme nedenleri arasında PCR zenginleşirmesi nedeniyle kütüphane parçalarının aşırı temsil edildiği PCR çoğaltmaları (bu duplikasyon kabul edilmez çünkü PCR kopyaları örnek sekanslarının gerçek oranını yanlış temsil etmektedir), bir RNA-seq kütüphanesinde çok bol transkriptler gibi oldukça fazla temsil edilen sekanslar (bu duplikasyon kabul edilebilir, çünkü örnek sekanslarını tam olarak temsil eder) sayılabilmektedir (Anonymous h 2021). Ayrıca, molekül eklemek için kullanılan bağdaştırıcıların bağlanmaması ve serbest bağdaştırıcıların ortamda mevcut olması da duplikasyona neden olabilmektedir (Anonymous g 2021).

De Novo birleştirme, çok sayıda (kısa veya uzun) DNA parçalarından, bu parçaların doğru sekansı veya sırası hakkında hiçbir ön bilgi olmadan genomları oluşturmak için bir yöntemdir. De Novo birleştirme prosesi Şekil 33'de verilmiştir.



Şekil 33. De Novo birleştirme prosesi (Anonymous c 2021)

Şekil 33'de Okumalar (Reads) ifadesi DNA parçalarıdır. "Kısa okumalar" tipik olarak 35–1.000 boyutunda iken "uzun okumalar" tipik olarak 1.000–500.000 bp boyutundadır. Okuma uzunluğu, belirli bir sekans çalışması için kullanılan sekanslayıcı modeline ve kütüphane hazırlık protokolüne bağlı olarak değişmektedir. Contig'ler, üst üste örtüşen yönlendirilmiş okumaların bir setidir. Tek bir contig, iki veya daha fazla örtüşen ve yönlendirilmiş okumadan oluşmaktadır. Okumalar, bir alt kümeyi veya nükleotid baz

çiftlerinin tümünü paylaşmaktadır. İskeleler (Scaffolds) yönlendirilerek birleştirilmiş contig'lerin bir setidir. Tek bir iskele, iki veya daha fazla birleştirilmiş ve yönlendirilmiş contig'den inşa edilmektedir. Kromozomlar ise yönlendirilerek birleştirilmiş bir dizi iskeledir. Tek bir kromozom, iki veya daha fazla birleştirilmiş ve yönlendirilmiş yapı iskelesinden oluşmaktadır (Anonymous c 2021).

Çalışmada kullanılan *R. simulans*'ın referans genomu bulunmamaktadır. Bu nedenle De Novo birleştirmeleri bu canlı için yapılmıştır ve 163.384.249 iki uçlu okuma, sonraki analiz için referans dizisini almak üzere 590.137 transkript (okuma) halinde birleştirilmiştir. De Novo birleştirmede transkriptlerin kalite metriklerini içeren Tablo 7'de verilmiştir. Nükleotitlerin ortalama uzunlukları 727, %GC oranı 35.27 olarak belirtilmiştir. Tablo 9'daki N50 değeri contig açısından birleştirme kalitesini tanımlamaktadır. Bir contig dizisi verildiğinde N50 toplam genom uzunluğunun %50'sinde en kısa contigin sekans uzunluğu olarak tanımlanmaktadır. N50 dağılım kütesinin yarısının bir noktası olarak düşünülebilmektedir; N50'den daha uzun tüm contiglerdeki bazların sayısı, N50'den daha kısa olan tüm contiglerdeki bazların sayısına yakın olacaktır (Earl et al. 2011). Tablo 9'a göre bu çalışmada elde edilen N50 değeri 1203 nt olarak verilmiştir.

Tamlık değerlendirmesi işlevi, OrthoDB'den seçilen Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO)'dan gen içeriğinin evrimsel olarak bilgilendirilmiş beklentilerine dayalı olarak transkriptom birleştirmesinin tamlığını değerlendirmek için sayısal ölçümler sağlamaktadır (Anonymous d 2021). Lagarda-Diaz et al. (2020) Şekil 24'e göre 1013 sorgulanan çekirdek gen sayısı üzerinden yapılan De Novo tamlık değerlendirmesi sonucunda %98,62 (tam:999 gen) oranla tam ve %0,49 (5 gen) oranla kayıp ortolog gen varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca Tablo 10'a göre %99,62 (tam+kısmi: 1008 gen) oranında tespit edilen çekirdek gen olduğu belirtilmiştir.

Temel bileşen analizi (PCA), yüz tanıma ve görüntü sıkıştırma gibi alanlarda uygulama alanı bulmuş, yüksek boyuttaki verilerde örüntü bulmak için yaygın olarak kullanılan bir istatistiksel tekniktir. Ayrıca, PCA, temel bileşenleri hesaplama ve bunları, bazen yalnızca ilk birkaç temel bileşeni kullanarak ve gerisini göz ardı ederek veriler üzerinde bir temel değişikliği gerçekleştirmek için kullanma süreci olarak da tanımlanabilmektedir (Bro ve Smile 2014; Pasini 2017; Lever et al. 2017). Şekil 25'te bulunan çalışmaya ait temel bileşenler analizine bakıldığında 5 örnek için farklı 5 küme görünmektedir. Her küme kendi içinde benzer gen ekspresyonlarına sahiptir. Şekil 25'e göre mavi (nimf_rep2) ve sarımsı yeşil (ergin_rep2) PC1(%61.96)'e göre farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar muhtemelen PC1 üzerinde ağır etkileri bulunan genlerden kaynaklanmaktadır. PC1 en fazla varyasyonu

gösterirken, PC2 ikinci en fazla varyasyonu göstermektedir. Bu nedenle PC1 eksenı boyunca gruplar arasındaki farklılıklar, aslında PC2 eksenı boyunca benzer görünen mesafelerden daha büyüktür.

Çoğu RNA sekanslamanın ana amacı 2 veya daha fazla grup arasında farklı (differansiyel) ifadeleri tespit etmektir. Bu genellikle, grup başına yalnızca birkaç kopya ile binlerce gen için yapılmaktadır, dolayısıyla istatistiksel bir yöntem gerektirmektedir. DESeq2 algoritması (negatif binom dağılımına dayanan DESeq'in gelişmiş bir versiyonudur) bu amaç için çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhao et al. 2016). DESeq2'nin yeni versiyonu, dağılımlar için gene özgü bir büzölme tahmininin kullanılmasına izin vermektedir. Dağılımı tahmin ederken, DESeq2 benzer bir ortalama ifadeye sahip tüm genleri kullanmaktadır. Küçük ortalama ekspresyon değerlerine sahip genlerin tanımlanmasından kaçınmak için kat değişimi (fold change) tahmini de kullanılmaktadır (Wang et al. 2019). DESeq2'nin ortalama oranları, gen başına geometrik ortalama göre gen sayımlarının medyan oranı tarafından belirlenen numuneye özgü boyut faktörleri ile bölünen sayımlar olarak ifade edilmektedir. Bu algoritmada sekans derinliği ve RNA kompozisyonu hesaplanmaktadır. Numuneler arasında ve differansiyel genlerin (DE) analizi için gen sayımı karşılaştırmaları yapılmaktadır. Örnek karşılaştırmaları yapılmamaktadır (Anonymous f 2021).

Normalleştirilmiş sayım dağılımları, bir yoğunluk grafiğı aracılığıyla özetlenebilmektedir. Yoğunluk grafiğı, tekrarlı sayım dağılımındaki bir farklılığın saptanmasını sağlayarak daha fazla ayrıntı vermektedir. İdeal olarak belirli bir koşul için her replika (kopya) için yoğunluk grafiğı, replikalar arasında en düşük değişkenliği gösterirken büyük ölçüde örtüşme olmalıdır (Jiménez-Jacinto et al. 2019). DESeq2 algoritması ile DEBrowser kullanılarak elde edilen farklı ifade olan genlerin (DEG) yoğunluk grafiklerinin olduğu Şekil 26 incelendiğinde, nimf ve ergin replikalarının yoğunluk grafiklerinin büyük ölçüde örtüştüğü görünürken, yumurta ile ergin replikalarının ve nimf replikalarının az bir kısmının örtüştüğü ve büyük çoğunluğun örtüşmediğı görölmektedir. Ayrıca yumurta örneğinde farklı ifade olan genlerin ergin replikalardaki differansiyel genlerdeki farkı nimf replikalardaki farklı genlerdeki farkından daha azdır. Birbiriyle en çok örtüşmenin olduğu yoğunluk grafiğı (nimf replikası 2 hariç) nimf replikaları ile ergin replikalardaki differansiyel genlerde görölmektedir. Ancak genel olarak bütün yoğunluk grafiklerinde replikalar arasında belirli farklılıklar bulunmaktadır.

Şekil 27'de DEG'lerin MA ve Volcano grafikleri verilmiştir. Gen ifadesi veri kümelerini görselleştirmek için 2 boyutlu (2D) dağılım grafiğı olarak da nitelendirilen MA grafiğı, log-yoğunluk ortalamalarına (A değerleri) karşı log-yoğunluk oranlarının (M

değerleri) bir grafiğidir. 2 örnek arasında benzer ifadeye sahip genler $M=0$ değeri etrafında kümelenecektir. $M=0$ çizgisinden uzak noktalar anlamlı ekspresyona sahip genleri göstermektedir. Örneğin; noktalar $M=0$ çizgisinin üstünde ve altında ise ilgili gen sırasıyla yukarı doğru ve aşağı doğru düzenlenmektedir (Anonymous e 2021). Şekil 27’de verilen MA grafikleri incelendiğinde yumurta ve nimf örnekleri için yukarı düzenlenen genlerin (kırmızı renkli) yoğun olduğu özellikle ($M>1$ ve $A>1$ ’den sonra), $A>3$ ’ten sonra bu yoğunluğun azaldığı, aşağı düzenlenen genlerin (mavi renkli) yoğunluğunun yukarı düzenlenen genlerin yoğunluğuna kıyasla az olduğu, $M=0$ çizgisinde benzer ifadeye sahip genlerin yoğunluğunun aşağı düzenlenen genlere kıyasla fazla olduğu görülmektedir. Yumurta ve ergin örnekleri için çizilen MA grafiğine bakıldığında yumurta ve nimf örneklerine kıyasla yukarı ve aşağı düzenlenen genlerin daha fazla yoğun olduğu, benzer ekspresyonlara sahip genlerin yoğunluğunun azaldığı anlaşılmaktadır. Nimf ve ergin örnekleri için çizilen MA grafikte ise benzer ifadeye sahip genlerin yoğunluğunun arttığı ancak yukarı ve aşağı düzenlenen genlerin yoğunluğunda ciddi azalma olduğu ayrıca aşağı düzenlenen bazı genler için $M<-3$ olduğu bulunmaktadır. Yumurta, nimf ve ergin evrelerdeki ifade olan genlerin yoğunluk değerleri dikkate alındığında özellikle yumurta evresindeki ifade olan genlerin nimf ve ergin evredekilere kıyasla farklılıklarının yoğun olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu çıkarım Şekil 26’daki yoğunluk grafikleri ile uyum sağlamaktadır.

MA grafiği istatistiksel ölçümleri dikkate almamaktadır. Bu nedenle örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı farkları olan genleri MA grafiğinden söyleyemeyiz. Eğer böyle bir veri isteniyorsa volcano grafikleri kullanılmalıdır (Anonymous e 2021). Volcano grafiği, volkan gibi bir şekle sahip 2 boyutlu bir dağılım grafiğidir ve $\log_2$ kat değişikliği ($\log_2FC$) (x eksen) ve p değeri ($-\log_{10}$) (y eksen) açısından iki farklı numune koşulundan (örn. Böceklerin gelişim evrelerinden yumurta ve nimf evresi) istatistiksel olarak anlamlı gen ekspresyonu değişikliklerinin görselleştirilmesi ve tanımlanması için kullanılmaktadır. Volcano grafikleri ile omik araştırmalarından (örn. Transkriptomik, genomik, proteomik...) elde edilen binlerce genin ifadesini görselleştirmek ve önemli değişikliklere sahip genleri saptamak kolaylaşmaktadır (Anonymous e 2021). Pozitif x eksen değeri yukarı düzenlenen genleri verirken, negatif x değeri aşağı düzenlenen genleri vermektedir (El-Ashram et al. 2017). Şekil 27’deki volcano grafikleri, MA grafikleri ile uyumlu olacak şekilde sonuçlar vermektedir. Yumurta örneğindeki diferansiyel genlerin nimf ve ergin örneklerindeki diferansiyel genlerin karşılaştırılmasında yukarı düzenlenen genlerin fazla olduğu ancak nimf ve ergin örneklerindeki differansiyel genlerin kıyaslanmasında yukarı düzenlenen genlerin miktarında azalma olduğu, aşağı düzenlenen genlerin miktarının yukarı düzenlenen genlere yakın olduğu ancak diğer örnek karşılaştırmalarına göre azaldığı anlaşılmaktadır.

Değişkenler arasındaki ilişkileri gözlemlemek için kullanılan saçılma grafikleri, iki farklı sayısal değişkenin değerlerini temsil etmek için noktaları kullanmaktadır. Yatay ve dikey eksenlerdeki her noktanın konumu, tek bir veri noktası için değerleri belirtmektedir (Anonymous a 2021). Şekil 28’de verilen saçılma grafikleri incelendiğinde benzer ekspresyonlara sahip genlerin genelde güçlü, pozitif ve linear olarak saçılım gösterdikleri, yumurta ve nimf ile yumurta ve ergin örneklerindeki yukarı düzenlenen diferansiyel genlerin güçlü ve pozitif bir ilişki göstermekle birlikte birbiriyle çok ilişkili olmayan genlerin (saçılımdan uzak olan kırmızı noktalar) olduğu da anlaşılmaktadır. Yumurta ve nimf ile yumurta ve ergin örneklerindeki aşağı düzenlenen diferansiyel genlerin güçlü ve pozitif bir ilişki göstermekle birlikte birbiriyle çok ilişkili olmayan genlerin (saçılımdan uzak olan mavi noktalar) olduğu da anlaşılmaktadır. Nimf ve ergin’deki yukarı ve aşağı düzenlenen genlerin oldukça azalmakla birlikte genler arasındaki ilişkinin uzaklaştığı (noktalar arasındaki boşluklar artmıştır) anlaşılmaktadır.

Isı haritaları (heatmap) her rengin belirli bir değer kümesini temsil ettiği sürekli bir renk haritasıdır (Bedre et al. 2015). Şekil 29’da diferansiyel eksprese olan genlerin ısı haritası verilmiştir. Burada mavi renk koyulaştıkça diferansiyel eksprese genlerin ekspresyonunun arttığı kırmızı renge doğru gidildikçe diferansiyel eksprese genlerin ekspresyonunun azaldığı anlaşılmaktadır.

RNA-seq transkriptom çalışması ile birlikte kitin sentaz 1 genine ait dizilim 774 baz olarak elde edilmiştir. qRT-PCR ifade sonuçlarının gösterildiği Şekil 30 incelendiğinde kitin sentaz 1 geninin yumurta, nimf ve ergin evrede eksprese olduğu ancak en çok yumurta evresinde en az nimf evresinde eksprese olduğu anlaşılmaktadır. *Panonychus citri*’nin yumurta, larva, nimf ve ergin evrelerinde kitin sentaz 1 geninin ekspresyonu üzerine yapılan çalışmada en yüksek ekspresyon seviyesi yumurta evresinde gözlenmiştir ve diğer evrelerde oldukça azalmıştır (Xia et al. 2014). *Panonychus citri*’nin yumurta, larva, ergin, nimf ve ergin evrelerinde kitin sentaz 1 geninin ekspresyonu üzerine yapılan başka bir çalışmada ise yine yumurta evresinde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmiştir. Larva ve nimf döneminde oldukça azalan kitin sentaz 1 geni ekspresyonu ergin dönemde (özellikle dişi örneklerde) tekrar artış göstermiştir (Ali et al. 2020). Dolayısıyla çalışma bulguları diğer çalışmalarla desteklenmektedir.

Sonuç ve Öneriler

1. *R. simulans*’ın yumurta, nimf, ergin evre örnekleri için RNA-seq transkriptom analizi yapılmıştır ve 509137 sekans sayısı, 370106677 total uzunluk, en uzun sekans 35193 nt, en kısa sekans 178 nt, ortalama sekans uzunluğu 727 nt, %35,27

GC içeriği, %32,36 Adenin, %32,27 Timin, %17,50 Guanin, %17,77 Sitozin verileri elde edilmiştir.

2. Kitiin sentaz1 genine yönelik sekans elde edilmiştirve qRT-PCR alışmaları ile doğrulama işlemi yapılmıştır.
3. Bu çalışmada elde edilen veriler ile bu canlı ve bu canlıyla yakın akraba olarak bulunan canlılarda moleküler tabanlı olarak çalışma yürütülme potansiyeli oldukça yüksektir.
4. Kitiin sentaz, böceklerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olduğundan, bu çalışma ile hařere kontrolü ve yönetimi için yeni alternatifler sađlanabilecektir.



KAYNAKLAR

- Adams, M.D., Dubnick, M., Kerlavage, A.R., Moreno, R., Kelley, J.M., Utterback, T.R., Nagle, J.W., Fields, C., Venter, J.C. 1992. Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature*, (355) 632–634.
- Adiconis, X., Borges- Rivera, D., Satija, R., De Luca, D.S., Busby, M.A., Berlin, A.M., Sivachenko, A., Thompson, D.A., Wysoker, A., Fennell, T., Gnirke, A., Pochet, N., Regev, A., Levin, J.Z. 2013. Comparative analysis of RNA sequencing methods for degraded or low- input samples. *Nat Methods*, (10) 623–629.
- Ak, K., Güçlü, Ş., Sekban, R., 2013. Doğu Karadeniz Bölgesinde Yeni Bir Zararlı *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae)’a Karşı Azadirachtin ve Spinosad Etki Maddeli Biyopestisitlerin Etkinliklerinin Belirlenmesi. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, (6,1), 10-14.
- Alev, Çetin, F., Sezen K., 2016. Discovery and Development of a Biological Agent to Control of *Ricania simulans* (Hemiptera: Ricaniidae). *Journal of Applied Biological Science* 10 (2):56-63.
- Alev, F., 2014. *Ricania Simulans*’ın Bakteriyal Mücadele Etmeninin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi Trabzon.
- Ali, M.W., Khan, M.M., Song, F., Wu, L., He, L., Wang, Z., Zhang, Z., Zhang, H., Jiang, Y. 2020. RNA Interference-Based Silencing of the Chitin Synthase 1 Gene for Reproductive and Developmental Disruptions in *Panonychus citri*. *Insects* 2020, 11(11), 786
- Alvarenga, E. S., L. Mansur, J.F., Justi, S.A., Figueira-Mansur, J., Dos Santos, V.M., Lopez, S.G., Masuda, H., Lara, F.A., Melo, A.C., Moreira, M.F. 2016. Chitin is a component of the *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, (69), 61–70.
- Alvarenga, E. S., L. Mansur, J.F., Justi, S.A., Figueira-Mansur, J., Dos Santos, V.M., Lopez, S.G., Masuda, H., Lara, F.A., Melo, A.C., Moreira, M.F. 2016. Chitin is a component of the *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, (69), 61–70.
- Ampasala, D.R., Zheng, S., Zhang, D., Ladd, T., Doucet, D., Krell, P.J., Retnakaran, A., Feng, Q. 2011. An epidermis-specific chitin synthase cDNA in *Choristoneura fumiferana*: cloning, characterization, developmental and hormonal-regulated expression. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, (76), 83–96.
- Anonymous, 2021a. <https://chartio.com/learn/charts/what-is-a-scatter-plot/> 6 Haziran 2021
- Anonymous, 2021b. <https://nf-co.re/eager/2.3.3/output> 5 Haziran 2021
- Anonymous, 2021b. <https://nf-co.re/eager/2.3.3/output> 5 Haziran 2021
- Anonymous, 2021b. <https://nf-co.re/eager/2.3.3/output> 5 Haziran 2021
- Anonymous, 2021b. <https://nf-co.re/eager/2.3.3/output> 5 Haziran 2021
- Anonymous, 2021b. <https://nf-co.re/eager/2.3.3/output> 5 Haziran 2021

- Anonymous, 2021c. <https://thesequencingcenter.com/knowledge-base/de-novo-assembly/> 5 Haziran 2021
- Anonymous, 2021c. <https://thesequencingcenter.com/knowledge-base/de-novo-assembly/> 5 Haziran 2021
- Anonymous, 2021d. <https://www.biobam.com/new-transcriptomics-features/?cn-reloaded=1> 5 Haziran 2021
- Anonymous, 2021e. <https://www.reneshbedre.com/blog/ma.html> 6 Haziran 2021
- Anonymous, 2021e. <https://www.reneshbedre.com/blog/ma.html> 6 Haziran 2021
- Anonymous, 2021e. <https://www.reneshbedre.com/blog/ma.html> 6 Haziran 2021
- Anonymous, 2021f. https://hbctraining.github.io/Trainingmodules/planning_successful_rnaseq/lessons/sample_level_QC.html. 5 Haziran 2021
- Anonymous, 2021g. <https://nf-co.re/eager/2.3.3/output>; https://rtsf.natsci.msu.edu/sites/_rtsf/assets/File/FastQC_TutorialAndFAQ_080717.pdf 5 Haziran 2021
- Anonymous, 2021h. https://rtsf.natsci.msu.edu/sites/_rtsf/assets/File/FastQC_TutorialAndFAQ_080717.pdf 5 Haziran 2021
- Anonymous, 2021h. https://rtsf.natsci.msu.edu/sites/_rtsf/assets/File/FastQC_TutorialAndFAQ_080717.pdf 5 Haziran 2021
- Anonymous, 2021k. <https://genoksteknoloji.com.tr/> 21 Mayıs 2021
- Applebaum SW Ebstein RP Wyatt GR . 1966. Dissociation of ribonucleic acid from silkworm pupae by heat and dimethylsulfoxide: Evidence for specific cleavage points. *Journal of Molecular Biology* 21(1): 29–41.
- Arakane, Y., Specht, C.A., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S., Beeman, R.W., (2008) Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, (38), 959–962.
- Arakane, Y., Taira, T., Ohnuma, T., Fukamizo, T. 2012. Chitin-related enzymes in agrobiosciences. *Current Drug Targets*, (13), 442–470.
- Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K.J., Specht, C.A., Tomogasu, Y., Lorenzon, M.D., Kanost, M., Beem, R.W. The *Tribolium* chitin synthase genes *TcCHS1* and *TcCHS2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. 2005. *National Insect week*. (14), 453–463.
- Atasever, D., 2019. Araknid Kitininin Bazı Ağır Metallerin Sulu Ortamdan Uzaklaştırılması Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ömer Halisdemir Üniversitesi Niğde.
- Avidzba, N.S., Bobokhidze, Z.M., 1982. Biophenology of the Japanese leafhopper. *Zashchita Rastenii*, (6), 36.
- Ayyaru, G., Venkatesan, A., 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, (255), 1–4, 179–187.
- Azuma, K., Izumi, R., Osaki, T., Ifuku, S., Morimoto, M., Saimoto, H., Minami, S., Okamoto, Y. (2015a) Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: old and new materials. *Journal of functional biomaterials* (6,1):104–142.
- Azuma, K., Osaki, T., Minami, S., Okamoto, Y., (2015b) Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. *Journal of functional biomaterials* (6,1):33–49.

- Badwan, A.A., Rashid, I., Omari, M.M., Darras, F.H., 2015. Chitin and chitosan as direct compression excipients in pharmaceutical applications. *Marine drugs* 13(3):1519–1547.
- Bansal, R., Mian, M.R., Mittapalli, O., Michel, A.P., 2012. Characterization of a chitin synthase encoding gene and effect of diflubenzuron in soybean aphid, *Aphis. glycines*. *Int. J. Biol. Sci*, (8), 1323.
- Batut, B., 2021 Quality Control (Galaxy Training Materials).
<https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/sequence-analysis/tutorials/quality-control/tutorial.html> Online; accessed Sun Jul 25 2021
- Bedre, R., Rajasekaran, K., Mangu, V. R., Sanchez Timm, L. E., Bhatnagar, D., & Baisakh, N. (2015). Genome-wide transcriptome analysis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) identifies candidate gene signatures in response to aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. *PLoS One*, 10(9), e0138025.
- Bertone, P., Stolc, V., Royce, T.E., Rozowsky, J.S., Urban, A.E., Zhu, X., Rinn, J.L., Tongprasit, W., Samanta, M., Weissman, S., Gerstein, M., and Snyder, M. 2004. Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science*, (306)2242–2246.
- BGI Co., Ltd. INSufhE [Transcriptome Denovo Project] . Wednesday, 2nd Mar., 2016
- Bolognesi, R., Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K.J., Terra, W.R., Ferreira, C. 2005. Sequences of cDNAs and expression of genes encoding chitin synthase and chitinase in the midgut of *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(11), 1249–1259.
- Braconnot H (1811a) Sur la nature des champignons. In: Klostermann J (ed) Recueil de Mémoires concernant la chimie et les arts qui en dépendent et spécialement la pharmacie, vol Soixante-dix-neuf. Annales de Chimie. Librairie des Ecoles Impériales Polytechnique et des Ponts et Chaussées, Paris, pp 265–304.
- Braconnot H (1811b) Des recherches analytiques sur la nature des champignons. In: Klostermann J (ed) Recueil de Mémoires concernant la chimie et les arts qui en dépendent et spécialement la pharmacie, vol Soixante-dix-neuf. Annales de Chimie. Librairie des Ecoles Impériales Polytechnique et des Ponts et Chaussées, Paris, pp 272–292.
- Bro, R. and Smilde, A.K. 2014. Principal component analysis. *Anal. Methods*, 2014, 6, 2812–2831.
- Brodaczewska, K., Donskow-Lysoniewska, K., Doligalska, M., 2015. Chitin, a key factor in immune regulation: lesson from infection with fungi and chitin bearing parasites. *Acta parasitologica / Witold Stefanski Institute of Parasitology, Warszawa, Poland* 60(2):337–344.
- Bu, CP., Lariviere, M.C., Liang, AP., 2010. *Parapiromis* nom. nov., a new name for *Piromis Fennah* (Hemiptera: Fulgoromorpha: Ricaniidae), with descriptions of three new species. *Zootaxa*, (2400), 29–40.
- Chen, L., Yang, W.J., Cong, L., Xu, K.K., Wang, J.J. 2013. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of a chitin synthase 2 gene from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (*Diptera: Tephritidae*). *International Journal of Molecular Sciences*, (14), 17055–17072.
- Cloonan, N., Forrest, A.R., Kolle, G., Gardiner, B.B., Faulkner, G.J., Brown, M.K., Taylor, D.F., Steptoe, A.L., Wani, S., Bethel, G., Roberstson, A.J., Perkins, A.C., Bruce, S.J., Lee, C.C., Ranade, S.S., Peckham, H.E., Manning, J.M., McKernan, K.J., Grimmond,

- S.M. 2008. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nat. Methods*, (5)585-587.
- Cohen, E., 2001. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag Sci* 57(10):946–950.
- Crini, G., 2019. Historical review on chitin and chitosan biopolymers. *Environmental Chemistry Letters*, (17), 1623-1643.
- Cuesta, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2003. In vitro effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) *Fish & shellfish immunology* 15(1):1–11
- Çağlar, Z., 2005. *Trichoderma Atroviride*'den Elde Edilen Kitinazın Kısmi Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yıldız Teknik Üniversitesi İstanbul.
- Daimon, T., Hamada, K., Mita, K., Okano, K., Suzuki, M.G., Kobayashi, M., Shimada, T. 2003. A *Bombyx mori* gene, *BmChi-h*, encodes a protein homologous to bacterial and baculovirus chitinases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, (33), 749–759.
- David, L., Huber, W., Granovskaia, M., Toedling, J., Palm, C.J., Bofkin, L., Jones, T., Davis, R.W., and Steinmetz, L.M. 2006. A high-resolution map of transcription in the yeast genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (103)5320-5325.
- Delhomme, N., Mahler, N., Schiffthaler, B., Sundell, D., Mannapperuma, C., Hvidsten, T.R., Street, N.R. 2014. Guidelines for RNA-Seq data analysis. *EpiGeneSys Protocol*. 67.1-24.
- Demir, E., 2009. *Ricania Germar*, 1818 species of Western Palaearctic Region (Hemiptera: Fulgoromorpha: Ricaniidae). *Munis Entomology & Zoology*, (4), 271-275.
- Earl, D; Bradnam, K; St. John, J; Darling, A; Lin, D; Fass, J; Yu, HOK; Buffalo, V; Zerbino, DR; Diekhans, M; Nguyen, N; Ariyaratne, PN; Sung, W-K; Ning, Z; Haimel, M; Simpson, JT; Fonseca, NA; Birol, I; Docking, TR; Ho, IY; Rokhsar, DS; Chikhi, R; Lavenier, D; Chapuis, G; Naquin, D; Maillet, N; Schatz, MC; Kelley, DR; Phillippy, AM; Koren, S (2011). "Assemblathon 1: A competitive assessment of de novo short read assembly methods". *Genome Research*. 21 (12): 2224–2241.
- El-Ashram, S., Al-Nasr, I., El-Kemary, M., Mehmood, R., Hu, M., Suo, X. 2017. Early and late gene expression profiles of the ovine mucosa in response to *Haemonchus contortus* infection employing Illumina RNA-seq technology. *Parasitology International*, 66, 681-692.
- Elieh Ali Komi, D., Sharma, L., Dela Cruz, C.S., 2018. Chitin and Its Effects on Inflammatory and Immune Responses. *Clinic Rev Allerg Immunol* (54), 213–223.
- Elieh-Ali-Komi D., Hamblin M.R., 2016. Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials. *International journal of advanced research*, 4(3):411-427.
- Esteban, M.A., Mulero, V., Cuesta, A., Ortuno, J., Meseguer, J., 2000. Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) *Fish & shellfish immunology* 10(6):543–554.
- Firmino, A. A. P., Fonseca, F.C.A., Macedo, L.L.P., Coelho, R.R., Souza Jr, J.D.A., Togawa, R.C., Silva-Junior, O.B., Pappas, G.J., Silva, M.C.M., Engler, G., Grossi-de-sa, M.F. 2013. Transcriptome analysis in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA interference in insect pests. *PLoS One* (8), e85079.
- Fletcher, M.J., 2008. A key to the genera of Ricaniidae (Hemiptera: Fulgoromorpha) recorded in Australia with notes on the Australian fauna, including a new species of *Epithalamium kirkaldy*. *Australian Journal of Entomology*, (47), 107–120.

- Gokturk, T., Kordali, Ş., Bozhuyuk, Usanmaz, A., 2017. Insecticidal Effects of Essential Oils against Nymphal and Adult Stage of *Ricania simulans*. Natural Product Communications. vol. 12(6), pp 973-976.
- Gokturk, T., and Aksu, Y., 2014. "Morphology, biology and damage of *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae) engaged in damage to agricultural areas and forests". II. Forest Entomology and Pathology Symposium (7-9) 279-281.
- Gokturk, T., and Aksu, T., 2014. "Morphology, biology and damage of *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae) engaged in damage to agricultural areas and forests". II. Forest Entomology and Pathology Symposium, (7-9), 279-281.
- Gokturk, Temel., and Mihli, A., 2016. The effect of Pyrethrum and *Bacillus thuringiensis* against *Ricania simulans*. Annals of Agrarian Science vol. 14(4), 311-314.
- Gombos, K., Galik, B., Kalács, K.I., Gödöny, K., Varnagy, A., Alpár, D., Bódis, J., Gyenesei, A., Kovács, G.L., 2021. NGS-Based Application for Routine Non-Invasive Pre-Implantation Genetic Assessment in IVF. Int. J. Mol. Sci., 22(5), 2443.
- Göktürk, T., Kordali, Ş., Bozhuyuk, A.U., 2017. Insecticidal Effects of Essential Oils against Nymphal and Adult Stage of *Ricania simulans* (Hemiptera: Ricanidae). Natural Product Communications, 12 (6), 973-976.
- Göktürk, T., Tozlu, E., Kotan, R., 2018. Prospects of Entomopathogenic Bacteria and Fungi for Biological Control of *Ricania simulans* (Walker 1851) (Hemiptera: Ricaniidae). Pakistan J. Zool. vol. 50(1), pp 75-82
- Göktürk, T. ve Mihli, A., 2015 Doğu Karadeniz sahil şeridinin önemli zararlısı *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae)'ın mücadelesi üzerine araştırmalar. Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, (16, 1), 89-93.
- Göktürk, T., and Mihli, A., 2016. The effect of Pyrethrum and *Bacillus thuringiensis* against *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: ricanidae) in Turkey. Annals of Agrarian Science. (14, 4), 311-314.
- Göktürk, T., MIHLI, A. 2015. Doğu Karadeniz sahil şeridinin önemli zararlısı *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae)'ın mücadelesi üzerine araştırmalar. Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, (1) 89-93.
- Greenberg JR . 1969. Synthesis and properties of ribosomal RNA in *Drosophila*. Journal of Molecular Biology 46(1): 85–98.
- Güçlü, Ş., Ak, K., Akyol, H., Sekban, R., Beytut, B., Yıldırım, R., 2010. Pathogenicity of *Lecanicillium muscarium* against *Ricania simulans*. Bulletin of Insectology, (63,2), 243-246.
- Han, Y., Gao, S., Muegge, K., Zhang, W., Zhou, B. 2015. Advanced applications of RNA sequencing and challenges. Bioinform Biol Insights, (9) 29–46.
- Hatchett, C. (1799) Experiments and observations on shell and bone. In: Bowyer W, Nichols J (eds) Philos Trans R Soc Lond. Royal Society, London, June (13), 1799, vol 89, no XVIII, pp 315–334.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., Toprak, U. 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. Annual Review of Entomology, (54), 285–302.
- Hrdlickova, R., Toloue, M., Tian, B. 2017. RNA- Seq methods for transcriptome analysis, WIREs RNA, (8) 1, e1364.

- Ishikawa, H., Newburgh, R.W. 1972. Studies of the thermal conversion of 28S RNA of *Galleria mellonella* (L.) to an 18S product. *Journal of Molecular Biology*, 64(1): 135–144.
- Jayakumar, R., Deepthy, M., Manzoor, K., Nair, S.V., Tamura, H., 2010. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials-A short review. *Carbohydrate Polymers* 82(2):227-232.
- Jiménez-Jacinto, V., Sanchez-Flores, A., & Vega-Alvarado, L. (2019). Integrative differential expression analysis for multiple experiments (IDEAMEX): a web server tool for integrated rna-seq data analysis. *Frontiers in genetics*, 10, 279.
- Jordon-Thaden, I.E., Chanderbali, A.S., Gitzendanner, M.A., Soltis, D.E., 2015. Modified CTAB and TRIzol Protocols Improve RNA Extraction from Chemically Complex Embryophyta. *Applications in Plant Sciences* 3 (5): 1400105
- Jung, W.J., Park, R.D., 2014. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. *Marine drugs* 12(11):5328–5356.
- Kaya, M., Mujtaba, M., Ehrlich, H., Salaberria, A.M., Baran, T., Amemiya, C.T., Galli, R., Akyuz, L., Sargin, I., Labidi, J., 2017. On chemistry of γ -chitin. *Carbohydrate Polymers*. (176), 177-186.
- Khetani, R.S., Drnevich, J., Mainzer, L.S., 2015. Standard operating procedure for performing gene expression analysis with RNA-Seq data. *RNA-Seq on Human data HPCBio, UIUC. Version 1.0*.
- Kibar, A.K., Eken, C., Güçlü,Ş., Genç, T.,Sekban,R., 2014. Laboratory and Field Evaluation of the Entomopathogenic Fungus, *Conidiobolus coronatus* for Controlling *Ricania simulans*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, (24,2),455-459
- Kontas,E., 2012. Kiwi production in Turkey and the world. *Turkish Journal of Agriculture*,(38), 90-92.
- LaDeana, W.H., Reinke, V., Green, P., Hirst, M.,Marra, M.A., Waterston, R.H. 2009. Massively parallel sequencing of the polyadeny-lated transcriptome of *C. elegans*.*Genome Res*,(19)657-666.
- Lagarda-Diaz, I., Hernández-Oñate, M.A., Huerta-Ocampo, J.A., Guzmán-Partida, A.M., Winzerling, J., Geiser, D., Vázquez-Moreno, L., 2020. Gene Sequences of Potential Targets of Insecticidal PF2 Lectin Identified from the Larval De Novo Transcriptome of the Mexican Bean Weevil (*Zabrotes Subfasciatus*; Boheman 1833), *Insects* 11(11):736-753.
- Lee, C.G., Da Silva, C.A., Lee, J.Y., Hartl, D., Elias, J.A., 2008. Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Curr Opin Immunol* 20(6):684–689.
- Lever, J., Krzywinski, M. & Altman, N. 2017. Principal component analysis. *Nat Methods* 14, 641–642.
- Li, S., Tighe, S.W., Nicolet, C.M., Grove, D., Levy, S., Farmerie, W., Viale, A., Wright, C., Schweitzer, P.A., Gao, Y., Kim, D., Boland, J., Hicks, Belynda., Kim, R., Chhangawala, S., Jafari, N., Raghavachari, N., Gandara, J., Reyer, N.G., Hendrickson, C., Robertson, D., Rosenfeld, J.A., Smith, T., Underwood, J.G., Wang, M., Zumbo, P., Baldwin, D.A., Grills, G.S., Mason, C.E. 2014. Multi- platform assessment of transcriptome profiling using RNA- seq in the ABRF next- generation sequencing study. *Nat Biotechnol*, (32) 915–925.

- Lister, R., O'Malley, R.C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B.D., Millar, A.H., Ecker, J.R. 2008. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*, (133) 523-536.
- Liu, X. J., Zhang, H., Li, S., Zhu, K.Y., Ma, E., Zhang, J. 2012. Characterization of a midgut-specific chitin synthase gene (*LmCHS2*) responsible for biosynthesis of chitin of peritrophic matrix in *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, (42), 902–910.
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Norton, H., Brown, E.L. 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, (14) 1675–1680.
- Mansur, J.F., Alvarenga, E.S., Figueira-Mansur, J., Franco, T.A., Ramos, I.B., Masuda, H., Melo, A.C., Moreira, M.F., 2014. Effects of chitin synthase double-stranded RNA on molting and oogenesis in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, (51), 110–121.
- Marguerat, S., Wilhelm, T., Bähler, J. 2008. Next-generation sequencing: Applications beyond genomes. *Biochem. Soc. Trans.*, (36) 1091-1096.
- Marioni, J.C., Mason, C.E., Mane, S.M., Stephens, M., Gilad, Y. 2008. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.*, (18) 1509-1517.
- Merzendorfer, H. and Zimoch, L., 2003. Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.*, (206), 4393–4412.
- Merzendorfer, H., 2006. Insect chitin synthases: a review *Journal of Comparative Physiology B* volume (176), pages 1–15.
- Merzendorfer, H., 2006. Insect chitin synthases: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, (176), 1–15.
- Merzendorfer, H., 2013. Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. *Insect Science*, (20, 2), 121-138.
- Minamoto, T., Takahashi, N., Kitahara, S., Shinozaki, Y., Hirano, T., Hakamata, W., Nishio, T. 2015. Saccharification of beta-chitin from squid pen by a fermentation method using recombinant chitinase-secreting *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (175), 3788–3799.
- Moreira, M.F., Dos Santos, A.S., Marotta, H.R., Mansur, J.F., Ramos, I.B., Machado, E.A., Souza, G.H., Eberlin, M.N., Kaiser, C.R., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S., Vasconcellos, A.M. (2007) A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, (37), 1249–1261.
- Morin, R., Bainbridge, M., Fejes, A., Hirst, M., Krzywinski, M., Pugh, T., McDonald, H., Varhol, R., Jones, S., Marra, M. 2008. Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. *Biotechniques*, (45) 81-94.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods*, (5) 621-628.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods*, (5) 621-628.

- Moussian Yang, W. J., Xu, K. K., Cong, L. & Wang, J.J., 2013. Identification, mRNA expression, and functional analysis of chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants in oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis*. *Int. J. Biol. Sci.* (9), 331–342.
- Moussian, B. 2010. Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, (40), 363–375.
- Nagalakshmi, U., Waern, K., Snyder, M. 2010. RNA-Seq: A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis. *Current Protocols in Molecular Biology*, (89)4.11.1-4.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., Snyder, M. 2008. The transcriptional landscape of the yeast whole genome defined by RNA sequencing. *Science*, (320)1344-1349.
- Nookaew, I., Papini, M., Pornputtapong, N., Scalcinati, G., Fagerberg, L., Uhlen, M., Nielsen, J. 2012. A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* (40) 10084–10097.
- Odier A (1823) Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes. Mémoires de la Société d'Histoire Naturelle de Paris, vol Premier. Baudouin Frères Libraires-Éditeurs, Paris, pp 29–42.
- Paksoy, S., and Memis, H. 2006 “Rize for Agriculture”, *Agro-Industry and Tea*, 129-135.
- Pasini, G. 2017. Principal Component Analysis for Stock Portfolio Management. *International Journal of Pure and Applied Mathematics*. Volume 115 No. 1 2017, 153–167.
- Qu, M.B., Yang, Q. 2011. A novel alternative splicing site of class A chitin synthase from the insect *Ostrinia furnacalis*-gene organization, expression pattern and physiological significance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 923–931.
- Rubinstein L, Clever U. 1971. Non-conservative processing of ribosomal RNA in an insect, *Chironomus tentans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 246(3): 517–529.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, (270) 467–470.
- Seyyar, F., 2018. *Phalangium Opilio* Linnaeus, 1758 (Opiliones) Türünden Kitin Eldesi Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ömer Halisdemir Üniversitesi Niğde.
- Shang, F., Xiong, Y., Xia, W.K., Wei, D.D., Wei, D., Wang, J.J. 2016. Identification, characterization and functional analysis of a chitin synthase gene in the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida* (Homoptera, Aphididae). *Insect Molecular Biology*, 25 (4), 422-430.
- Shang, F., Xiong, Y., Xia, W.K., Wei, D.D., Wei, D.; Wang, J.J., 2016. Identification, characterization and functional analysis of a chitin synthase gene in the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida* (Homoptera, Aphididae). *Insect Mol. Biol.* (25), 422–430.
- Shao, Z.M., Li, Y.J., Ding, J.H., Liu, Z.X., Zhang, X.R., Wang, J., Sheng, S., Wu, F.A. 2020. Identification, Characterization, and Functional Analysis of Chitin Synthase Genes in *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(13), 4656.
- Shcherbakov, D.E., 2006. The earliest find of Tropiduchidae (Homoptera: Auchenorrhyncha), representing a new tribe, from the Eocene of Green River, USA, with notes on the fossil record of higher Fulgoroidea. *Russian Entomological Journal*, (15), 315-322.
- Shendure, J. 2008. The beginning of the end for microarrays? *Nat. Methods*, (5)585-587

- Shirk, P.D., Perera,P.O.,Shelby, K.S.,Furlong,R.B.,LoVullo,E.D.,Popham,H.J.R., 2015.Unique synteny and alternate splicing of the chitin synthases in closely related heliothine moths. *Gene*, (574), 121–139.
- Souza-Ferreira, P.S., Mansur, J.F., Berni, M., Moreira, M.F., Santos, R.E., Araújo, H.M.M., Souza, W., Ramos, I.B., Masuda, H., 2014. Chitin deposition on the embryonic cuticle of *Rhodnius prolixus*: The reduction of CHS transcripts by CHS–dsRNA injection in females affects chitin deposition and eclosion of the first instar nymph. *Insect Biochem. Mol. Biol*, (51), 101–109.
- Tang, W.J., Fernandez, J.G., Sohn, J.J., Amemiya, C.T. 2015. Chitin is endogenously produced in vertebrates. *Current Biology*, (25), 897–900.
- Tellam, R.L. and Eisemann, C., 2000. Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol*, (30), 1189–1201.
- Tian, H.G., Peng, H., Yao, Q., Chen, H., Xie, Q., Tang, B., Zhang, W., 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS One* (4), e6225.
- Torun,E., and Talug,C., 2005. Information sources used by manufacturers in scope of tea pruning project. *Journal of Agricultural Economics*,(11), 41-49.
- Tsaur, S.C., 2005. Some Fulgoroids (Insecta: Hemiptera) collected on Turtle Island, Taiwan, *Zoological Studies*, (44), 1-4
- Tsuchihara, K., Suzuki, Y., Wakaguri, H., Irie, T.,Tanimoto, K., Hashimoto, S.I., Matsushima, K., Sugano, J.M., Yamashita, R., Nakai, K., Bentley,D., Esumi, H., Sugano, S. 2009. Massivetranscriptional start site analysis of human genesin hypoxia cells.*Nucleic Acid Res*,(37)2249-2263.
- Ullah, F., Gul, H., Wang, X., Ding, Q., Said, F., Gao, X., Desneux, N., Song, D., 2020. RNAi-Mediated Knockdown of Chitin Synthase 1 (CHS1) Gene Causes Mortality and Decreased Longevity and Fecundity in *Aphis gossypii*. *Insects* (11,1), 22.
- Urban, J.M. and Cryan, J.R., 2007. Evolution of the planthoppers (Insecta: Hemiptera: Fulgoroidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*,(42), 556-572.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W.1995. Serial analysis of gene expression. *Science*, (270) 484–487.
- Wang, T., Li, B., Nelson, C.E. Nabavi, S. 2019. Comparative analysis of differential gene expression analysis tools for single-cell RNA sequencing data. *BMC Bioinformatics* 20, 40.
- Wang, X., Sui, W., Wu, W., Hou, X., Ou, M., Xiang, Y., Dai, Y. 2016. Whole- genome resequencing of 100 healthy individuals using DNA pooling. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(5), 3143-3150.
- Wang, Y., Fan, H.W., Huang, H.J., Xue, J., Wu, W.J., Bao, Y.Y., Xu, H.-J., Zhu, Z.-R., Cheng, J.A., Zhang, C.X., 2012. Chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants from two sap-sucking insects, *Nilaparvata lugens* and *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Biochem. Mol. Biol*,(42), 637–646.
- Wang, Y., Fan,H.W.,Huang,H.J., Xue,J.,Wen,J.W., Bao,Y.Y., Xu,H.J.,Zhu,Z.R., Cheng,J.A., Zhang,C.X., 2012. Chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants from two sap-sucking insects, *Nilaparvata lugens* and *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Biochem. Mol. Biol*,(42), 637–646.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. 2009. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics.*Nat. Rev. Genet*,(10)57-63.

- Wang, Z., Yang H., Zhou. C., Yang,W.J., Jin, D.C., Long, G.Y., 2019. Molecular cloning, expression, and functional analysis of the chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants in the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae) Scientific Reports volume (9), Article number: 1087
- Wilhelm, B.T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F.,Wood, V., Goodhead, I., Penkett, C.J., Rogers,J., and Bahler, J. 2008. Dynamic repertoire of eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution.Nature,(453)1239-1243.
- Winnebeck, E.C., Millar, C.D., Warman, G.R., 2010. Why does insect RNA look degraded? Journal of Insect Science, 10, 1, 159.
- Xia, W.K., Ding, T.B., Niu, J.Z., Liao, C.Y., Zhong, R., Yang, W.J., Liu, B., Dou, W., Wang, J.J. 2014. Exposure to Diflubenzuron Results in an Up-Regulation of a Chitin Synthase 1 Gene in Citrus Red Mite, *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). Int. J. Mol. Sci. 2014, 15(3), 3711-3728.
- Xu, C.O., Liang,A.P., Jiang, G.M. 2006. The genus *Euricania melichar* (Hemiptera: Ricaniidae) from China. The Raffles Bulletin of Zoology.54,1-10.
- Yamada, K., Lim, J., Dale, J.M., Chen, H., Shinn, P., Palm, C.J., Southwick, A.M., Wu, H.C., Kim, C., Nguyen, M., Pham, P., Cheuk, R., Karlin-Newmann, G., Liu, S.X., Lam, B., Sakano, H.,Wu, T., Yu, G., Miranda, M., Quach, H.L., Tripp,M., Chang, C.H., Lee, J.M., Toriumi, M., Chan, M.M., Tang, C.C., Onodera, C.S., Deng, J.M., Akiyama, K., Ansari, Y., Arakawa, T., Banh, J., Banno, F., Bowser, L., Brooks, S., Carninci, P., Chao, Q., Choy, N., Enju, A., Goldsmith, A.D., Gurjal, M., Hansen, N.F., Hayashizaki, Y., Johnson-Hopson, C., Hsuan, V.W., Iida, K.,Karnes, M., Khan, S., Koesema, E., Ishida, J., Jiang, P.X., Jones, T., Kawai, J., Kamiya, A.,Meyers, C., Nakajima, M., Narusaka, M., Seki, M., Sakurai, T., Satou, M., Tamse, R., Vaysberg, M., Wallender, E.K., Wong, C., Yamamura, Y., Yuan, S., Shinozaki, K., Davis, R.W., Theologis, A., Ecker, J.R. 2003. Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome.Science,(302)842-846.
- Yang, W.J., Xu, K. K., Cong, L., Wang, J.J. 2013. Identification, mRNA expression, and functional analysis of chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants in oriental fruit fly. *Bactrocera dorsalis*. International Journal of Biological Sciences, (9), 331–342.
- Yang, W.J., Xu, K.K., Cong, L., Wang, J.J. 2013. Identification, mRNA Expression, and Functional Analysis of Chitin Synthase 1 Gene and Its Two Alternative Splicing Variants in Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* Int J Biol Sci. 2013; 9(4): 331-342.
- Yates, J.A.F., Lamnidis, T.C., Borry, M., Valtuena, A.A., Fagernas, Z., Clayton, S., Garcia, M.U, Neukamm, J., Peltzer, A. 2021. Reproducible, portable, and efficient ancient genome reconstruction with nf- core/eager. PeerJ 9:e1094.
- Yavuz 2007 Hazelnut. Agricultural Economics Research Institute, Bakis, Ankara, Vol. (9). 8 p.
- Zdarta, J., Klapiszewski, L., Wysokowski, M., Norman, M., Kolodziejczak-Radzimska, A., Moszynski, D., Ehrlich, H., Maciejewski, H., Stelling, A.L., Jesionowski, T., 2015. Chitin-lignin material as a novel matrix for enzyme immobilization. Marine drugs 13(4):2424–2446.
- Zhang, J., Liu, X., Zhang, J., Li, D.,Sun, Y., Guo, Y., Ma , E., Zhu, K.Y., 2010. Silencing of two alternative splicing-derived mRNA variants of chitin synthase 1 gene by RNAi is lethal to the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). Insect Biochem. Mol. Biol, (40), 824–833.

- Zhao, S., Zhang, B., Zhang, Y., Gordon, W., Du, S., Paradis, T., ... & von Schack, D. 2016. Bioinformatics for RNA-Seq data analysis. *Bioinformatics—Updated Features and Applications*: InTech, 125-49.
- Zhao, Y., Sui, X., Xu, L., Liu, G., Lu, L., You, M., Xie, C.; Li, B., Ni, Z., Liang, R., 2018. Plant-mediated RNAi of grain aphid CHS1 gene confers common wheat resistance against aphids. *Pest Manag. Sci.*(747), 2754–2760.
- Zhu, K.Y., Merzendorfer, H., Zhang, W.Q., Zhang, J. Z., Muthukrishnan, S., 2016. Biosynthesis, turnover, and functions of chitin in insects. *Annu. Rev. Entomol*, (61), 177–196.
- Zhuo, W.W., Fang, Y., Kong, L., Li, X., Sima, Y., Xu, S. 2014. Chitin synthase A: a novel epidermal development regulation gene in the larvae of *Bombyx mori*. *Molecular Biology Reports*, (41), 4177–4186.
- Zimoc,D.,Hogenkamp,K.J.,Muthukrishnan,S.,Merzendorfer,H.2005. Regulation of chitin synthesis in the larval midgut of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (35) 515-527.
- Zimoch, L. and Merzendorfer, H., 2002. Immunolocalization of chitin synthase in the tobacco hornworm. *Cell Tissue Res.* (308), 287–297.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler			
Adı Soyadı	:	Serpil TURHAN	
Doğum tarihi	:		
Doğum Yeri	:		
Uyruğu	:		
Adres	:		
E-mail	:		
Eğitim			
Lise	:	Nene Hatun Kız Lisesi	
Lisans	:	Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji	
Yüksek lisans:	:	Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Hayvansal Biyoteknoloji Anabilim Dalı	
Yabancı Dil Bilgisi			
İngilizce	:	Orta	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar			
-			
Tezden Üretilmiş Yayınlar			
-			