

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

SÜNE (*Eurygaster maura*) VİTELLOGENİN GENLERİNİN KARAKTERİZASYONU
VE İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Aslı Dağeri

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Nurper Güz

Ocak

2016

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Aslı Dağeri

İmzası

ONAY

Doç. Dr. Nurper Güz danışmanlığında Aslı Dağeri tarafından hazırlanan bu çalışma 15/01/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ali ERGÜL

İmza:

Üye: Prof. Dr. Hasan TUNAZ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Nurper GÜZ

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Süne (*Eurygaster maura*) Vitellogenin genlerinin karakterizasyonu ve ifade düzeylerinin belirlenmesi

Aslı Dağeri

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Nurper Güz

Süne, *Eurygaster maura*, buğday tarlalarının en önemli zararlısıdır. Süne yaşam döngüsü “aktif” ve “pasif” olmak üzere ikiye ayrılır. Zararlı aktif dönemde beslenme, üreme, yumurta bırakma gibi faaliyetlerini yerine getirir ve sonra ölür. Yumurtadan çıkan nimflerin gelişmesiyle oluşan yeni nesil ergin bireyler buğday tarlalarında beslenip buğday hasadını takiben pasif döneme geçerler. Pasif dönem yarı uyku (yazlama) ve diyapoz (kışlama) dönemlerini kapsar. Süne diyapoz süresince yaşamını sürdürebilmek için vücudunda yağ olarak depoladığı besinleri kullanır ve ilkbaharda ovalara göç ederek biyolojik döngüsünü tamamlar. Böceklerde üreme başarısı ovarilere besin sağlayan vitellogenin (Vg) sentezine bağlıdır. Vg genelde yağ dokusundan sentezlenip, hemolimfe salgılanır ve gelişen oositler tarafından oosite alınır. Dişi bireylerle özdeşleşmiş bu proteinin son yıllarda üreme dışında farklı görevlerde de bulunabildiği saptanmıştır. Bu tez çalışmasında süne yağ dokusu cDNA kütüphanesinde saptanan üç adet vitellogenin proteinini kodlayan genler (*EmVg1*, *EmVg2* ve *EmVg3*) sunulmuş, PCR, RACE PCR ve dizileme teknikleri kullanılarak tahmini aminoasit dizilerinin karakterizasyonu yapılmıştır. Nükleotid ve tahmini aminoasit dizileri *EmVg*'lerin en fazla Hemiptera takımından *Plautia stali* Vg'lerine benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Filogenetik ağaçlar Neighbour Joining yöntemiyle, tahmini protein yapılarına ilişkin tahmini üç boyutlu yapılar ise Hidden Markov modeli kullanılarak tespit edilmiştir. Real Time PCR tekniği ile Vg ifade düzeyleri sünenin farklı gelişme dönemleri, farklı doku ve organları ile önemli biyolojik dönemlerinde araştırılmıştır. Analiz sonucu, *EmVg*'lerin sinir sistemi, yağ dokusu, ovarı, kas sistemi, malpigi tüpleri, orta bağırsak, baş ve trake gibi doku ve organlar arasında en yüksek böcek başında ifade olduğu görülürken, gelişme dönemine ilişkin ise en fazla ergin dönemde sentezlendiği ortaya çıkmıştır. Vg'lerin ayrıca dişi bireylerde en fazla ovalara göç öncesinde, erkekler bireylerde ise yazlama döneminde en yüksek ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

2016, 99 sayfa

Anahtar kelimeler: *Eurygaster maura*, vitellogenin, üreme, diyapoz



ABSTRACT

PhD Thesis

Molecular characterization of Vitellogenin genes and their expression levels in *Eurygaster maura*

Asli Dageri

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Nurper Guz

Sunn pest, *Eurygaster maura*, is one of the major harmful pests for cereal crops. The biological cycle of the sunn pest consists of active and passive stages. During the active stage, sunn pest completes the processes of feeding, mating, laying eggs and later dies. Following the wheat harvest, the new generation adults emerged from the hatched eggs enter a passive stage after feeding on grains. Passive stage comprises semi-sleep (aestivation) and diapause (overwintering) phases. Nutrition stored as fat body is consumed in order to survive during the diapause phase and sunn pest completes its biological cycle in the spring by migrating to the fields. Reproductive success of insects depends on vitellogenin (Vg) synthesis, which supplies nutrients to the ovaries. Vg is usually synthesized by fat body, secreted into the hemolymph and then sequestered by developing oocytes. In recent decades, it has been demonstrated that this protein, which has mainly been associated with females, also has different functions besides reproduction. In this thesis, three genes (*EmVg1*, *EmVg2* and *EmVg3*) encoding Vg proteins were presented in cDNA libraries generated from the fat body of overwintering adults and the characterization of the deduced amino acid sequences were carried out using PCR, RACE PCR and sequencing techniques. Nucleotide and deduced amino acid sequences reveal that *EmVgs* show high similarities to *Vgs* of *Plautia stali* from Hemipteran. Phylogenetic trees were inferred using the Neighbor-Joining method, while predicted three dimensional structures of the putative proteins were created using the Hidden Markov model. Vg expression levels of different tissues and organs, developmental stages, and biologically-important times were examined using Real Time PCR. High abundance of *EmVg* mRNAs were detected in the head among tissues and organs including the nervous system, fat body, ovary, muscles, Malpighian tubules, midgut, head, and trachea, while it is highly synthesized in adults relevant to developmental stages. Also highest expression of *EmVgs* was found in females in the pre-migration phase and in males during the aestivation phase.

2016, 99 pages

Keywords: *Eurygaster maura*, vitellogenin, reproduction, diapause.



TEŞEKKÜR

Doktora dönemim boyunca bana olan desteğini sonuna kadar hissettiren, akademik ve kişisel anlamda tecrübeler katan, öğrettikleri ve samimiyeti ile her zaman yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Nurper GÜZ'e minnettarlığımı sunarım. Tez dönemimde yapıcı ve öğretici katkılarını sağlayan tez izleme komitesi jürilerim Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY ve Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR-DEDEOĞLU'na teşekkür ederim. Bir dönem danışman hocam olan Prof. Dr. M. Oktay GÜRKAN'a katkıları için teşekkür ederim.

Bu çalışmanın temellerinin atıldığı 1100167 no'lu "Sünede Faydalı Genlerin Belirlenmesi" adlı projeye verdiği destekten dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na, 15L0447002 no'lu "Sünede *Vitellogenin* Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu" adlı projeye verilen destekten dolayı ise Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne teşekkür ederim.

Başta Prof. Dr. F. Sara DOLAR, Prof. Dr. Şerife BAYRAM ve Dr. Arzu ÇELİK OĞUZ olmak üzere Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü çalışanlarına teşekkür ederim. Tezde süne fotoğraflarını kullanmama izin veren Prof. Dr. Erhan KOÇAK'a (Süleyman Demirel Üniversitesi), sağladığı süne literatür desteği için Uzm. Ayhan ÖĞRETEN'e (Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü) teşekkür ederim. Doktora dönemimde yaptığım araştırmalar süresince araştırmacı olarak laboratuvarlarından faydalanma imkânı tanıyan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ve Prof. Dr. Ali ERGÜL'e, enstitünün diğer öğretim üyelerine; başta Prof. Dr. Martin BEYE, Dr. Christina SCHULTE ve Vasco KOCH olmak üzere Heinrich-Heine Üniversitesi Evrimsel Genetik Enstitüsü'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Hocamla tanışmama vesile olan tezimin her aşamasında manevi ve bilimsel anlamda katkıları sağlayan Tayfun ŞENGEL'e; Ankara'da bana evinin ve yüreğinin kapılarını açan dostlarım Nazlı N. SÖZMEN, Evrim TEKELİ, Ecem KONCA, Miray DURLU KÜLBAŞ ve Orçun İŞLER'e; bu süreçte kişisel gelişimime katkı sağlayan yoga hocam Esma BAL'a, yazım sürecinde başım her sıkıştığında yardımlarını esirgemeyen iş arkadaşlarım Dr. Eda UĞURTAY ve Dr. Yaşam BARLAK'a, doktora ders dönemini eğlenceli kılan sevgili dönem arkadaşlarım Nihal AKTAŞ, Duru ARAS, Sezen GÜNTEKİN, Aybuke S. KOCA,

Tuğba ERDOĞAN ve Yener KURMAN'a; tez dönemim boyunca bana uzaklardan destek olan dostlarım Jörg JERUSALEM ve Ramakrishna RAJU'ya minnettarlıklarımı sunarım.

Ablam Nazan DAĞERİ DERE başta olmak üzere, yürüdüğüm yolu benim için her zaman açık tutan canım aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Aslı DAĞERİ
Samsun/2016



İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	vii
SEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xviii
SİMGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. SÜNEİN TANIMI.....	3
2.1.1. SÜNE BİYOLOJİSİ.....	3
2.1.2. SÜNE ZARARI	5
2.1.3. SÜNE MÜCADELESİ	6
2.1.3.1. Süne Mücadelesinde 1927 – 1960 Yılları.....	6
2.1.3.2. Süne Mücadelesinde 1960 – 2004 Yılları.....	6
2.1.3.3. Süne Mücadelesinde 2004 – Günümüz.....	7
2.2. BÖCEKLERDE DİŞİ ÜREME FİZYOLOJİSİ	8
2.2.1. BÖCEKLERDE DİŞİ ÜREME SİSTEMİNE GENEL BİR BAKIŞ.....	8
2.2.2. VİTELLOGENEZ	9
2.2.3. VİTELLOGENİN REGÜLASYONU	11

2.3. BÖCEKLERDE GEN VE PROTEİN KARAKTERİZASYONU, İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YAKLAŞIMLAR.....	12
2.3.1. TRANSKRİPTOM ANALİZLERİ.....	12
2.3.1.1. Yeni Nesil Dizileme.....	13
2.3.1.2. Mikrodizin	14
2.3.2. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ (REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION).....	14
2.3.3. RACE PCR (RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS=cDNA UÇLARININ HIZLI ÇOĞALTIMI).....	15
2.3.4. NORTHERN BLOT	15
2.3.5. WESTERN BLOT	16
2.3.6. RNA İNTERFERANS	16
2.3.6.1. Mikroenjeksiyon Yöntemi	17
2.3.6.2. Yapay Besi Ortamı ile Besleme.....	17
2.3.6.3. Daldırma Yöntemi	17
2.3.6.4. dsRNA İfadesi Yapan Bakterilerle Besleme Yöntemi	18
2.3.6.5. RNAi ile Zararlı Böcek Türlerine Dirençli Bitki Üretimi	18
2.3.6.6. Nanopartikül Aracılığı ile Böceklerde RNAi	18
2.4. BÖCEKLERDE VİTELLOGENİN PROTEİNİ VE GENİN REGÜLASYONU İLE İLGİLİ YAPILAN ARAŞTIRMALAR	19
2.4.1. BÖCEKLERDE VG GEN VE PROTEİN KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI.....	19
2.4.2. BÖCEKLERDE VİTELLOGENİN İFADESİNİN TESPİTİ VE GEN SUSTURMA ÇALIŞMALARI.....	22

2.4.3. BÖCEKLERDE VİTELLOGENİN REGÜLASYONUNA YÖNELİK YAPILAN ÇALIŞMALAR	24
<u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u>	28
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	30
4.1. MATERYAL	30
4.2. YÖNTEM.....	31
4.2.1. BÖCEKLERİN TOPLANMASI.....	33
4.2.2. DİSEKSİYON	34
4.2.3. RNA İZOLASYONU	35
4.2.4. CDNA SENTEZİ	36
4.2.5. PCR.....	36
4.2.6. PCR ÜRÜNLERİNİN GÖRÜNTÜLENMESİ	39
4.2.7. RACE PCR	39
4.2.7.1. RACE PCR Primer Tasarımı	39
4.2.7.2. 5' RACE PCR.....	41
4.2.7.3. 3' RACE PCR.....	44
4.2.7.4. Jel Saflaştırma.....	46
4.2.7.5. Filogenetik Analiz.....	47
4.2.8. EŞ ZAMANLI PCR (RT-QPCR).....	47
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	50
5.1. VİTELLOGENİN GENLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU ...	50
5.1.1. <i>EMVG1</i> GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU	50
5.1.1.1. <i>EMVG1</i> GENİNİN CDNA KÜTÜPHANESİNDE TARANMASI.....	50

5.1.1.2.	EmVg1'in BLAST Ve Domain Analizleri	50
5.1.1.3.	EmVg1 Proteinini Sinyal Peptidi Analizi	51
5.1.1.4.	EmVg1 Proteinini Fosforilasyon Potansiyeli.....	52
5.1.1.5.	EmVg1 Proteinini Glikozilasyon Potansiyelleri	52
5.1.1.6.	EmVg1 Filogenetik Analizi	55
5.1.1.7.	EmVg1 Tahmini Proteininin Üç Boyutlu Tahmini Yapısı	56
5.1.2.	<i>EMVG2</i> GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU	56
5.1.2.1.	<i>EmVg2</i> Geninin cDNA Kütüphanesinde Taranması	56
5.1.2.2.	<i>EmVg2</i> Geninin Eksik Dizisine Ait PCR ve Dizi Analiz Sonuçları.....	56
5.1.2.3.	EmVg2 BLAST ve Domain Analizleri.....	57
5.1.2.4.	EmVg2 Proteinini Sinyal Peptid Analizi	58
5.1.2.5.	EmVg2 Proteinini Fosforilasyon Potansiyeli.....	59
5.1.2.6.	EmVg2 Glikozilasyon Potansiyeli	60
5.1.2.7.	EmVg2 Filogenetik Analizi	62
5.1.2.8.	EmVg2 Tahmini Proteininin Üç Boyutlu Tahmini Yapısı	63
5.1.3.	<i>EMVG3</i> GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU	64
5.1.3.1.	<i>EmVg3</i> Geninin cDNA Kütüphanesinde Taranması	64
5.1.3.2.	<i>EmVg3</i> Geninin Eksik Dizisine Ait PCR ve Dizi Analiz Sonuçları.....	64
5.1.3.3.	<i>EmVg3</i> RACE PCR ve Dizi Analiz Sonuçları	65
5.1.3.4.	EmVg3 BLAST ve Domain Analizi	65
5.1.3.5.	EmVg3 Proteinini Sinyal Peptid Analizi	66

5.1.3.6. EmVg3 Proteini Fosforilasyon Potansiyeli.....	67
5.1.3.7. EmVg3 Proteini Glikozilasyon Potansiyelleri	67
5.1.3.8. EmVg3 Filogenetik Analizi	69
5.1.3.9. EmVg3 Tahmini Proteininin Üç Boyutlu Tahmini Yapısı	70
5.2. VİTELLOGENİN GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ	71
5.2.1. SÜNENİN FARKLI DOKU VE ORGANLARINDAKİ EMVG'LERİN İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ.....	71
5.2.2. SÜNENİN FARKLI GELİŞME DÖNEMLERİNDEKİ EMVG İFADE DÜZEYLERİ.....	73
5.2.3. SÜNEDE EMVG'LERİN BİYOLOJİK İFADE DAĞILIMLARI.....	73
5.2.3.1. Süne Dişi Bireylerinde EmVg İfade Düzeyleri.....	73
5.2.3.2. Süne Erkek Bireylerinde EmVg İfade Düzeyleri.....	74
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	76
6.1. VİTELLOGENİN GENLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU ..	76
6.1.1. EMVG1 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU	76
6.1.2. EMVG2 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU	77
6.1.3. EMVG3 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU	77
6.2. SÜNEDE EMVG'LERİN İFADE DÜZEYLERİ.....	78
6.2.1. EMVG'LERİN DOKUSAL İFADE DÜZEYLERİ	78
6.2.2. EMVG'LERİN DÖNEMSEL İFADE DAĞILIMLARI	79
6.2.3. SÜNEDE EMVG'LERİN BİYOLOJİK İFADE DAĞILIMLARI.....	80
6.2.3.1. Süne Dişi Bireylerinde EmVg İfade Dağılımları	80
6.2.3.2. Süne Erkek Bireylerinde EmVg İfade Dağılımları	81
6.3. SONUÇ.....	82

<u>7. KAYNAKLAR</u>	<u>84</u>
<u>8. ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>100</u>
<u>9. TEZ DÖNEMİNDE YAPILAN YAYINLAR.....</u>	<u>101</u>



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Süne yumurtalarında gelişime bağlı olarak gözlenen değişimler.....	4
Şekil 2.2. Buğday bitkisi üzerinde beslenen ergin süne	5
Şekil 2.3. Dişi üreme sistemi	8
Şekil 2.4. Sivrisinekte vitellogenезде meydana gelen reseptör-aracılı endositoz	10
Şekil 2.5. Sivrisinekte Vg mRNA'sından vitellin oluşana dek gerçekleşen işlemler	11
Şekil 2.6. Pirosekanslama tepkimesi	13
Şekil 4.1. <i>E. maura</i> ifade analizlerinde kullanılan doku, organ ve dönemler	30
Şekil 4.2. <i>EmVg</i> genlerinin karakterizasyon deney aşamaları	31
Şekil 4.3. <i>EmVg</i> genlerinin ifade düzeyi deney aşamaları	32
Şekil 4.4. Sünenin biyolojisine göre yapılan örnekleme	34
Şekil 4.5. Contig00013'ün ORF analizi	37
Şekil 4.6. Hatalı olduğu düşünülen bölge üzerinde primerlerin gösterimi.....	37
Şekil 4.7. Contig00385 ve contig00092'nin BLAST analizi	38
Şekil 4.8. <i>EmVg3</i> contigleri arasındaki bölgenin çoğaltımı için tasarlanan primerler.....	39
Şekil 4.9. <i>EmVg3</i> RACE PCR primerleri	40
Şekil 4.10. 5' RACE PCR reaksiyonuna genel bir bakış	41
Şekil 4.11. 3' RACE PCR reaksiyonuna genel bir bakış	45
Şekil 5.1. <i>EmVg1</i> proteinin BLAST analizi.....	51
Şekil 5.2. <i>EmVg1</i> proteinine ait korunmuş domainler	51
Şekil 5.3. <i>EmVg1</i> proteini sinyal peptid analizi.....	52

Şekil 5.4. EmVg1 proteinin fosforilasyon potansiyeli	52
Şekil 5.5. EmVg1 proteini N tipi glikozilasyon potansiyeli.....	53
Şekil 5.6. EmVg1 proteini O tipi glikozilasyon potansiyeli.....	53
Şekil 5.7. EmVg1 proteini moleküler karakterizasyonu.....	54
Şekil 5.8. EmVg1 proteini filogenetik ağacı	55
Şekil 5.9. EmVg1 proteininin tahmini üç boyutlu tahmini yapısı.....	56
Şekil 5.10. <i>EmVg2</i> PCR ürünü agaroz jel görüntüsü	57
Şekil 5.11. Contig00013'ün dizi analizi sonuçları ile hizalanması	57
Şekil 5.12. EmVg2 proteinine ait BLAST analizi	58
Şekil 5.13. EmVg2 proteinine ait korunmuş domainler	58
Şekil 5.14. EmVg2 proteini sinyal peptid analizi.....	59
Şekil 5.15.EmVg2 proteininin fosforilasyon potansiyeli	59
Şekil 5.16. EmVg2 proteininin N tipi glikozilasyon potansiyeli.....	60
Şekil 5.17. EmVg2 proteini moleküler karakterizasyonu.....	61
Şekil 5.18. EmVg2 proteini filogenetik ağacı.	63
Şekil 5.19. EmVg2 tahmini proteini tahmini üç boyutlu tahmini yapısı.....	64
Şekil 5.20. EmVg3 PCR jel görüntüsü	65
Şekil 5.21. Contig00385 ve contig00092 arası nükleotid dizisi BLAST görüntüsü	65
Şekil 5.22. EmVg3 proteininin BLAST analizi.....	66
Şekil 5.23. EmVg3 proteinine ait korunmuş domainler	66
Şekil 5.24. EmVg3 proteininin sinyal peptid analizi.....	67

Şekil 5.25. EmVg3 proteini fosforilasyon potansiyeli	67
Şekil 5.26. EmVg3 N tipi glikozilasyon potansiyeli	68
Şekil 5.27. EmVg3 O tipi glikozilasyon potansiyeli	68
Şekil 5.28.EmVg3 proteini moleküler karakterizasyonu.....	69
Şekil 5.29. EmVg3 proteini filogenetik ağacı.	70
Şekil 5.30. EmVg3 tahmini proteininin üç boyutlu tahmini yapısı	71
Şekil 5.31. Sünenin farklı doku ve organlarındaki <i>EmVg</i> ifade profilleri.....	72
Şekil 5.32. <i>EmVg1-2-3</i> genlerinin farklı gelişme dönemlerindeki ifade profilleri	73
Şekil 5.33. <i>EmVg1-2-3</i> genlerinin dişi bireylerdeki ifade profilleri.....	74
Şekil 5.34. <i>EmVg1-2-3</i> genlerinin erkek bireylerdeki ifade profilleri	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. PCR analizinde kullanılan koşullar	38
Çizelge 4.2. <i>EmVg3</i> cDNA'sına özgü tasarlanan RACE PCR primer özellikleri	41
Çizelge 4.3. 5' RACE PCR ikinci aşama PCR koşulları.....	43
Çizelge 4.4. 5' RACE PCR üçüncü aşama PCR koşulları	44
Çizelge 4.5. 3' RACE PCR koşulları	46
Çizelge 4.6.Eş Zamanlı PCR analizlerinde kullanılan primerlere ait bilgiler	48
Çizelge 4.7. Eş Zamanlı PCR analizlerinde kullanılan PCR koşulları.....	49

SİMGELER DİZİNİ

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
aa	Aminoasit
ATP	Adenozin trifosfat
ATPaz	Adenozin trifosfataz
bç	Baz çifti
C-terminal	Karboksi terminal
cDNA	Komplementer DNA
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid
dsRNA	Çift zincirli (double strand) RNA
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
g	Gravitational force (Yerçekim kuvveti)
FoXO	Forkhead box transkripsiyon faktörü
HCl	Hidroklorik asit
K	Potasyum
kb	Kilobaz
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
LDLR	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü / Low density lipoprotein receptor

MgCl ₂	Magnezyum klorür
mRNA	Mesajcı RNA
N-terminal	Amino terminal
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Sodyum fosfat
ORF	Açık Okuma Çerçevesi / Open Reading Frame
PAGE	Poliakrilamid jel (gel) elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Tepkimesi / Polymerase chain reaction
pH	Power of Hydrogen / Hidrojen Gücü
RACE	cDNA uçlarının hızlı çoğaltımı / Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interferans
rpm	Revolution per minute / Dakikadaki dönme hızı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
UV	Ultraviyole
Vg	Vitellogenin

1. GİRİŞ

Günlük insan beslenmesinin en önemli kaynağı buğdaydır. Süne, *Eurygaster maura* (Hemiptera: Scutelleridae), buğdayın en önemli zararlısıdır. Zararlı sahip olduğu sokucu-emici ağız yapısı ile buğday tanesini sokup emerek “akbaşak” ve “kurtboğazı” zararlarını oluşturur. Süne zararı görmüş üründe kalite ve verim kaybı meydana gelir.

Süne başta Güneydoğu Anadolu Bölgesi olmak üzere, 1920’li yıllardan bu yana ülkemizde yayılış göstermekte ve her yıl ortalama 70-80 milyon dekar alana buğday ekilmektedir. Mevcut üretim alanlarının yarısına yakın bölümü süne tehditi altında kalmakta ve etkili mücadele yapılmadığı takdirde, üretimde %100’e ulaşan ürün ve kalite kayıpları ile karşı karşıya kalınmaktadır. Süne ile mücadelede bugüne kadar fiziksel, mekanik, kimyasal ve biyolojik mücadele yöntemlerinden faydalanılmıştır. Günümüzde ise süne mücadelesinde tüm mücadele yöntemlerini bir arada barındıran entegre mücadele yönetim sistemi uygulanmaya çalışılmaktadır (1).

Süne yaşam döngüsü “aktif” ve “pasif” olmak üzere ikiye ayrılır. Zararlı aktif dönemde beslenme, üreme, yumurta bırakma gibi faaliyetlerini yerine getirirken, bu dönemde bir dişi ortalama 80 adet yumurtayı, yumurta paketleri hâlinde buğday yaprakları üzerine bırakır. Pasif dönemi ise kendi içerisinde “yazlama” ve “kışlama” olarak ikiye ayırmak mümkündür. Yazlama döneminde yarı uyku hâlinde olan süneler, yer değiştirme ve hareket etme davranışlarını sürdürebilirler. Kışlama döneminde ise, tam uyku hâlinde olan süneler diyapoz süresince yaşamlarını sürdürebilmek için yağ dokusunu rezerv olarak kullanırlar. Havaaların ısınması ile birlikte gruplar hâlinde ovalara inen kışlamış erginler yumurta bıraktıktan sonra ölürler (2-4). Yumurtadan çıkan nimfler ve daha sonra ergin hâlini alan bu bireyler buğday başaklarında oburca beslenip, buğday hasadını takiben pasif döneme geçerler. Pasif dönemdeki süneler yazlama süreci sonrası kışlaklara çekilirler (3, 5).

Böceklerde ovarilere besin sağlayan en önemli proteinlerden birisi vitellogeninlerdir (6). Vitellogenin genellikle ekstraovarial olarak abdominal yağ dokusunda sentezlenir, hemolimfe salınır ve gelişen oositlerde bulunan reseptörler tarafından oosite alınır (7-9). Dişi üreme sistemindeki önemli rolü nedeni ile vitellogenin, dişilere özelleşmiş bir protein olarak bilinmektedir (9). Ancak yapılan çalışmalar bu proteinin erkek bireylerde ve seksüel

açından gelişmemiş canlılarda da sentezlendiğini ortaya koymuş ve vitellogeninin üreme dışında başka görevlerde de bulunabileceğini akıllara getirmiştir (10, 11). Son yıllarda vitellogeninin işçi arılarda sosyal açıdan hormonal düzeni sağladığı, antioksidan görevi yaptığı, ayrıca sosyal böceklerde kast oluşumunda görev paylaşımı ve davranış özelleşmesinde rol aldığı rapor edilmiştir (12-17).

Günümüzde Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji alanlarında kaydedilen ilerlemeler ile fonksiyonel genomik çalışmalarını adı altında, hedef genlerin karakterizasyonu, organizmadaki ifade seviyelerinin belirlenmesi ve bu genlerin ifadesine müdahale yöntemleri geliştirilmekte ve uygulanmaktadır. Böceklerde yapılan bu çalışmalarla organizma fizyolojisinde yer alan yolaklar anlaşılabilir, Bitki Koruma alanında zararlılarla mücadelede alternatif teknikler geliştirilebilmektedir. Bu alanda süne ilgili yapılan çalışmaların sayısı, diğer böceklere kıyasla oldukça azdır.

Bu tez çalışması ile vitellogenin proteinlerinin süne üreme fizyolojisindeki rolünün anlaşılması ve bu kapsamda elde edilen bilgilerin kullanılmasıyla süne mücadelesinde yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlamak hedeflenmektedir. Süne vitellogenin proteinini kodlayan üç gen bulunmuştur. *EmVg1*, *EmVg2* ve *EmVg3* olarak isimlendirilen bu üç genin karakterizasyonları yapılmıştır. Dişi üreme sistemiyle özdeşleştirilen bu genlerin sünenin farklı gelişme dönemlerinin yanı sıra, farklı doku ve organlarındaki ifade profilleri araştırılmıştır. Ayrıca süne biyolojisinde yer alan önemli dönemlerde, her iki cinsiyete ait örnekler toplanarak, bu genlerin ifade seviyeleri tespit edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. SÜNENİN TANIMI

Süne, *Eurygaster* sp., Hemiptera takımından Scutelleridae familyasına ait yaklaşık 1 cm boyunda, toprak renginde, yassı vücutlu, sokucu emici ağız yapısına sahip bir zararlıdır. Dünyada Yakın ve Orta Doğu ülkeleri ile Doğu ve Güneydoğu Avrupa ülkelerinin tahıl alanlarında baskın tür olan süne, 1927 yılından beri Türkiye’de en fazla Güneydoğu bölgesi olmak üzere, birçok kesimde yayılış gösteren önemli tarımsal zararlılardan biridir (18-22). Dünyada *Eurygaster* cinsine ait on beş tür bulunmaktadır. Ülkemizde ise ekonomik olarak zarar yapan *Eurygaster integriceps* Put., *Eurygaster maura* L. ve *Eurygaster austriaca* Schrank türlerinin yanı sıra, ayrıca zarar yapmayan *Eurygaster dilaticollis* Dofhrn, *Eurygaster hottentota* F., *Eurygaster schreiberi* Mont. ve *Eurygaster testudinoria* Geoff. türleri ile birlikte toplam yedi türü saptanmıştır (2-4).

Tez çalışmasının ana materyalini oluşturan *E. maura* oval görünümlü, geniş ve yassı yapıda vücuda sahiptir. Zararlıının üçgen şeklindeki başı protoraks içerisine dâhil olmuştur. Baş kısmında iki adet petek göz ve beş segmentli bir çift anten bulunmaktadır. *E. integriceps*’e büyük oranda benzerlik gösteren türün ayrımı, erkek bireylerde üreme organının kitin yapısındaki çıkıntılarının kıvrık olması ile dişi bireylerde ise orta genital plakalanın VII. abdominal sternumun kenarına ulaşması ile yapılabilmektedir (3, 23).

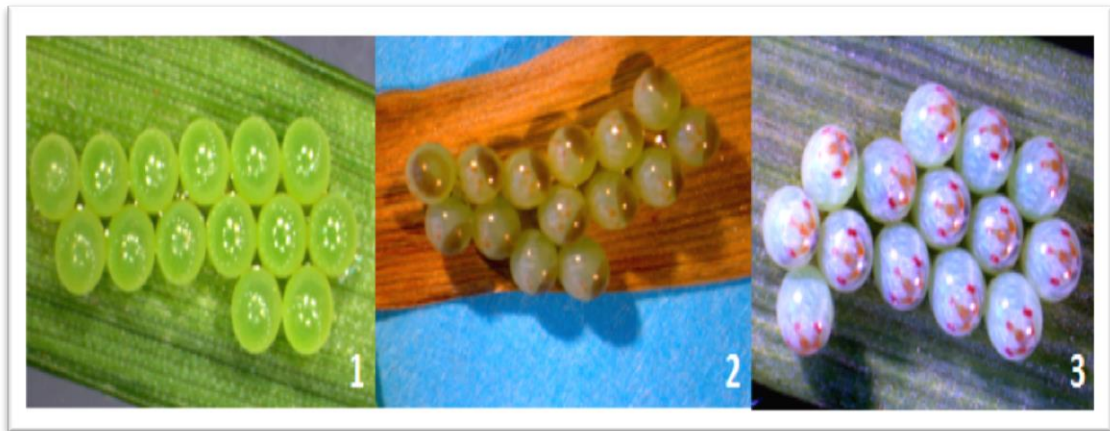
2.1.1. SÜNE BİYOLOJİSİ

Süne yaşam döngüsünü aktif ve pasif olmak üzere iki evrede tamamlayan, yılda tek döl veren bir zararlıdır. Erginler dokuz ay süren pasif dönemini, başta yaz mevsiminin bir bölümü olmak üzere, sonbahar ve kış mevsimlerinin tamamını ve ayrıca ilkbaharın bir bölümünü kışlak alanlarda diyapoz hâlinde geçirirler. Yüksek yerlerde kışlayan böceğin pasif dönemi de kendi içerisinde “yazlama” ve “kışlama” olarak ikiye ayrılır. Süne yazlama döneminde yarı uyku hâlinde hareket yeteneğini sürdürüp, yer değiştirebilmektedir. Kışlama döneminde ise Ekim-Kasım aylarından Mart-Nisan aylarına kadar tam diyapoz hâlinde yaşamını sürdürmektedir. Yazlama döneminde yüksek yerlere göç eden süneler, kış aylarında soğuklardan korunmak amacıyla aşağı bölgelere yerleşirler (2-4). Zararlı kış aylarını kışlak alanların bitki örtüsüne bağlı olarak meşe, çam,

kirpi otu, geven gibi bitkilerle, yere dökülmüş yaprakların altında gizlenerek geçirir. Kışlamış erginler bahar mevsimi ile beraber kışladıkları bölgelerde toprak sıcaklığı 15°C'ye ulaştığında, tahıl alanlarına göç ederler. Erginler göç ettikleri bölgede beslenir, çiftleşir ve hububat yapraklarının alt yüzeyine yumurta bıraktıktan yaklaşık 1-4 hafta sonra ölürlür. Dişilerin yumurtlama süresi 1-2 ay kadar devam eder. Dişi bireyler ortalama 80 adet yumurtayı 5-6 yumurtlamada 12-14 adetlik yumurta paketleri şeklinde bırakırlar (3).

Süne yumurtalarında gelişime bağlı olarak bazı değişiklikler görülür (Şekil 2.1). Yumurtalar ilk bırakıldıklarında çapları 1-1,2 mm, renkleri ise üzerinde bulunduğu yaprağın filiz yeşili rengindedir (Şekil 2.1.1). Yumurtalar buldukları bölgenin iklim şartlarına göre ortalama 3-4 gün sonra esmerleşmeye başlarlar. Yaklaşık 5 gün geçtikten sonra, yumurta üzerinde siyah yuvarlak bir leke meydana gelir (Şekil 2.1.2). Lekeler 2-3 gün sonra kaybolur ve çapa şeklinde kırmızı renkler oluşur (Şekil 2.1.3) (2-4). Yaklaşık bir hafta sonra açılan yumurtalardan 1. dönem nimfler çıkar. Beşinci dönem nimfe ulaşıldığında ise yeni nesil erginler meydana gelir. Yumurtadan ergin oluşumuna dek geçen bu süre yaklaşık 1,5-2 ay sürer.

Yeni nesil erginler kışlama öncesi enerji depolayabilmek için buğdayda oburca beslenir (Şekil 2.2) ve hasat dönemi sona erdiğinde kışlama alanlarına çekilirler (3, 5). Kışlaklarda pasif dönemlerini geçiren süneler, beslenme sonrası vücutlarında depoladıkları yağ dokusunu enerji kaynağı olarak kullanarak, hayatlarını sürdürürler. Bu dönemde harcanan yağ oranı iklim ve çevre koşullarına bağlı olarak, kışlama döneminde yazlama dönemine göre daha fazladır (3, 24).



Şekil 2.1. Süne yumurtalarında gelişime bağlı olarak gözlenen değişimler



Şekil 2.2. Buğday bitkisi üzerinde beslenen ergin süne

Yeni nesil erginlerin ovalarda görülmesi o yılın iklim ve çevre koşullarına göre değişmekle beraber, genellikle Mayıs ve Temmuz ayları arasındadır. Yeni nesil erginler kışı geçirebilmek için buğday tarlalarında oburca beslenirken, sadece 1-2 günde buğdayda %100'e varan ekonomik zarar meydana getirebilirler. Buğdayın olgunlaşım sertleşmeye başlaması ve havaların soğuması ile beraber ovalardan kışlak alanlara doğru göç ederler (3).

2.1.2. SÜNE ZARARI

Süne, erken dönemdeki buğdayların saplarını sokup emerek beslenmek suretiyle, bitkinin kurummasına neden olur. Bu zarara "kurtboğazı" zararı adı verilir. Çiçeklenme dönemindeki buğday saplarında beslenerek, buğdayın başaklarında beyazlaşmaya ve başakların kurummasına neden olur. Bu zarar şekline ise "akbaşak" zararı adı verilmektedir. Süne süt olum dönemindeki buğdayın tanelerinde beslendiğinde, ekmeklik, makarnalık ve tohumluk olarak kullanılacak ürünün niteliklerini yitirmesine sebep olur (2, 3, 25).

Süne, sokucu emici ağız yapısıyla emgi yaparken, buğday tanesinin içerisine proteolitik enzimler bırakarak, buğdaydaki gluten proteininin hidrolizasyonuna sebep olur. Bırakılan proteaz enzimi süne zararına uğramış buğdayın işlenmesi esnasında, tanenin öğütülmesiyle

una karışır, ancak su içeriği yeterli olmadığı için enzim herhangi bir etki göstermez. Uygun nem ve sıcaklık koşullarının sağlanmasıyla un hamur hâline geldiğinde, enzim aktifleşerek buğdaydaki gluteni parçalar. Bunun sonucunda hamur yumuşar, hamurun yoğurma ve biçim verme işlemleri sırasında esnekliği azalır, makine ve elde işlenmesi zorlaşır, fermentasyonda gaz tutma potansiyeli azalarak ekmeğin kabarması engellenir (26). Özellikle tane oluşum döneminde meydana gelen süne emgi oranı %5'ten fazla ise, buğday ekmeklik olma özelliğini yitirir (27).

2.1.3. SÜNE MÜCADELESİ

Süne mücadelesini üç kademede incelemek mümkündür (2).

2.1.3.1. Süne Mücadelesinde 1927–1960 Yılları

Geçmiş yıllarda hububat üreticileri eğitim eksiklikleri nedeniyle süne mücadelesine ilişkin olarak, buğday tarlalarına muska asmak ve ip çekmek gibi yöntemleri kendi başlarına üreterek uygulamışlardır (2, 28, 29). 1928 yılında ise süne mücadelesine ilk kez devlet tarafından destek verilmiştir. Çiftçiler elle, atrapla ve kalburla süne toplamaya teşvik edilerek, fiziksel mücadele uygulanmaya başlanmıştır. Toplanan kışlamış ergin süneler devlet tarafından satın alınmış ve kireç çukurlarında imha edilmiştir. Fiziksel mücadele 1954 yılına kadar sürdürülmüştür (29). 1939 yılından itibaren sünenin kışlak alanlarda altında bulunduğu bitkiler gaz yağı ve alev makinesi ile yakılarak, mekanik mücadele uygulanmaya başlanmıştır. Yapılan işlemler toprak erozyonu ve doğa tahribatına neden olduğu için 1954 yılında durdurulmuştur. Bu süre zarfında süne toplama makinesi ile mekanik mücadele uygulanmaya devam edilmiş, ancak herhangi bir verim sağlanamamıştır (2, 29). 1955 yılında ise kimyasal mücadele, zararlının nimf ve yeni nesil ergin dönemlerinde uygulanmaya başlanmıştır.

2.1.3.2. Süne Mücadelesinde 1960 – 2004 Yılları

Kimyasal mücadelenin başlatıldığı ilk on yıl organik fosforlu ilaçlar (parathion) ve klorlandırılmış hidrokarbonlu bileşikler (DDT) kullanılmıştır. Mücadele 1967 yılına kadar toz ilaçlarla sürdürülürken, bu listeye daha sonra sıvı formülasyona sahip ilaçlar da eklenmiştir (30). 1983 yılında DDT'nin kullanımının yasaklanmasıyla mücadeleye sıvı formülasyonlu ilaçlarla devam edilmiştir. Geniş alanlarda sentetik piretroidli ilaçların

kullanımına 1985 yılında, ULV (Ultra low volume–Çok düşük hacimli) formülasyonlu ilaçların kullanıma geçiş ise 1987 yılında başlanmıştır. ULV uygulamasının kullanım oranı rüzgârla başka alanlara taşınma ve doğal düşmanlarda oluşturduğu olumsuz etkisinden dolayı 2000’li yıllarda azalmıştır (2, 28).

Sünenin biyolojik mücadelesinde kullanılabilir doğal düşmanlar; yumurta parazitoit ve predatörleri, ergin iç ve dış parazitoitleri, ergin ve nimf predatörleri ile hastalık etmeni *Beauveria* ve *Aspergillus* funguslarıdır (1). Trakya’da 1995 yılında buğday tarlalarına *Trissolcus grandis* türüne ait parazitoidin salımı gerçekleştirilmiş, ancak salım geciktiği için başarılı sonuç alınamamıştır (1, 31).

2.1.3.3. Süne Mücadelesinde 2004– Günümüz

Kimyasal mücadele uygulaması 2006 yılına kadar çoğunlukla uçak ile sürdürülmüştür. 2006 itibari ile bu uygulamaya son verilmiş ve sadece yer aletleri ile kimyasal mücadeleye devam edilmiştir. Süne ile mücadele, ilk uygulanmaya başladığı itibaren devlet mücadelesi şeklinde yürütülmüştür. 2005 yılı itibariyle bu mücadele kademeli olarak Devlet Yardım Mücadelesi’ne, 2009 yılından itibaren ise Yönetimli Çiftçi Mücadelesi’ne dönüştürülmüş ve günümüzde bu uygulama hâlen devam etmektedir (1, 30).

Günümüzde süne ile mücadele çalışmaları entegre mücadele şeklinde sürdürülmektedir. Çevre ve Orman Bakanlığı ile Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı süne ile biyolojik mücadelede görev alan parazitoidlerin etkinliğini arttırmak amacı ile “Ağaçlandırma Projesi” başlatmıştır. Proje kapsamında süne ile yoğun mücadelenin gerçekleştirildiği illerde Ahlat, Akasya, Badem, Dut ve Sarısalkım ağaçları dikilmiştir. Bu amaçla Konya Şeker Fabrikası, Konya ve Ankara’da bulunan tahıl alanlarının etrafına bir milyon üzerinde ağaç dikimi gerçekleştirmiştir (1).

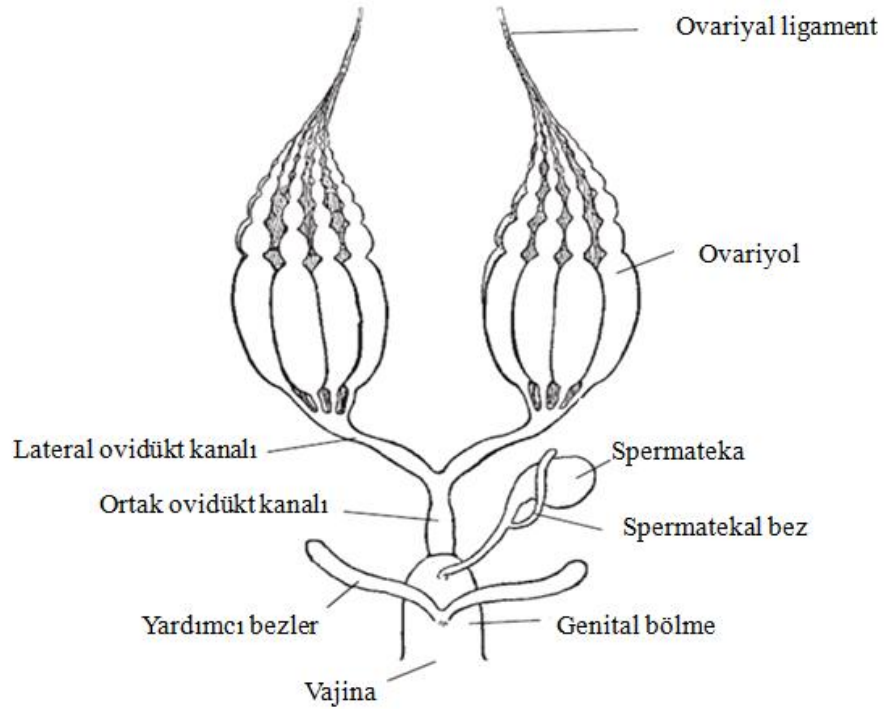
2004 yılında Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü “Ülkesel Süne Projesi” kapsamında *Trissolcus semistriatus* yumurta parazitoitinin kitle üretimini gerçekleştirerek, proje çerçevesinde enstitüde kitle üretim ve salım çalışmaları yapmıştır. Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü’nün teknik desteği ile *T. semistriatus* kitle üretim merkezleri 2007 yılında Konya, 2009 yılında ise Kırklareli Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl

Müdürlükleri'nde de kurulmuştur. Üretim ve salım çalışmaları günümüzde de devam etmektedir (1).

2.2. BÖCEKLERDE DIŞI ÜREME FİZYOLOJİSİ

2.2.1. BÖCEKLERDE DIŞI ÜREME SİSTEMİNE GENEL BİR BAKIŞ

Böceklerde dişi üreme sistemi, vajina, yardımcı bezler, ovarı (yumurtalık), genel ovarı kanalı, spermateka, yan ovarı kanalı, ovariyol (yumurta tüpleri) ve oosit (yumurta hücresi) gibi temel yapılardan oluşmaktadır (Şekil 2.3). Vajina, böceğin genital organı ve ovarı kanalının uzantısıdır. Ovariyoller konik biçimli yumurta tüpleri olup, oositlerin gelişimi ve büyümesi burada gerçekleşir. Ovariyollerin sayısı böceğin büyüklüğü ve üreme stratejisine göre her böcekte farklılık göstermektedir. Ortak ovarı kanalından köken alan lateral ovariyol kanalları, ovarilerin birleşmesini sağlar. Yardımcı bezler sement, zehir ve yağ gibi maddelerin salgılanmasında görev alır. Çiftleşme sonrası, yumurtanın döllenebilmesi için spermilere ihtiyaç duyulana kadar, spermiler “spermateka” adı verilen kapsül benzeri kesede depo edilir (32).

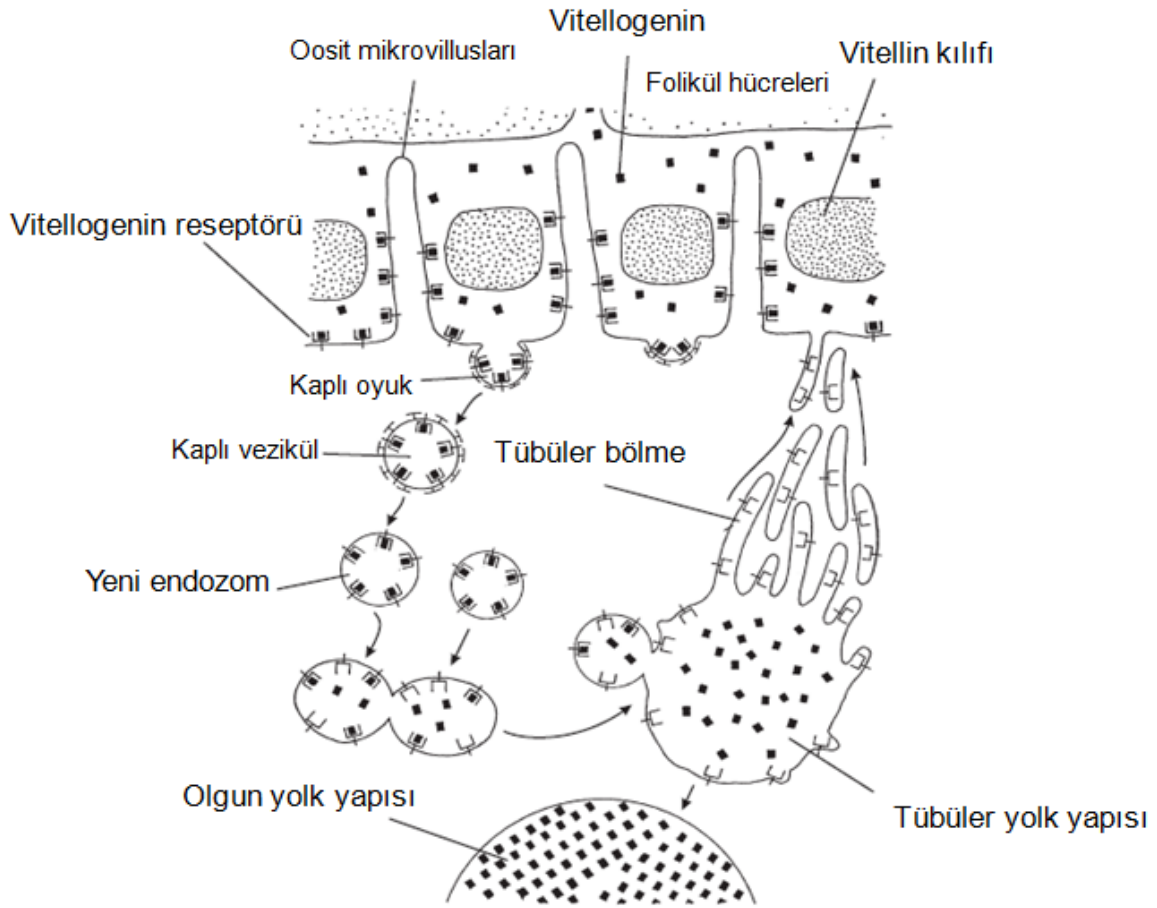


Şekil 2.3. Dişi üreme sistemi (32)

2.2.2. VİTELLOGENEZ

Oviparius (yumurta ile üreyen) canlılar yumurtanın gelişimi için “vitellin” adındaki yolk proteinine ihtiyaç duyarlar. Böceklerde vitellin proteininin öncülü vitellogenin, genellikle abdominal yağ dokusunda sentezlenir, hemolimfe salınır ve gelişen oositler tarafından alınır (7-9). Daha sonra embriyoların gelişimi için gerekli besini sağlamak üzere, oosit sitoplazmasında kristal formda “vitellin” olarak depo edilir (33). Vitellojenez, vitellogeninin yağ dokusu tarafından sentezlenip, oosit tarafından alındığı ve sitoplazmada depolanana kadar geçirdiği süreye denilir (32). Vitellojenez sürecinde böcek oositleri yolk proteini vitellini depolayarak, embriyonun gelişimi için gerekli olan besini sağlar ve hızlı bir şekilde büyürler (9).

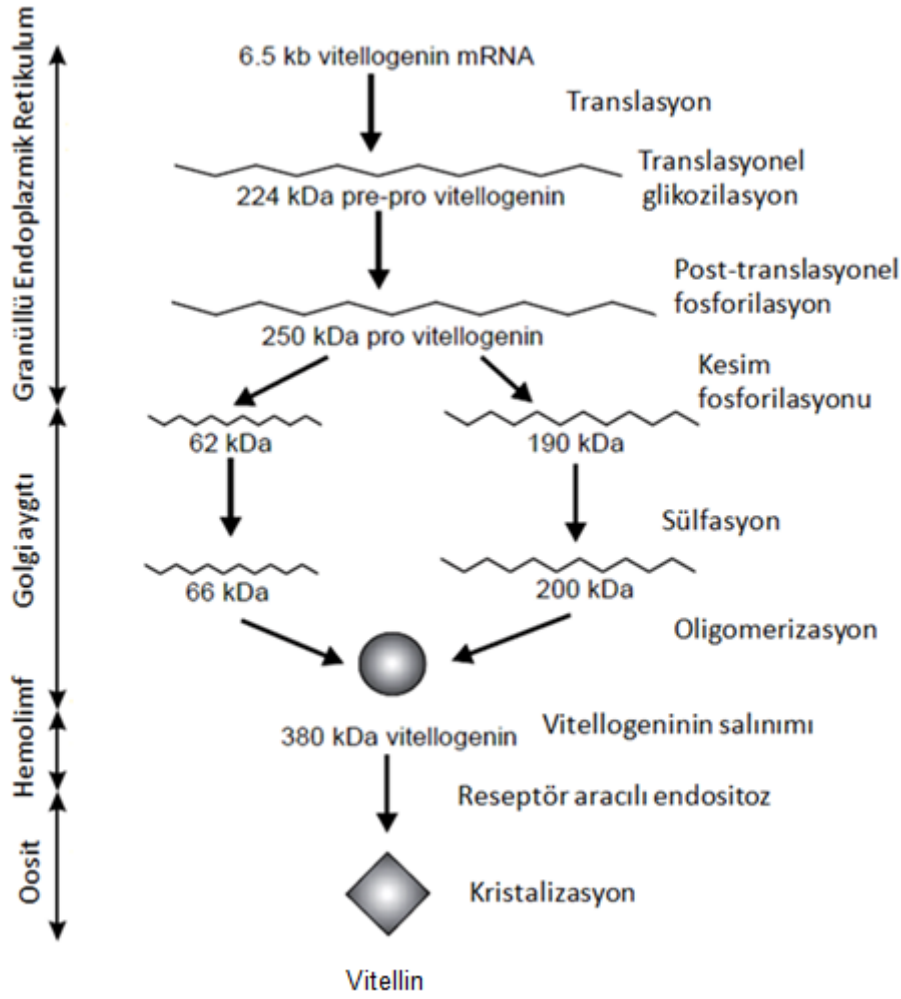
Vitellogenezde folikül hücrelerinde hücre içi boşluklar oluşarak vitellogenin alınımı kontrol edilir. Juvenil hormon ise folikül hücrelerinde oluşan açıklığı Na^+/K^+ ATPaz aktivitesini arttırarak regüle eder. Vitellogeninin oosit membranına geçişi, reseptör-aracılı endositoz aracılığıyla sağlanmaktadır. Reseptör-aracılı endositoz aşamasında hücre membranında bulunan vitellogenin reseptörü, vitellogenini tanıyıp sıkıca bağlanır ve içeriye alır. Endositoz işlemlerinin çoğunda görev alan. klattrin proteini, reseptörün vitellogenine bağlandığı yerde birikir ve reseptör-vitellogenin kompleksi, klattrin kaplı vezikülle bir bütün oluşturur. Sonrasında klattrin kaplama kaybolarak, transisyonel (geçişken) yolk yapılarını oluşturmak üzere endozom formunu meydana getirir. Vitellojenezin son aşamasında vitellogenin ile reseptör birbirinden ayrılarak, vitellogeninler kristalize bir formda olgun yolk yapılarına eklenirken, reseptörler tekrar kullanılabilir formda tübüler bölmelerde kalırlar (32) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Sivrisinekte vitellogenizde meydana gelen reseptör-aracılı endositoz (32)

Pan *et al.* (1969) *Hyalophora cecropia* ve *Periplaneta americana*'nın dişi ve erkek bireylerinde yaptıkları çalışmada, dişilerde vitellogeninin yağ dokusundan sentezlendiğini gözlerken, erkek yağ dokusunda ise vitellogenin sentezine rastlamamıştır. Bu çalışma ile beraber araştırılan protein "vitellogenin" adını almıştır (9). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar da vitellogeninin genellikle yağ dokusundan sentezlendiğini ortaya koymuştur. Chino *et al.* (1976) *Philosamia cynthia*'nın pupa dönemi hemolimfinden izole etikleri diaçilgliserol barındıran önemli lipidleri, lipoprotein I ve II olarak tanımlamıştır. Yapılan vitellogenin araştırmaları sonrasında, bu böcekte tanımladıkları lipoprotein II'nin esasen vitellogenin proteini olduğunu tespit etmişlerdir (34). Koeppe ve Ofengand (1976), *Leucophaea maderae* vitellogenininin beş adet heterolog alt ünitenden oluştuğunu bildirmiştir (35). Della-Cioppa ve Engelmann (1987) ise, *L. maderae* yağ dokusundan vitellogenin sentezini *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda çalışmış, 215 kDa ağırlığındaki henüz salgılanmamış pre-Vg'nin (vitellogenin öncülü) yağ dokusu ile beraber fosforile olduğunu ve proteolitik olarak kesime uğradığını rapor etmiştir (36). Sivrisinekte vitellogenin

mRNA'sının vitellin hâlinde depolanana kadar geçen süreçte meydana gelen işlemler Şekil 2.5'de verilmiştir.



Şekil 2.5. Sivrisinekte Vg mRNA'sından vitellin oluşana dek gerçekleşen işlemler (32)

2.2.3. VİTELLOGENİN REGÜLASYONU

Vitellogenin gen regülasyonunda juvenil hormon, ekdisteroidler ve nöropeptitler rol alır (37-40). Tufail *et al.*, Vg transkriptinin hormonal regülasyonunda görev alan etmenleri üç grupta incelemiştir (41). Buna göre birinci gruptaki böcekler Vg transkripsiyonunda sadece juvenil hormon kullanırken, ikinci gruptakiler ekdisteroidlere gereksinim duyar. Üçüncü grupta yer alan böcekler ise juvenil hormon ve ekdisteroidlerin yanı sıra ilâve hormonlara ihtiyaç duyarlar.

Hemimetabol (yarı başkalaşım geçiren) böceklerin de dâhil olduğu birinci grupta juvenil hormon vitellogeninin translasyonu, regülasyonu ve oositler tarafından alınmasında görev almaktadır (32). İkinci grup böcekler Vg regülasyonu için ekdisteroidlere ihtiyaç duyarlar. Dipterlerde juvenil hormon vitellogeninin salınımını düzenlerken, 20-hidroksiiekdizon (20E) ise üretim miktarını düzenlemektedir (32). Lepidopterlerin dâhil olduğu üçüncü grup böceklerde ise Vg transkripsiyonu için juvenil hormon ve ekdisteroidlerin yanı sıra ilâve hormonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlardan insülin-benzeri peptid sinyal sistemi, yumurta olgunlaşmasında regülatör görevi görmektedir (32, 42).

2.3. BÖCEKLERDE GEN VE PROTEİN KARAKTERİZASYONU, İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YAKLAŞIMLAR

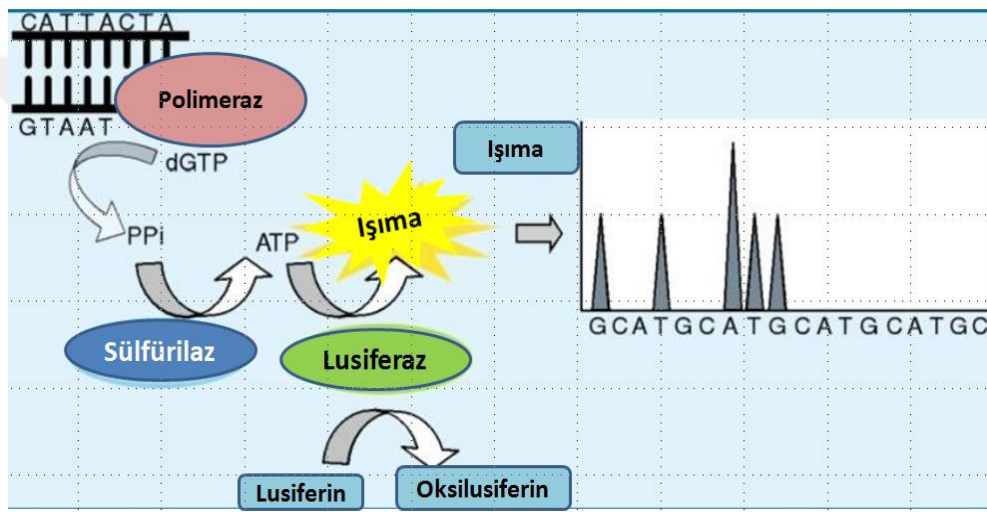
Böcek Biyokimyası ve Moleküler Biyolojisi alanlarında yapılan çalışmalarda, böceğin verdiği zararlar ilgili genlerin ve böcek fizyolojisinin anlaşılmasında araştırılan genlerin ifade düzeylerinin belirlenmesi, gen dizilerinin tanımlanarak karakterizasyonlarının yapılması; mevcut dizi üzerinden hedef genlerin inaktive edilmesi ve ilgili yolların anlaşılması açısından büyük önem arz etmektedir. Günümüzde bu çalışmalarda yaygın olarak kullanılan analizler arasında Transkriptom analizleri, Eş zamanlı PCR, Northern Blot, Western Blot, DNA dizi analizi ve RNA interferans teknikleri bulunmaktadır. Bu yaklaşımlarla ilgili açıklamalar aşağıda verilmiştir:

2.3.1. TRANSKRİPTOM ANALİZLERİ

Genomik DNA'dan yola çıkarak protein sentezinin gerçekleştirilmesindeki ilk aşama olan mRNA (mesajcı RNA) sentezine "transkripsiyon" adı verilir. Transkripsiyon sürecinde gen ifade düzeylerinde meydana gelen değişiklikleri her bir organizma için farklı morfolojik ve fenotipik karakterler, hücrel cevaplar belirlemektedir. Genomik DNA'dan transkribe ya da ifade olmuş genlerin tümü için, çoğu zaman "ifade profili" tanımlaması yeterli olsa da, günümüzde yaygın olarak "transkriptom" kavramı kullanılmaktadır. Transkriptom hücrel fenotip ve fonksiyonların en önemli belirleyicisidir. Transkriptom, sıradan hücrel faaliyetlerin gerçekleşmesi dâhil olmak üzere, meydana gelen herhangi bir durumda hızlı değişebilme özelliğine sahiptir (43). Bu analizlerin yapılmasında kullanılan iki önemli yöntem, cDNA kütüphanesinin oluşturulması ve mikrodizin yöntemleridir.

2.3.1.1. Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil dizileme başta DNA dizi bilgisinin sağlanması, gen ifade profilinin belirlenmesi, karakterizasyon ve genom anotasyonunun oluşturulması ve kodlanmayan RNA'ların keşfinde kullanılan yüksek verimin alındığı, pirosekanslama teknolojisine dayalı bir transkriptom analiz tekniğidir (44). İlk olarak 1986 yılında keşfedilen bu tekniğin temeli, DNA zincirine nükleotid eklenmesi esnasında DNA polimeraz aktivitesini takiben açığa çıkan pirofosfatın analizine dayanır (45). Eklenen nükleotidlerden sadece komplementerine bağlanan nükleotidin sinyal oluşturması ile lüminesans bir ışımaya meydana gelir (46) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Pirosekanslama tepkimesi (47)

Mevcut yeni nesil dizileme teknolojileri özellikle en kalabalık hayvan grubu olan böceklerin çalışılmasında, model organizmaların haricinde yeni genetik kaynakların oluşturulması adına büyük önem arz etmektedir (48). Son yıllarda 5000 farklı böceğin genomunun dizilenmesi projesi başlatılmıştır (49).

Bu teknikle özellikle sıcaklık, stres, diyapoz, göç gibi böceğin fizyolojisini etkileyen durumlardaki gen ifade düzeyleri izlenerek, böcek fizyolojisinin anlaşılması için gerekli analizlerin yapılmasına olanak sağlanmaktadır. *De novo* dizi analizleri sonucu ulaşılan dizi bilgilerinin biyoinformatik analizleri ile organizmada daha önce tanımlanmamış aday genlerin keşfi ve karakterizasyonu mümkündür. Günümüzde birçok kuruluş pirosekanslama prensibinden yola çıkarak, çeşitli yeni nesil dizileme sistemleri geliştirmekte ve bu sistemler bilim dünyası tarafından verimli bir şekilde kullanılmaktadır.

2.3.1.2. Mikrodizin

Transkriptom analizlerinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan mikrodizin tekniği, DNA/RNA hibridizasyon analizleri prensibine dayanarak, gen ifade profilleri ve SNP (Single nucleotide polymorphisms=Tek nükleotid polimorfizmi)'lerin görüntülenmesine olanak verir. Hibridizasyonlar genellikle cam, silikon ve plastik gibi maddelerin üzerinde gerçekleştirilir. Haberci probun hedef DNA ya da RNA'ya bağlanması ile bir sinyal meydana gelir. Oluşan hibridizasyonlar sistemde yapılan tarama aracılığı ile görüntülenebilmektedir (50).

Mikrodizin analizi ile böcek fizyolojisine ilişkin yapılan araştırmalarda meydana gelen gen ifadesi değişiklikleri, bu yöntem sayesinde detaylı olarak incelenebilmektedir. Yeni nesil dizilemenin aksine mikrodizin teknolojisi, yeni transkriptlerin analiz ve karakterizasyonuna olanak sağlamamaktadır. Bu teknik ayrıca, spesifik olmayan hibridizasyonlar ve düşük ifade olan genlerden alınan yetersiz sinyaller gibi bazı dezavantajlara sahiptir (51).

2.3.2. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ (REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION)

Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT/PCR), DNA içerisinde dizisi bilinen iki fragment arasındaki özgün bir bölgenin sentetik primerler yardımıyla enzimatik olarak çoğaltılmasında kullanılan tekniktir. PCR tekniğinin keşfinden bu yana, gen ifadesinin kantitatif tayinine yönelik birçok uygulama geliştirilmiştir (52).

Eş Zamanlı PCR (Q-PCR) yönteminde amplifikasyonun görünebilirliğini sağlamak için boya veya prob kullanılmaktadır. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan SYBR green I boyasının çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliğinden yararlanılmaktadır (53). Bir diğeri, çift işaretli (dual-labeled) florojenik hidroliz problemleridir (TaqMan). Bu tekniğin prensibi ise hedef diziye bağlanma özelliğine sahip çift-işaretli probun, hibridizasyon esnasında Taq polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesinden yararlanarak kesilmesi ve floresan ışığa yapması esasına dayanmaktadır (54). Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR)'in eş zamanlı olarak kantitatif analizi de bu uygulama sayesinde gerçekleştirilebilmekte ve kısaca RT-qPCR şeklinde yazılmaktadır (54, 55).

Eş zamanlı PCR’da elde edilen verilerin analizinde mutlak ölçüm (absolute quantification) ve göreceli ölçüm (relative quantification) yöntemleri kullanılmaktadır. Mutlak ölçüm yönteminin analizinde ilgili transkriptin kopya sayısı genellikle bir standart eğri hazırlanarak belirlenir ve hesaplamalarda $2^{-\Delta CT}$ formülü kullanılır.

$$\begin{aligned}\Delta CT (\text{örnek}) &= 2^{(CT_{\text{hedef}} - CT_{\text{referans}})} \\ &= 2^{-\Delta CT}\end{aligned}$$

CT (threshold cycle=eşik döngü değeri) amplifikasyon sürecinde PCR’ın üstel (exponential) fazda olduğunu belirten değerdir ve reaksiyondaki amplikon sayısı ile ters orantılıdır (56). Göreceli ölçüm yöntemi ise çoğunlukla muamele çalışmalarında kullanılırken, analizin yapılmasında muamele edilmiş örneklerle birlikte, muamele edilmemiş bir kontrol grubu bulunmaktadır. Kontrol grubu referans alınarak gen ifadesinde meydana gelen değişimler tespit edilirken hesaplamalarda $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılmaktadır (57). Böcek Moleküler Biyolojisi çalışmalarında Eş zamanlı PCR tekniğinin kullanımı oldukça yaygındır.

2.3.3. RACE PCR (RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS=cDNA UÇLARININ HIZLI ÇOĞALTIMI)

RACE PCR, hedef cDNA’nın 5’ ve 3’ uçlarının PCR metoduyla çoğaltılması prensibine dayanır. Yöntem, ilgili mRNA’nın bilinen kısa bir dizisinden yola çıkarak, 5’ ve 3’ uçlarına doğru dizi bilgisi mevcut olmayan bölgelerin çoğaltılmasına imkân verir (58). Bu teknik genellikle düşük kopya sayısına sahip mRNA’ların çoğaltılmasında ve cDNA kütüphanelerinden elde edilen parça cDNA’ların tamamlanmasında kullanılır. RT-PCR ve PCR tekniklerinin uygulandığı yöntemde gene özgü primerler, revers transkriptaz enzimi, adaptörler, oligo-dT ankor primerleri gibi bileşenler kullanılır. Moleküler Biyoloji ve Genetik alanında gen karakterizasyon amaçlı çalışmalarda sıklıkla uygulanan bu yöntem sayesinde, transkripsiyon başlama bölgeleri belirlenebilmektedir.

2.3.4. NORTHERN BLOT

James Alwine ve George Stark tarafından geliştirilmiş Northern Blot tekniği ile spesifik RNA seviyelerinde meydana gelen değişikliklerin analizi yapılabilmektedir (59). Bu teknikte izlenen genel yol şu şekilde özetlenebilir (60): Çalışılacak materyalden RNA

izolasyonu yapılır. Daha sonra RNA'lar formaldehit içeren jele yüklenerek elektroforez tekniği ile ayrıştırılır. Kapiler blotlama sistemi yardımıyla bir gece boyunca negatif yüke sahip RNA'nın naylon membrana aktarımı gerçekleştirilir. RNA membranda işaretli proba hibridize olur ve çift zincirli bir yapı kazanır. Otoradyografi veya fosfo görüntüleme (Phosphoimager) sistemleri ile RNA'ların analizi yapılır.

Northern blot tekniğinin uygulanmasında fazla miktarda RNA'ya ihtiyaç duyulması ve tekniğin uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır (61). Böceklerde gen ifade çalışmalarında Northern Blot tekniği bir dönem yaygın olarak kullanılırken, günümüzde bu tekniğe alternatif olarak genellikle RT-qPCR yöntemi tercih edilmektedir.

2.3.5. WESTERN BLOT

Western blot, çalışılan materyalde spesifik proteinlerin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Teknik genel olarak üç aşamadan oluşmaktadır (62): 1) Protein kompleksinde bulunan her bir proteinin, molekül ağırlığına göre SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis=Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)'de dikey elektroforez sistemi ile ayrıştırılması. 2) Proteinlerin membrana aktarılması 3) Antikorlarla işaretlenmiş hedef proteinlerin boyanarak görüntülenmesi.

Western blot analizi ile bir genin proteine ifadesinin olup olmadığı kesin bir şekilde anlaşılmaktadır. Entomoloji alanında gen ifade ve karakterizasyon analizlerinin yanı sıra Western blot çalışması ile tahmini proteinlere yönelik karakterizasyonlar yapılmaktadır.

2.3.6. RNA İNTERFERANS

RNA İnterferans, dsRNA (double strand=çift zincirli RNA)'nın post-transkripsiyonel gen ifadesinin regülasyonunda kullanıldığı biyolojik bir mekanizmadır. Fire and Mello (1998), *Ceanorhabditis elegans*'ta gen ifadesini manipüle etme çalışmaları ile dsRNA'nın RNA interferans mekanizmasının potansiyel indükleyicisi olduğunu bildirmişlerdir (63). Bu mekanizmada small interfering RNA (siRNA) ve mikroRNA (miRNA) olmak üzere iki tip RNA görev almaktadır. siRNA hedef gene tam komplementer ve transkriptin degradasyonuna neden olurken, miRNA ise hedef gene tam komplementerlik göstermez ve translasyonun baskılanmasında görev alır. Bunların dışında PIWI-interacting RNA

(piRNA)'lar bulunmakta ve memeli hücre hatlarında transpozon transkriptlerini hedef almaktadırlar (64).

Böceklerle mücadelede spesifik bir geni baskılamak amacıyla “RNA interferans”, diğer adıyla “gen susturulması” tekniği uygulanabilmektedir. Böceklerde uygulanan RNAi yöntemleri arasında mikroenjeksiyon, yapay besi ortamı ile besleme, daldırma, dsRNA ifadesi üreten bakterilerle besleme, dsRNA'nın virüs aracılığı ile alınması, RNAi ile transgenik böceklerin geliştirilmesi, RNAi ile zararlıya dirençli bitkilerin üretilmesi bulunmaktadır (65). Aşağıda bu yöntemlerden yaygın olarak kullanılanları ve ayrıca yeni geliştirilmiş nanopartikül aracılığı ile böceklerde RNAi tekniğine ilişkin açıklamalara yer verilmiştir.

2.3.6.1. Mikroenjeksiyon Yöntemi

Böceklerde en sık uygulanan RNAi yöntemi, *in vitro* ortamda sentezlenen uzun dsRNA'nın hösosol içerisine mikroenjeksiyon aracılığıyla aktarılmasıdır. Bu yöntem sayesinde etkili bir sistemik RNAi cevabı oluşturulabilmektedir. Enjeksiyon uygulaması genellikle larvaların dorsaline ya da segmentleri arasına, erginlerde ise kanatlar altındaki dokuya yapılmaktadır (66).

2.3.6.2. Yapay Besi Ortamı ile Besleme

Böçekte hedef genlerin ifadesinin baskılanmasında, dsRNA'nın bir diyet bileşeni olarak böcek besinine katılmasının oldukça etkili olduğu birçok çalışma ile bildirilmiştir (67-72). Uygulama kolaylığı açısından diğer yöntemlere göre daha kullanışlıdır. Mikroenjeksiyon uygulamasının zarar verebileceği böceklerde bu uygulama tercih edilebilir.

2.3.6.3. Daldırma Yöntemi

Bu yöntem genellikle gelişmekte olan küçük böcekler, hücre kültürü ve embriyolara uygulanacak gen susturma çalışmalarında, dsRNA'nın bulunduğu solüsyondan absorpsiyon yoluyla alınması ile uygulanabilmektedir. dsRNA'nın ekonomik ve kolay olarak uygulandığı bu yöntemle, başarılı sonuçlar alındığı birçok çalışma ile rapor edilmiştir (73-75).

2.3.6.4. dsRNA İfadesi Yapan Bakterilerle Besleme Yöntemi

Bu yöntem, dsRNA ifadesini sağlayacak vektör yapısının konakçı bir bakteriye aktarılıp, hedef böceğin bu bakteri ile beslenmesi prensibine dayanmaktadır. Yöntem ilk defa *C. elegans*'ın dsRNA üreten *Escherichia coli* ile beslenmesi ile uygulanmıştır. Yöntemin başarılı olduğu pek çok çalışma mevcuttur (76-78).

2.3.6.5. RNAi ile Zararlı Böcek Türlerine Dirençli Bitki Üretimi

Bu teknik ile bitkilerle beslenen böceklerde ifade olan spesifik genlere özgü, transgenik bitkide dsRNA sentezi gerçekleştirilerek, zararlılara karşı bitkilerde koruma sağlanabilmektedir. Ekonomik açıdan önemli tarımsal zararlılardan yeşil kurt (*Helicoverpa armigera* Hübner, Lepidoptera: Noctuidae) ve mısır kök kurduna (*Diabrotica virgifera* Leconte, Coleoptera: Chrysomelidae) karşı dayanıklı transgenik bitkiler geliştirilerek, zararlılar ile etkili bir mücadele sağlanmıştır (67, 69).

2.3.6.6. Nanopartikül Aracılığı ile Böceklerde RNAi

Nanopartikül nanometre boyutlarındaki inorganik bileşiklere verilen addır (1-100 nm). Bu yöntem ile nanaopartikül gen taşıyıcıları kullanılarak ilgili genin baskılanması sağlanabilmektedir. dsRNA ve nanopartikül karışımının böcek diyetine eklenmesi ile böceğin gelişmesinde anahtar role sahip genlerin susturulmasıyla, böceğin yaşamına son verilmektedir. Nanopartikülün uygulama süresince takip edilebilme avantajı vardır (79).

He *et al.* (2013), katyonik çekirdek kılıflı floresan nanopartiküller (FNP) ile gen susturulması tekniğini *Drosophila*'da uygulamıştır. Bu yöntemle nanopartiküller canlı hücreleri hızlı bir şekilde içerisine almaktadır. dsRNA ve FNP kompleksinin böcek diyetine karıştırılması ile FNP'nin etkili bir gen taşıyıcısı olarak görev aldığı çalışmada, böceğin gelişmesine ilişkin genlerin hızlı bir şekilde baskılandığı ve böceğin kısa sürede öldüğü gözlenmiştir. Yöntem düşük sitotoksitesi, floresansla işaretleyebilme ve *in vivo* ortamda uygulanabilmesi açısından böceklere uygulanan sıradan mikroenjeksiyon ve dsRNA ile böcek besleme yöntemlerine kıyasla daha avantajlıdır (79).

2.4. BÖCEKLERDE VITELLOGENİN PROTEİNİ VE GENİN REGÜLASYONU İLE İLGİLİ YAPILAN ARAŞTIRMALAR

2.4.1. BÖCEKLERDE VG GEN VE PROTEİN KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

Fasulye böceği, *Riptortus clavatus*'ta RACE PCR yöntemi ile elde edilen Vg1 proteini aminoasit dizisinde vitellogeninlere karakteristik iki adet poliserin bölgesinin bulunduğu, ayrıca RIRR, RWSR, KFCKAN, KFCK kesim bölgelerinin yer aldığı bildirilmiştir (80).

Blattella germanica vitellogeninin karakterize edildiği bir çalışmada, genin 5749 nükleotitten oluştuğu, ilk 17'si sinyal peptidi olmak üzere 1862 aminoasidi kodladığı; aminoasit dizisinin 6 adet RXRR konsensus kesim dizisi, ayrıca iki adet uzun serin bölgesi içerdiği rapor edilmiştir. Proteinin diğer böcek vitellogeninlerine %32-42 oranında benzerlik gösterdiği ve hizalama sonrasında diğer türlerde bulunan GLCG motifinin bu türde de korunduğu gözlenmiştir. GLCG/GICG motifleri ve sistein rezidülerinin işlevleri ise henüz bilinmemektedir (81).

Tufail *et al.* (2000), Amerikan hamam böceği, *Periplaneta americana*, dişilerinin yağ dokusundan oluşturdukları cDNA kütüphanesinde 5854 bç uzunluğunda, 1896 aminoasit kodlayan açık okuma çerçevesine sahip vitellogenin proteini tespit etmişlerdir. Analiz edilen proteinin aminoasit dizisinde GL/ICG motifi, bu motifi takiben korunmuş bölgelerde beş adet sistein rezidüsü ve GL/ICG motifinin üst kısmında Karboksi-terminal (C-terminal) bölgesi yakınında DGXR motifine rastlanmıştır. Amino-terminal (N-terminal) dizi analizi ile vitellogenin proteininde 14 adet RXXR post-translasyonel kesim bölgesi bulunmuştur (82).

Başka bir çalışmada *Plautia stali* dişi yağ dokusundan adaptör-bağlı çift zincirli-cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. GL/ICG motifine özgü olarak hazırlanan dejenere nükleotid dizileri ve adaptör dizileri PCR analizinde primer olarak kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin klonlanarak nükleik asit dizilerinin tanımlanması ve çıkarılan aminoasit dizisinin GL/ICG motifi ile başlayan dizilerle hizalanması sonucunda üç adet vitellogenin proteini tespit edilmiştir. (83).

Graptopsaltria nigrofuscata vitellogenin cDNA dizisinin klonlama yoluyla çıkarıldığı çalışmada 1987 aminoasit rezidüsünden oluşan tahmini proteinin, ilk 16 rezidüsünün tahmini sinyal peptidi olduğu bulunmuştur. N-terminal dizi analizi ile vitellogenin öncülünün (pro-Vg) RXXR kesim bölgesini takiben 379 ve 380. rezidülerden bir uzun (200kDa) ve bir kısa (43 kDa) altbirim olarak salındığı ve iki vitellin olarak depolandığı bildirilmiştir. Ayrıca proteinin kesim bölgesinin yakınında serince uzun zengin bir dizi tespit edilmiştir (84).

Farklı bir çalışmada *Leucophaea maderae* dişi yağ dokusundan cDNA kütüphanesi oluşturularak, dizileme çalışmaları neticesinde elde edilen vitellogenin proteinin 1913 aminoasitten oluştuğu, ilk 15 rezidüsünün tahmini sinyal peptidi olduğu tespit edilmiştir. C-terminal bölgesinde serince zengin bir bölge bulunduran proteinin, üç adet RXXR kesim dizisi bulundurduğu ve dört altbirime ayrıldığı N-terminal dizileme yöntemi ile saptanmıştır. Ayrıca yumurtaya ait vitellogeninde de kesim noktaları gözlenmiş ve yumurtada 90-kDa ağırlığında bir vitellin polipeptidinin yer aldığı tespit edilmiştir (85).

Bal arısı, *Apis mellifera*'da 5440 nükleotid uzunluğundaki vitellogenin dizisinin 1770 aminoasit kodladığı ve bunun ilk 16'sının tahmini sinyal peptidinden oluştuğu yapılan RACE PCR ve klonlama çalışmaları sonucunda tespit edilmiştir. Vitellogenin aminoasit dizisi Hymenoptera takımından *Pimpla nipponica*'ya %58 oranında, *Athalia rosae*'ye ise %54 oranında benzerlik göstermektedir. Dizinin C-terminal'e yakın bölgesinde GL/ICG motifi, bu motifi takiben 9 adet sistein rezidüsü ve motifin 18 rezidü yukarısında ise DGXR motifi bulunmaktadır (11).

Böcek türleri farklı sayıda vitellogenin bulundurabilmektedir. Tufail *et al.* (2007) *L. maderae*'da Vg2 adını verdikleri ikinci bir vitellogenin keşfetmişlerdir. 5915 bç, 1911 aminoasit uzunluğunda ve sinyal peptidinin 16 aminoasit rezidüden oluştuğu görülen Vg2'nin, daha önce rapor ettikleri Vg1'den farklılığını Southern Blot yöntemi ile araştırmışlar ve iki vitellogeninin esasında ayrı genlerden köken aldığını saptamışlardır. İmmunoblot analizi ile *LmVg*'nin farklı iki vitellogenin öncülünden kodlandığı tespit edilmiş, vitellogeninlerin aminoasit seviyesinde %96 oranında benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (86).

Spodoptera litura Vg cDNA'sı 5247 nükleotid, 1748 aminoasit uzunluğunda ve tahmini protein aminoasit dizisinin ilk 17'sini tahmini sinyal peptidi oluşturmaktadır. Vg'nin C-terminal bölgesinde iyi derecede korunmuş GL/ICG, DGXR motifleri ve sistein rezidüleri bulunmaktadır (87).

Bombus hypocrita vitellogenini 5478 nükleotid uzunluğunda ve 1772 aminoasidi kodlayan bir ORF (Open Reading Frame=Açık Okuma Çerçevesi)'den oluşmaktadır. Tahmini *B. hypocrita* Vg'si *Bombus ignitus* (%95) ve *Apis mellifera*'ya (%52) yüksek oranda benzerlik göstermektedir. C-terminal bölgesinde 9 adet sistein rezidüsünü takiben DGXR motifi, bunun da 18 rezidü yukarısında GL/ICG motifi yer almaktadır. Çalışmada ayrıca SWISS MODEL WORKSPACE programı kullanılarak proteinin tahmini 3 boyutlu yapısı hazırlanmıştır (88).

Ornithodoros moubata'da Vg (*OmVg*) tüm dizisine RACE PCR yöntemiyle ulaşılmıştır. İlk 15 aminoasiti sinyal peptidi olmak üzere 5502 bç uzunluğundaki nükleotid dizisi, 1834 aminoasit kodlamaktadır. Dizide R₃₅₀VLR, R₃₉₁NVR ve R₈₄₁IRR olmak üzere üç tane kesim bölgesi bulunmuştur. *OmVg*'nin en fazla *Dermacentor variabilis* vitellogenin dizisine benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir (89).

Nilaparvata lugens'in üreme stratejisini anlamak için yapılan bir araştırmada vitellogenin geni klonlanarak, RACE PCR yöntemiyle Vg mRNA transkriptininin 6314 bç, 2063 aminoasit uzunluğunda ve aminoasit dizisinin ilk 18'inin tahmini sinyal peptidinden oluştuğu tespit edilmiştir. Aminoasit dizisinde N-terminal bölgesi yakınında iki adet Vitellogenin-N domaini yer almaktadır. Üçüncü domain olan von Willebrand faktör D tipi (VWD) ise, C-terminal bölgesi yakınındadır. C-terminal bölgesi yakınlığında ayrıca üç adet poliserin bölgesi, üç adet RXXR kesim bölgesi, GL/ICG motifi ve sistein rezidüleri bulunmaktadır (90).

Blariza *et al.* (2014) Amerikan Tripanozomiyaz hastalığı vektörü *Triatoma infestans*'ta vitellogenin-1 ve 2 genlerini çalışmıştır. Vg2 proteinin 5553 bç tarafından kodlanan, 1851 aminoasitten oluştuğu gözlenmiştir. *T. infestans*'ın tahmini Vg1 ve Vg2 aminoasit dizilerinin yapılan karşılaştırılmasında, proteinler birbirine %58,94 oranında benzerlik gösterirken, aralarındaki homoloji ise %76,43 olarak bulunmuştur. Elde edilen Vg aminoasitleri ve hemimetabol böceklerle birlikte oluşturulan filogenetik ağacın belirgin bir

şekilde iki kümeye ayrıldığı, kümelerden birinin Dictyoptera takımına ait Vg dizileri bulunudurken, diğerinin ise Hemiptera takımına ait dizileri içerdiği gözlenmiştir (91).

Zhong *et al.* (2015) turunçgil kırmızı örümceği *Panonychus citri*'de Vitellogenin 1 (PcVg1) ve Vitellogenin reseptör (PcVgR) genlerini karakterize etmişlerdir. PcVg1'in 5748 nükleotid uzunluğunda, 1851 aminoasit uzunluğundaki ORF'yi kodladığını, PcVgR'nin ise 6090 nükleotid uzunluğunda 1891 aminoasit büyüklüğündeki aminoasit ORF'sini kodladığını tespit etmişlerdir. PcVg1'in vitellogeninler için tipik kabul edilen GLCG domainine ve K/RXXR kesim noktalarına sahip olduğu bulunmuştur. Aminoasit dizi bilgisi ve filogenetik analizler, her iki genin keneler ve böceklerden genetik olarak uzak olduğunu göstermiştir (92).

2.4.2. BÖCEKLERDE VİTELLOGENİN İFADESİNİN TESPİTİ VE GEN SUSTURMA ÇALIŞMALARI

P. americana'da vitellogenin geninin 2 günlük ergin dişilerin yağ dokusunda ifade olmaya başladığı, ancak ovarı ve erkek yağ dokusunda hiç ifade olmadığı Northern Blot analizi ile gözlenmiştir (82).

Leucophaea maderae'de vitellogenin geni ifadesi sadece dişi yağ dokusu RNA'larında saptanırken, ovarı ve erkek yağ dokusunda ise vitellogenin ifadesine rastlanmamıştır (85).

A. mellifera'da, vitellogenin ifadesininin kraliçe arılarda orta yaşlı pupa döneminde, işçi arılarda ise son dönem pupalarda sentezlendiği bildirilmiştir. Ayrıca yeni ergin olan erkek arılarda vitellogenin ifadesine rastlanmıştır (11).

İşçi bal arılarında RNAi uygulanarak, vitellogenin gen ifadesinin baskılanmasıyla, hemolimfte juvenil hormon ve reseptörünün seviyesinde artış meydana gelmiştir. Bu durum vitellogenin geninin arılarda juvenil hormonu regüle ettiğine işaret etmiştir (15).

Seehuus *et al.* (2006) işçi arılarda vitellogeninin antioksidan özelliğini araştırmıştır. Vitellogenin ifadesinin baskılanması ile işçi arılarda oksidatif strese direncin azaldığı görülmüştür (17).

Corona *et al.* (2007) tarafından vitellogeninin kraliçe bal arılarında yaşam süresini uzatan bir antioksidan görevi yaptığı öne sürülmüştür. RT-qPCR ve *in situ* hibridizasyon analizleri

ile işçi ve yaşlı kraliçelerin göğüs ve baş bölgesinde yer alan yağ dokusundaki vitellogenin ifadesi incelenmiştir. Vitellogeninin yaşlı kraliçelerde daha fazla ifade olduğu görülmüştür. Bir oksidatif stres indükleyicisi olan paraquatın işçi ve kraliçe arılara enjekte edilmesi sonucunda, kraliçe arıların işçi arılara kıyasla oksidatif strese daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç doğrultusunda vitellogeninin bal arılarında kasta özgü bir farklılık olan, kraliçelerin uzun ömürlü olmasında görev aldığı ortaya koyulmuştur (93).

B. germanica'nın ergin dişi bireylerinde ifade olan vitellogenin geninin RNAi yöntemi ile *in vivo* ortamda başarılı bir şekilde inhibe edilmesiyle, yabancı tipin aksine gelişimi sekteye uğramış küçük ovarilerin meydana geldiği görülmüştür (94).

Nelson *et al.* (2007) RNAi çalışması ile vitellogenin geninin balarısının geçmişinde ve bugününde ne kadar büyük bir öneme sahip olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışma ile vitellogenin gen aktivitesinin bal arısında yiyecek arama davranışının başlangıcını kontrol ettiği, arıların bu görevi yapmada özelleşmesini sağladığı ve vitellogeninin işçi arıların yaşam süresini etkilediği saptanmıştır. Bu sonuçlarla vitellogeninin işçi arıların sosyal açıdan özelleşmesinde, zar kanatlılar takımında sosyalleşme bakımından evrimleşmesinde, düzenli üremenin sağlanmasında ve eş seçme özelliğinde etkili olduğu belirtilmiştir (16).

Seehuus *et al.* (2007), kolonisinde kraliçe bulunduran ve bulundurmeyen işçi bal arılarının ovarilerinde vitellogenin araştırılmıştır. Kolonisinde kraliçe arının bulunmadığı işçi bal arılarının ovarilerinin gelişerek vitellogenin bulundurduğu, immunogold işaretleme tekniği ile tespit edilmiştir. Kolonilerde bakıcı arılar, işçi arı larvalarının beslenmesinde kullanmak üzere, hipofaringeal bezlerinde arı sütü üretirler. Bu çalışmanın aynı teknikle uygulanan ikinci aşamasında, bakıcı arıların hipofaringeal bezinde yer alan, yeni arı sütünün sentezlendiği merkez kanalda vitellogenin bulunduğu rapor edilmiştir. Ayrıca kraliçe arının ovarisi ve baş yağ dokusunda, bakıcı arıların hipofaringeal bezlerinde vitellogenin proteinin yüksek miktarda bulunduğu, toplayıcı arıların hipofaringeal bezlerinde ise vitellogene aşırı derecede düşük miktarda rastlandığı western blot tekniği ile saptanmıştır (95).

Shu *et al.* (2009), *S. litura*'da Vg mRNA'sının özellikle dişi yağ dokusunda ifade olduğunu RT-qPCR yöntemiyle rapor etmiştir. Farklı gelişme dönemleri ile yapılan çalışmada vitellogenin ifadesinin en fazla 6 günlük dişi pupada olduğu, böceğin gelişimi ile beraber

ifade seviyesinin arttığı gözlenmiştir. En yüksek Vg mRNA'sına 24 saatlik erginlerde rastlanmıştır (87).

Tufail *et al.* (2010) *N. lugens*'te 6,8 kb büyüklüğündeki vitellogenin transkriptinin en fazla ergin dişi yağ dokusunda bulunduğunu Northern Blot yöntemi ile göstermiştir. Brachypterous (göç etmeyen) ve macropterous (göç eden) olmak üzere iki farklı kanat morfolojisine sahip bu türde Brachypterlerde vitellogeninin Macroptarlere göre bir gün önce ifade olmaya başladığı tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular immunoblot analizi ile doğrulanmıştır (90).

Melipona quadrifasciata işçi arılarının bakıcılık fazında yumurta bırakma özelliklerinden yola çıkılarak (96, 97), işçi arıların ovarilerinde vitellogenin varlığı araştırılmıştır. İşçi arı ve kraliçelerin yağ dokusu ve ovarilerinde araştırılan vitellogeninin tayini immünoblotlama yöntemleri ile gerçekleştirilmiş ve vitellogeninin sadece kraliçe arıların ovarisinde ve yağ dokusunda bulunduğu tespit edilmiştir (98).

T. infestans'ta Vg1 ve Vg2 mRNA'ları en fazla ergin dişilerin yağ dokusu ve ovarilerinde bulunmuştur. Dişilerde Vg2 geninin ifadesi, Vg1'in aksine az miktarda baş ve kas dokusunda bulunurken, erkek bireylerin yağ dokusu, baş ve kas dokusunda her iki genin ifadesine rastlanmamıştır (91)

P. citri'de Vg1 ve VgR genlerinin RT-qPCR yöntemi ile transkripsiyonel profillerinin incelenmesi sonucunda her iki genin yumurta, larva, nimf ve erginlerde benzer düzeyde ifade oldukları görülmüştür (92).

2.4.3. BÖCEKLERDE VİTELLOGENİN REGÜLASYONUNA YÖNELİK YAPILAN ÇALIŞMALAR

Methoprene böceklerde büyüme düzenleyicisi olarak kullanılan bir juvenil hormon analogudur. *R. clavatus*'un ergin dişi bireyleri ile yapılan bir araştırmada, diyapozun 25. günündeki bireylere diyapozu sonlandırmak ve ovarisi gelişimini uyarmak için methoprene uygulanmıştır. Muamele sonrası Northern Blot tekniği ile *R. clavatus* Vg1 mRNA'sında ifade artışı gözlenmiştir. Bu çalışma ile juvenil hormonun *R. clavatus*'ta vitellogeninin transkripsiyonel regülasyonunda rol aldığı ortaya konmuştur (80). Farklı bir çalışmada *S. invicta*'nın çiftleşmemiş kraliçelerine methoprene uygulanması sonucunda kraliçelerin

olgunlaşması ile beraber vitellogenin reseptör geninin ifadesinde artış gözlenmiştir. Bu çalışma ile *S. invicta*'da vitellogenin reseptörünün juvenil hormon tarafından regüle edildiği sonucuna varılmıştır (99).

Son yıllarda vitellogenin regülasyonuna yönelik araştırmalarda RNAi uygulaması ile gen ve regülatörleri arasındaki ilişki kolaylıkla anlaşılabilir. İşçi bal arılarında yapılan bir çalışmada, vitellogenin ifadesinin baskılanması sonucu, hemolimfte juvenil hormon ve reseptörünün seviyesinde artış meydana gelmiştir. Yapılan bu çalışma ile organizmada hormonal dengenin sağlanmasında vitellogenin geninin önemi vurgulanmıştır (15).

Bal arılarının sosyal yaşamlarında genç arılar genellikle larvaları besleme gibi kovanla ilgili görevlerde bulunurken, yetişkin arılar polen, nektar, su ve propolis toplamaktan sorumludur. Olgunlaşma süresi ile değişen bu görev dağılımındaki fizyolojik ve duyuşal değişimler, yetişkin arılarda daha yüksek bir juvenil hormon seviyesine, dolayısı ile hemolimfte düşük vitellogenin miktarı bulunmasına neden olmaktadır (100-102). Amdam *et al.* (2006), vitellogeninin bal arısında davranışsal gelişimde rol alabileceği düşüncesinden yola çıkarak vitellogeninin baskılanması sonucunda işçi arıların tat almadan sorumlu genlerinde artış gözlemiştir. Çalışma sonucunda vitellogeninin bal arılarının davranışlarını düzenlemede önemli rolü olduğu bildirilmiştir (103).

Bal arılarında kraliçe arılar fertil ve uzun yaşam süresine sahipken, işçi arılar steril ve kısa ömürlüdürler. Corona *et al.* (2007) bal arısının yaşlı kraliçe ve yaşlı işçi arılarında juvenil hormon, insulin-benzeri peptid ve reseptörleri arasındaki ilişkiyi çalışmıştır. İnsülin-benzeri peptid ve reseptörlerinin yaşlı kraliçelerde yaşlı işçi arılara göre daha az ifade olduğu görülmüştür (93).

FoxO transkripsiyon faktörü, İnsülin Reseptör/Fosfatidilinozitol 3-kinaz (InR/PI3K) yolunun temel transkripsiyonel efektörüdür (104, 105). Besin yokluğu durumunda, yolak inaktif olur ve FoxO transkripsiyonel eylemini gerçekleştirmek üzere çekirdeğe transloke olur (106). *Culex pipiens*'te diyapozda olmayan sivrisinekte insülin reseptörünün uyarılması ile juvenil hormon salgılanır ve ergin dişi bireylerde normal yumurta gelişimi gözlenir. Diyapozda olan sivrisineklerde ise, insulin bulunmamasına bağlı olarak reseptör uyarılmamakta ve juvenil hormon salgılanmamaktadır. Bu noktada Forkhead-box O (FoxO) transkripsiyon faktörü devreye girer (107, 108). Böylece sivrisinek diyapozda iken

yağ depolayabilir ve soğuk gibi çevresel streslere direnç gösterir. Sineklerde diyapoz regülasyonunun daha iyi anlaşılması için RNAi tekniğinin kullanıldığı bir çalışmada, diyapoz dışı dönemde ifade olan insülin reseptör genini kodlayan dsRNA'nın böceğe verilmesi ile gen ifadesinin baskılandığı ve ovarilerin tıpkı diyapozda bulunan böceklerdeki gibi gelişimini tamamlayamadığı, küçük kaldığı gözlenmiştir. Ayrıca diyapozdaki sivrisinekte FOXO transkripsiyon faktörü baskılanmış, işlem sonrasında böceğin vücudunda normal yağ depolanmasının engellendiği ve transkripsiyon faktörünün başarılı bir şekilde baskılandığı gözlenmiştir. Bu çalışma ile insülin reseptör geni ve FOXO transkripsiyon faktörünün regülasyondaki önemi vurgulanmıştır (109).

Kawakami *et al.* (2009), *Tetranychus urticae*'nin diyapozda ve diyapozda olmayan ergin dişilerinin ovarilerinde vitellogenin genlerinin ifade düzeylerini kıyaslamıştır. Yapılan Northern Blot analizi ile diyapozdaki ergin dişilerde vitellogenin mRNA'sının sentezlenmediği gözlenirken, diyapozda olmayanlarda ise ifade görülmüştür (110).

Tufail *et al.* (2010), *N. lugens*'te Juvenil hormon III'ün uygulanması ile vitellogenin ifadesinin arttığını, bu durumdan yola çıkarak bu genin bu türde juvenil hormon III ile regüle edildiğini tespit etmiştir (90).

Parthasarathy *et al.* (2010), *Tribolium castaneum*'da ovarilerde gelişimi ve oosit olgunlaşmasında ekdisteroid regülasyonunu çalışmıştır. Ovarilerin RNA'larında yapılan mikrodizin çalışması aracılığı ile ekdisteroid sinyalizasyonunda yer alan bazı genlerin dişi böceğin ergin hâline ulaştıktan 4 gün sonra up regüle olduğu görülmüştür. Ekdisteroid ve juvenil hormon sinyalizasyonunun yolaklarında yer alan proteinlerin fonksiyonel analizlerine ilişkin yapılan RNAi çalışmalarıyla, ekdisteroidlerin ovarilerde gelişimini ve oosit olgunlaşmasını regüle ettiği sonucuna ulaşılmıştır (111).

Açlık durumundaki *Blattella germanica* dişilerinde üreme, juvenil hormonun kısmi sentezi ve yağ dokusundaki vitellogenin sentezi durur. Bu bilgilerden yola çıkarak Süren-Castillo *et al.* (2012), üreme olaylarında besinsel sinyallerin transdüksiyonunda FoxO'nun muhtemel görevini araştırmıştır. Bu türde ilk defa vitellogenini klonlayarak, gen ifadesinin besinsel açıdan regüle olmadığını göstermiştir. Açlık durumundaki dişilerde *in vivo* ortamda FoxO geni susturulmuş ve juvenil hormon sentezininin arttığı, yağ dokusu ve hemolimftteki vitellogenin oranlarında da ciddi artış olduğu gözlenmiştir. FoxO'nun bu

türde açlık durumundaki juvenil hormon ve vitellogenin üretimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (106).

Polifenizm adı verilen çevresel uyarıcıların etkisi ile tek bir genotipten alternatif fenotipler üretilebilmektedir. Libbrecht *et al.* (2013), *Pogonomyrmex rugosus*'ta methoprene muamelesi ile yapay hibernasyon ortamı, hormonal müdahale, gen ifade analizleri, hormon ölçümleri, vitellogenin kantifikasyonları, çevresel uyarıcı ve hormonal sinyalizasyon kombinasyonunun kast oluşturmadaki etkisini araştırmıştır. Sonuç olarak, insülin sinyalizasyonu, juvenil hormon ve vitellogenin arasındaki etkileşimin alternatif fenotipler üretilmesi üzerinde maternal etkileri regüle ettiğini ve nesiller arası bilgi aktarımında vitellogeninin anahtar görevinin bulunduğunu göstermiştir. Bu çalışma hibernasyonun kolonide yeni kraliçelerin üretilmesini tetiklediğini ortaya koymuştur ve bir nesil tarafından deneyimlenen çevresel etmenlerin gelecek neslin fenotipik varyasyonunu nasıl etkilediği açısından aydınlatıcı olmuştur (112).

Lu *et al.* (2015) *N. lugens*'te yaptıkları topikal juvenil hormon III uygulaması ile NIVgR ifadesinin dikkate değer bir şekilde arttığını gözlemlemiştir. Bu sonuçlarla, VgR'nin oositlere Vg alınımında ve böcek üremesinde ciddi öneme sahip olduğu rapor edilmiştir (113).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Ülkemizde buğday ekmeği tüketimi günlük insan beslenmesinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Buğday, makarna, irmik, bulgur ve bisküvi üretiminde, ayrıca yem olarak hayvan beslenmesinde kullanılmaktadır. Süne başta olmak üzere buğday ekiliş alanlarında yayılış gösteren zararlı böcekler, ürünlerde ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Günümüzde tarımsal zararlılara karşı başta kimyasal mücadele olmak üzere fiziksel, kültürel, biyolojik, biyoteknik savaşım yöntemleri kullanılmaktadır. Son yıllarda zararlılara karşı dirençli bitki yetiştirme ve nanopartiküller aracılığı ile gen susturma çalışmaları hız kazanmıştır.

Böcekler özel üreme yetenekleri ve hayatta kalma stratejileri sayesinde dünyada bir milyondan fazla türü ile en kalabalık hayvan grubunu oluşturmaktadır. Böceklerde bulunan biyolojik yolların, metabolik süreçlerin anlaşılmasında DNA dizi tayinleri ve gen ifade profillerinin incelenmesi önemli bir yer tutar. Hedef genlere ya da genoma ilişkin dizi bilgilerinin açığa çıkarılmasıyla birlikte, veri tabanlarına eklenen bilgiler her geçen gün artmaktadır. Böylece zararlıların genetiğine ilişkin verilerden yola çıkılarak, zararlılar ile mücadelede yeni hedef noktaları belirlenebilmektedir. Bu bağlamda gerek hedef genin susturulması, gerek canlının ve konukçunun genetik yoldan manipüle edilmesi, ayrıca canlıya spesifik birçok işleyiş ve durumun taklit edilmesi ile yeni çözümlerin, modellerin, mücadelele yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlanmaktadır.

Böceklerde yeni neslin devamının sağlanmasında önemli bir yeri olan üreme sistemi, böceklerle mücadelede uygun bir hedef yeridir. Bu anlamda dişilerde ovarilerin gelişiminde anahtar role sahip olan protein vitellogenindir. Vitellogenin geninin susturulması ile ovarilerin gelişemediği, dolayısı ile üremenin gerçekleşmediği ortaya konmuştur (94, 114). Vitellogenin proteinlerinin ovariyeye besin tedariki dışında başka görevlerde de bulunabileceği son yıllarda yapılan çalışmalar aracılığı ile bilinmektedir (15, 16, 93, 98, 103, 112).

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen süne vitellogenin genlerine ilişkin verilerin kullanılmasıyla, süne bu gen ifadelerinin susturulması mümkün olabilecektir. Gen susturma işlemi sonrasında süne oluşabilecek fonksiyon kaybı ile vitellogenin proteinlerinin süne fizyolojisindeki önemi anlaşılabilir. Aynı zamanda vitellogenin

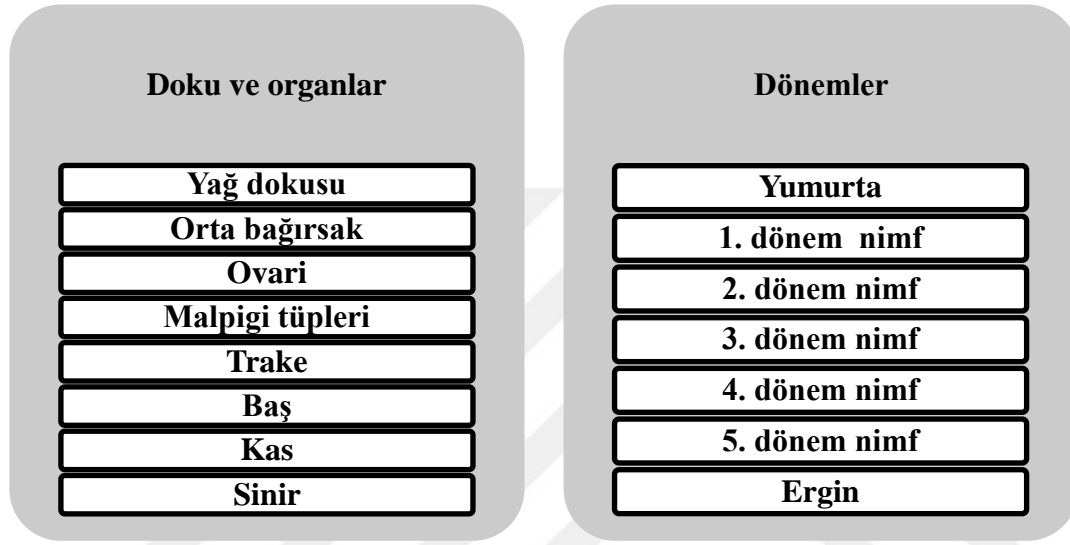
genlerinin fonksiyonunu yitirmesiyle, bu genin regülasyonunda yer alan diğer genler anlaşılabilir. Organizma üzerinde yapılan müdahalelerin haricinde, böceğin beslendiği bitkilerde, ifadesi engellenmek istenen hedef gene özgü dsRNA'ların üretimi sağlanabilmektedir (67, 69). Bu şekilde her organizmaya özel müdahaleye gerek kalmadan, tohum aracılığı ile bitkinin kontrol altındaki tarlalarda yetiştirilmesi sağlanarak, bitkide vitellogenin dsRNA'larının üretimi gerçekleştirilebilir. Bitkiden beslenen süne vitellogenin genleri inaktif hâle getirilip, kontrol altındaki bu alanlarda süne üremesi sekteye uğratarak süne mücadelesinde alternatif yöntemlerin geliştirilmesi söz konusu olacaktır.



4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Çalışmanın ana materyalini *E. maura* oluşturmaktadır. *E. maura*'daki vitellogenin genlerinin karakterizasyonu için süne RNA'sı kullanılırken, vitellogenin genlerinin ifade analizlerinde sünenin tüm gelişme dönemleri, farklı doku ve organları ayrıca sünenin farklı dönemlerde toplanmış örneklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.1 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.1. *E. maura* ifade analizlerinde kullanılan doku, organ ve dönemler

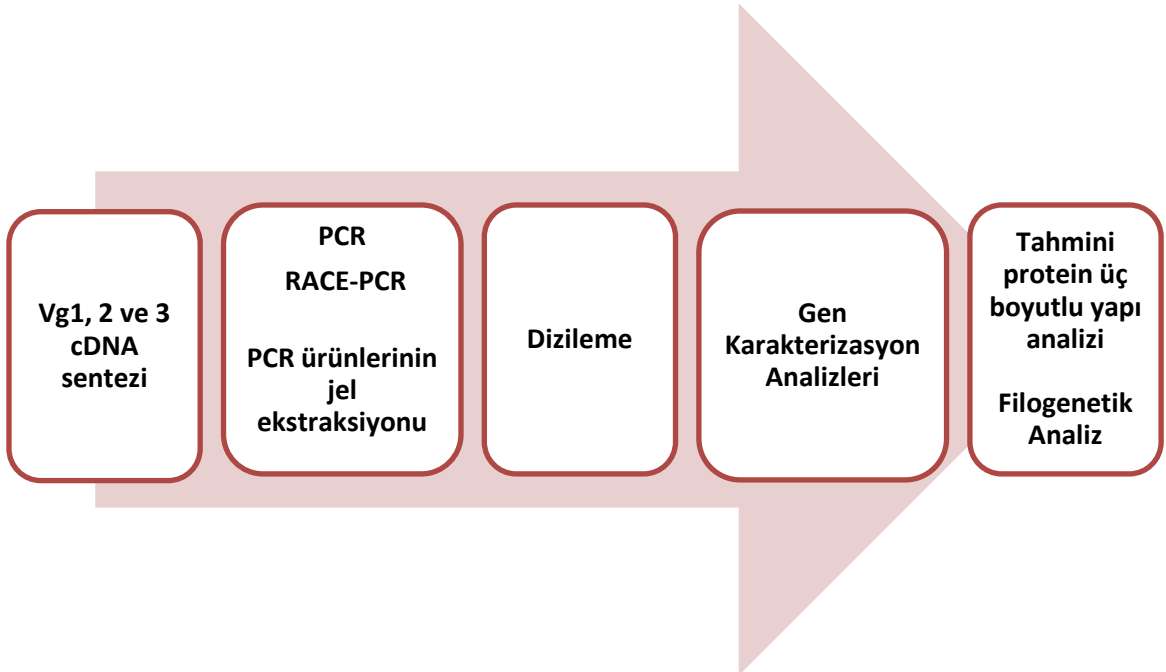
Deneylerde Potasyum klorür (KCl, Molekül ağırlığı 74.56 g/mol, Fluka-Sigma Aldrich, Cat. No. 60129 St Louis, MO, ABD), Sodyum klorür (NaCl, Molekül ağırlığı 58.44 g/mol, Fluka-Sigma Aldrich, Cat. No. 71289), Hidroklorik asit (HCl, Molekül ağırlığı 36,5 g/mol, Merck, Cat. No. 10030172500), Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Molekül ağırlığı 156.02 g/mol, Merck, Cat. No. 106,343.10), Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 , Molekül ağırlığı 136.09 g/mol, BDH, Cat. No. 9268), Trizol (Invitrogen, Cat. No. 15596-018), İzopropanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, Molekül ağırlığı 60.1 g/mol, Merck, Cat. No. 1096344000), Kloroform (CHCl_3 , Molekül ağırlığı 119,38 g/mol, Merck, Cat. No. 1024454000), Etil Alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Molekül ağırlığı 46.07 g/mol, Merck, Cat. No. 1009834000), Nükleid asit boyası (Pronasafe, CK130), Agaroz (Scharlau, Cat. No. AG00301000), Tris Asetik asit EDTA (TAE, Thermo Scientific, Cat. No. B49) kimyasalları kullanılmıştır.

cDNA sentezi aşamasında Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Cat. No. 04379012001) kullanılmıştır. PCR reaksiyonları Taq DNA Polimeraz (Go Taq Flexi DNA Polymerase 100 units, Promega, Cat. No. M8291) ve Deoksinükleotid solüsyon karışımı (dNTP, Promega, Cat. No. C1141) kullanılarak, RACE PCR analizleri ise 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche, Cat. No. REF 03353621001) kullanılarak yapılmıştır. Eş zamanlı PCR reaksiyonlarında LightCycler 480 SYBR Green Master I (Roche, Cat. No. 04707516001) kullanılmıştır. Jel ekstraksiyonu için Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Cat. No. 28704) kullanılmıştır. 100 bç markır (Gene Ruler Fermentas, Cat. No. SM0241), agaroz jel markırı olarak kullanılmıştır. DNA dizilemeleri ise hizmet alımı ile sağlanmıştır.

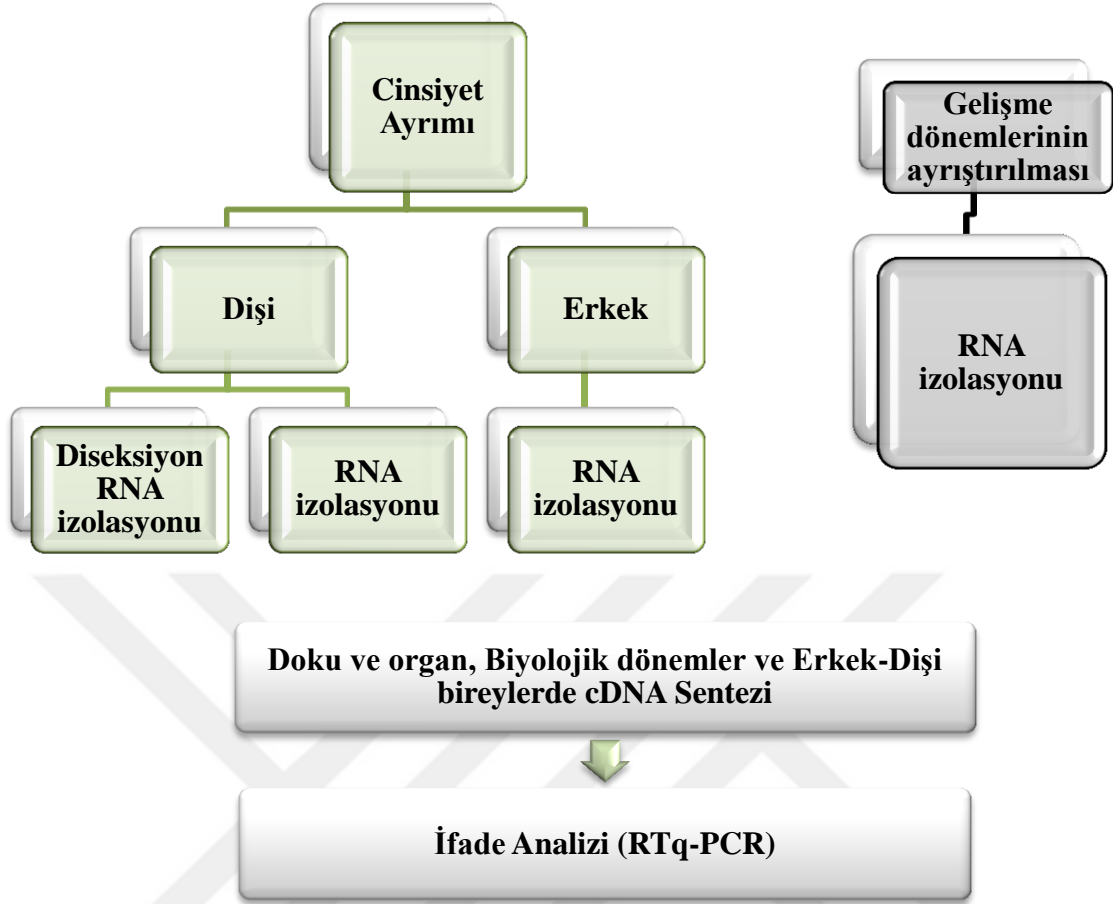
4.2. YÖNTEM

Tez çalışmasının diseksiyon aşamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Entomoloji Laboratuvarı'nda, moleküler analizler ise Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Böcek Moleküler Entomoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Vitellogenin genlerinin karakterizasyon ve ifade analizlerine ilişkin izlenen deney aşamaları Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.2. *EmVg* genlerinin karakterizasyon deney aşamaları



Şekil 4.3. *EmVg* genlerinin ifade düzeyi deney aşamaları

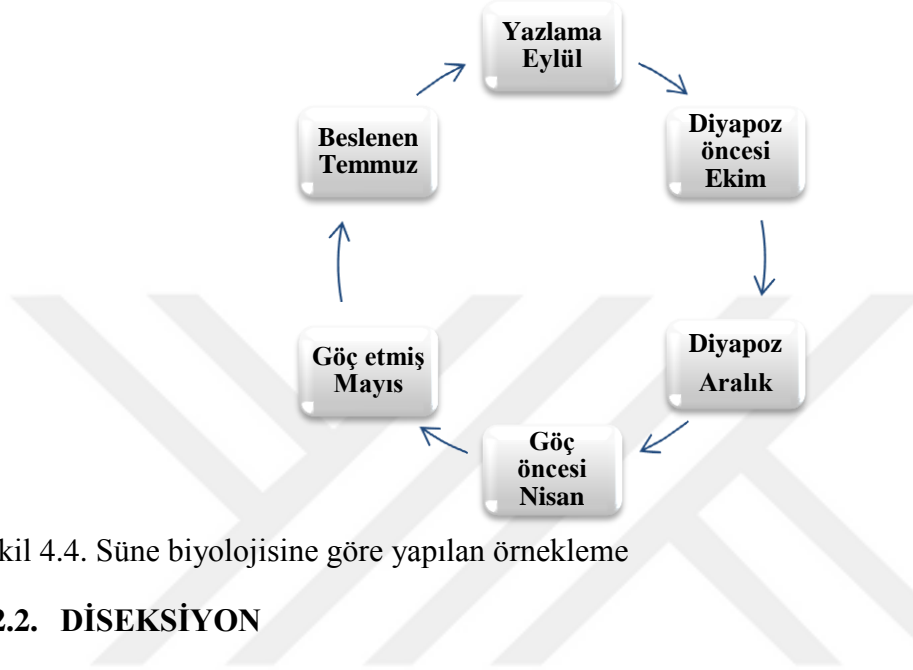
Bu analizler esnasında kullanılan cihazlar arasında ise hassas terazi (Marka: Precisa, Model: XB 220A), pH metre (Marka: Inolab, Model: pH 720), manyetik karıştırıcı (Marka: Isolab, Cat. No. 613.01.001), su banyosu (Marka: Memmert, Model: WNB 14), mikrodalga fırın (Marka: Beko, Model: MD 1505), ısı bloğu (Thermo-Scientific, Model: 2001-1CE), PCR (Marka: Bio Rad, Model: MJ-Mini), eş zamanlı PCR (Marka: Roche, Model: Light Cycler 480 II 96-well version, Cat. No. 05015278001), yatay elektroforez tankı (Marka: SCI-PLAS, Model: Hu-10) ve güç kaynağı (Marka: Labnet, Model: Power Station 300), jel görüntüleme cihazı (Marka: DNR Bio-Imaging Systems, Model: LumiBIS 1.4), nanodrop (Marka: Thermo Scientific, Model: Nanodrop 2000), mikrosantrifüj (Marka: Beckman Coulter, Microfuje 22R), saf su sistemi (Marka: Millipore, Model: Elix 10 UV, Milli-Q Synthesis A10), vorteks (Marka: Ika, Model: Vortex Genius 3) yer almaktadır.

Elde edilen sonuçların analizinde çeşitli biyoinformatik analiz programlarından faydalanılmıştır. DNA ve aminoasit dizileri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> sitesinden BLAST programları (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak analiz edilmiştir. Vitellogenin genlerine ait açık okuma çerçeveleri “ORF finder” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) programı ile tespit edilmiştir. Proteinlere ait domainler “Conserved Domains” programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) aracılığı ile bulunmuştur. Proteinlerin yaklaşık molekül ağırlığı “Bioinformatic Tools” programı (http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html) aracılığı ile hesaplanmıştır. Tahmini sinyal peptidi analizinde SignalP programı (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), tahmini fosforilasyon potansiyeli analizinde “NetPhos (2)” fosforilasyon tahmin programı (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), tahmini N-tipi ve O-tipi glikozilasyon potansiyeli analizlerinde sırasıyla “NetNGlyc 1.0” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) ve “NetOGlyc 3.1” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) programları kullanılmıştır. Süne vitellogenin aminoasit dizilerinin diğer böceklerde bulunan Vg aminoasitler ile hizalanması MUSCLE programı (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) ile yapılmıştır. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında MEGA 6.06 programı kullanılmıştır. Primerlerin tasarlanmasında IDT (<https://eu.idtdna.com/pages/scitools>) ve Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) sitelerinden yararlanılmıştır. Primerlerin erime sıcaklıklarının hesaplanmasında OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html>) sitesinden yararlanılmıştır. Proteinlerin tahmini üç boyutlu yapılarının oluşturulmasında Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) programı kullanılmıştır.

4.2.1. BÖCEKLERİN TOPLANMASI

E. maura yumurtaları, yazlayan erkek ve dişi bireyler Ankara-Haymana buğday tarlalarından, kışlayan erkek ve dişiler ise Ankara-Beynam Ormanları’ndan toplanmıştır. Sünenin yaşam döngüsü dönemlerine ilişkin toplanan örneklerin ait olduğu aylar Şekil 4.4’te verilmiştir. Toplanan ergin bireylerin tür ve cinsiyet ayrımları Abbas (1990)’dan yararlanılarak stereomikroskop altında, erkek bireylerin üreme organlarındaki çıkıntıların kıvrık yapıda olması ile dişi bireylerde ise orta genital plakalanın VII. abdominal

sternumun kenarına ulaşması ile yapılmıştır (23). Araziden toplanan süne yumurtaları laboratuvara getirilerek 25 ± 1 °C sıcaklık, %60-70 orantılı nem, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşulların sağlandığı iklim odalarında bekletilerek nimflerin çıkması sağlanmıştır. Besin olarak şekerli su verilen nimfler günlük kontrol edilerek, gömlek değiştirenler mikrosantrifüj tüpüne alınarak RNA izolasyonu için -80 °C'ye kaldırılmıştır.



Şekil 4.4. Süne biyolojisine göre yapılan örnekleme

4.2.2. DİSEKSİYON

Tür ve cinsiyet ayrımı yapılan erginlerden diseksiyon işlemi için 50 adet dişi birey kullanılmıştır. Yağ, orta bağırsak, sinir sistemi, kas sistemi, malpigi borucukları, baş, ovarı, trake doku ve organları binoküler mikroskop ve ince uçlu diseksiyon pensleri yardımıyla diğer dokulardan ayrılmıştır. Dokuların bozulmaması için diseksiyonlar buz üzerinde yapılmış ve disekte edilen örnekler soğuk 1XPBS (phosphate buffered saline) çözeltisine alınmıştır. Disekte edilen dokular, RNA izolasyonları yapılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir. 1xPBS fizyolojik çözeltisinin hazırlanışı aşağıdaki gibidir:

<u>Miktar</u>	<u>Kimyasal</u>
8 g	NaCl
0.2 g	KCl
1.44 g	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O
0.24 g	KH ₂ PO ₄

Yukarıda miktarları belirtilen kimyasallar hassas terazide tartılarak 800 ml distile su içerisinde manyetik balık yardımıyla karıştırılarak çözülmüştür. HCl eklenerek pH 7,4'e ayarlanmıştır. Hacim 1 litreye tamamlanıp, otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.3. RNA İZOLASYONU

RNA izolasyonu süneye ait Nisan, Mayıs, Temmuz, Eylül, Ekim, Aralık aylarında toplanan erkek ve dişi bireyler, süne gelişme dönemleri ve yağ, orta bağırsak, sinir sistemi, kas sistemi, malpigi borucukları, baş, ovarı, trake doku ve organlarına Trizol kullanılarak uygulanmıştır. RNA izolasyonunda yapılan aşamalar aşağıda verilmiştir:

- ❖ Ağırlığı 50-100 mg olan örneklerin üzerine 200 µl Trizol eklenerek steril ezici çubuk yardımıyla homojenize edilmiştir. Homojenatın üzerine 800 µl Trizol daha eklenerek, oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.
- ❖ Üzerine 200 µl kloroform eklenerek oda sıcaklığında 3 dakika bekletilen örnekler, 4°C'de 12,000g devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası örnekler, altta kırmızı, ortada fenol kloroform fazı ve üstte renksiz faz olmak üzere üç ayrı kısma ayrılmıştır. RNA'nın bulunduğu üst renksiz fazlar yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- ❖ Örneklerin üzerine 0,5 ml izopropanol eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika süreyle bekletildikten sonra 4°C'de 12,000g devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- ❖ Süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından görünür hâle gelen RNA pelletleri %75'lik 1 ml etanol ile yıkanarak 4°C'de 7,500g devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Kuruyan pelletler 50 µl saf su ile çözülmüştür.
- ❖ Elde edilen RNA'ların kalitesi ve miktarı %1'lik agaroz jel elektroforezi ve nanodrop yardımıyla analiz edilmiştir. İzole edilen RNA'lar sonraki deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

4.2.4. cDNA SENTEZİ

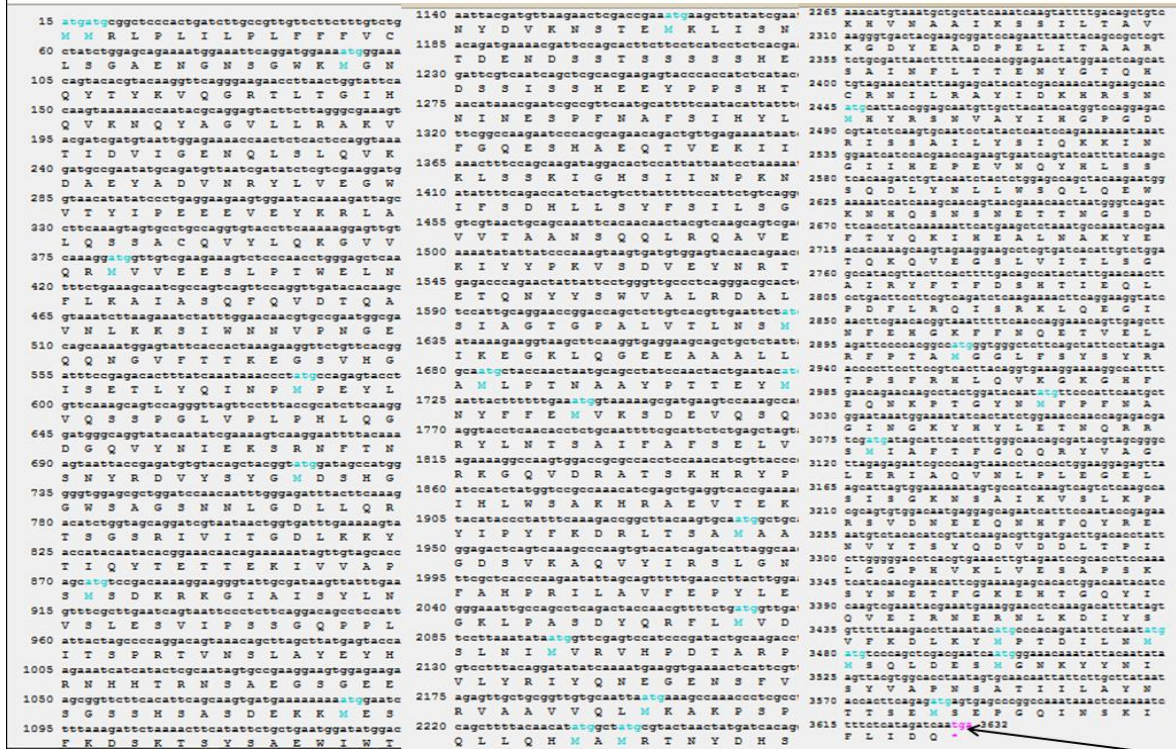
RNA örneklerinden yapılan cDNA sentezinin ilk aşamasında 1 µg RNA üzerine 1 µl oligo-dT primer eklenip, hacim ddH₂O ile 13 µl'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımı 65 °C'de 10 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir. Denatüre örnek üzerine eklenen reaktifler aşağıda sunulan miktarlarda hazırlanmıştır:

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

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

4.2.5. PCR

EmVg2 genini kodlayan tüm cDNA dizisine ulaşabilmek amacıyla, *E. maura*'nın yağ dokusundan hazırlanan cDNA kütüphanesinde bulunan (115), 5617 bp uzunluğundaki contig00013'e ait nükleotid dizisi NCBI verileri ile kıyaslanmıştır. Vitellogenin-2 olduğu düşünülen tahmini proteine ilişkin "ORF Finder" programı ile yapılan analiz sonucunda, nükleotid dizisinde eksiklik olduğu ve dizinin "dur" kodonuna rastladığı görülmüştür (Şekil 4.5). Bu nedenle ilgili bölgeye spesifik primerler tasarlanarak dizileme aşamasına gidilmiştir.



Şekil 4.5. Contig00013'ün ORF analizi

00013 numaralı contigin “dur” kodonundan 131 bç öncesine ileri primeri (Forward (F)), 128 bç sonrasına ise geri primeri (Reverse (R)) tasarlanmıştır (Şekil 4.6).

5'...TcAATATGATGTC^{CCAGCTCGACGAAT}CAATGGGaaACAAATATTACAATATAAGTTACGTGGCACCTAA TAGTGCAACAATTA^{TCTT}GCTTATAATACCAC^{TTCAGAGATGAGT}GAGCCCGGCCAAAtAACTCCaaAATc TTTCTCATAGATCAA^{TGA}GGCGCCGActcaAAAATCATGACGAATCaAATAACATGGATCAACCATCTGCGGT AAACAACCGTATGGAGGcaTTGTTGAGAAATGCCAACTTGGCGTACAAAATGGGAAAGCATACGTCTTGTAT GCGTCCGTCTCTTTGATGA^{AAATCCAAACAAGGGCAGTACTCACTCACTGTAGCACATGCAGAAAGTCCAG TTTCCGAA...3'}

Şekil 4.6. Hatalı olduğu düşünülen bölge üzerinde primerlerin gösterimi: Mavi işaretli bölge ileri primeri, kırmızı işaretli bölge “dur” kodonu, yeşil işaretli bölge geri primeri

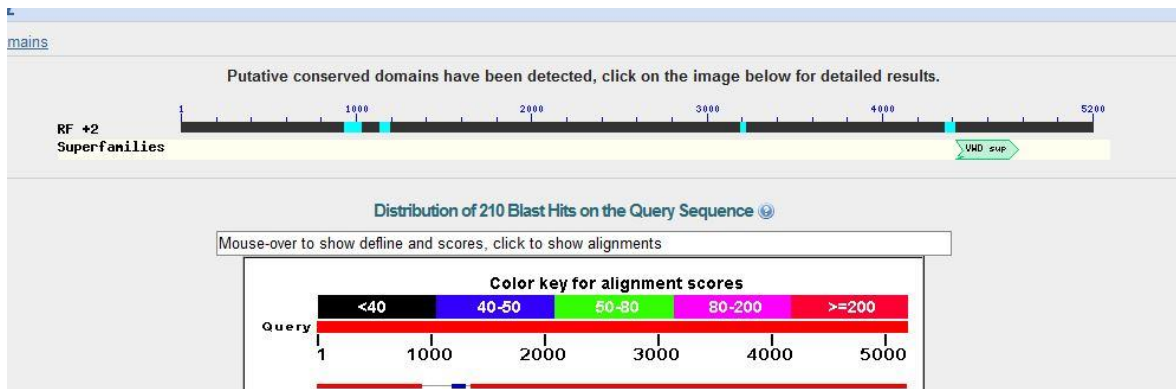
EmVg2'nin tüm dizisine ulaşabilmek için ilgili bölgelere tasarlanan primerlerle cDNA kullanılarak, aşağıda sunulan miktarlarda reaksiyon hazırlanıp, Çizelge 4.1'de verilen koşullarda PCR gerçekleştirilmiştir. Yapılan her PCR reaksiyonuna ddH₂O ile negatif kontroller eklenecek, deneyde herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı gözlenmiştir.

Reaktif	Hacim
2,5 mM MgCl ₂	5 µl
5x Reaksiyon Tamponu	10 µl
10 mM dNTP	1 µl
10mM İleri Primer	1 µl
10mM Geri Primer	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,5 µl
cDNA	1 µl

Çizelge 4.1. PCR analizinde kullanılan koşullar

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü
Ön Denatürasyon	94	3	1
Denatürasyon	94	1	35
Bağlanma	60	1	
Uzama	72	2	
Son uzama	72	10	1

E. maura kışık cDNA kütüphanesinde bulunan contiglerin BLAST analizi sonucunda, contig00385 ve contig00092'nin *EmVg3* dizisine ait iki ayrı parça olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7). İki contig arasındaki boşluğu doldurmak üzere primerler tasarlanarak (Şekil 4.8), Çizelge 4.3.'de verilen koşullarda bağlanma sıcaklığı 55°C olacak şekilde PCR yapılmıştır.



Şekil 4.7. Contig00385 ve contig00092'nin BLAST analizi

>contig00385

5'...TCCTCTTCATCTAGCGAGGATTCTTCGATCGACTCAAGTCAAGAGTATCTTCAATCTCCTCCTAAAATGA
AAGAATCACCGCGCATCGAATTCTTACCAGATCAAATGCTTAGACAAGGATCTCCTGACGGACAGACAGTT
GAAAAAATTGTCCAAGTCGCAAGGAAAAATTGGGCAAACAGTTGTTGATGCGAATAAGATCGTTCCGGC...

>contig00092

...ATAAAATCGCGCAAGGTTAAAGGGTTTGAAGCCTCTGCTCTGTTGGCAGCGTTACCTTACACAGCACGCT
ACCTTACCCTGAATATAGGAACACTCTTTTAAAATGGTAAAAGCGATGAAGTTCAAAGCCAGAGGTAC
CTCAACACTTCAGCCTTTATAGCATTGCTGAGCTCGTGAAGAAAACTGTAGTAGACAGCGACACCGCTCA
ACATCGTTACCCTATCCATGTTTCTGGTCCGCAATCCGATGCTGAGGTCTCAGAATATATAACATATAT...3'

Şekil 4.8. *EmVg3* contigleri arasındaki bölgenin çoğaltımı için tasarlanan primerler (İleri primer yeşil taralı, geri primer sarı taralı)

PCR sonrası PCR ürünleri %2'lik agaroz jele 100 bç'lik markır ile yüklenerek, amplifikasyon kontrol edilmiştir.

4.2.6. PCR ÜRÜNLERİNİN GÖRÜNTÜLENMESİ

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ve jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir. %2 oranında agaroz jelin hazırlanmasında ilk olarak 200 mg agaroz hassas terazide tartılarak, 1xTAE tamponu ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Erlen içerisindeki karışım mikrodalga fırında kaynatılarak, agarozun tampon içerisinde çözülmesi sağlanmıştır. Oda sıcaklığında soğutulmaya bırakılan örnek üzerine 5 µl etidyum bromid (10 mg/ml) eklenmiştir. Karışım iyice sağlandıktan sonra jel, elektroforez kasetine dökülüp üzerine jel tarağı yerleştirilmiş ve 30 dakika donmaya bırakılmıştır. Tank içerisine yerleştirilen jelin kuyucuklarına yüklenen örnekler, 1xTAE içerisinde 1 saat 80-90 voltta elektroforez aracılığı ile yürütülmüştür. Jel görüntüme sistemi kullanılarak UV aracılığı ile amplifiye ürünler görüntülenmiştir.

4.2.7. RACE PCR

EmVg3 cDNA tüm dizisinin elde edilmesinde 5' ve 3' RACE PCR teknikleri kullanılmıştır. Tekniklerin uygulanmasında yapılan çalışmalar aşağıda sunulmuştur:

4.2.7.1. RACE PCR Primer Tasarımı

5' RACE PCR için hedef cDNA'nın 5' ucuna üç adet, 3' RACE PCR için ise hedef cDNA'nın 3' ucuna ise bir adet primer tasarlanmıştır. cDNA'nın 5' ucuna özgü tasarlanan

primerlerden gene spesifik primer “SP1”, mRNA’nın revers komplementeri yönünde olup mRNA’dan cDNA’nın transkribe edilmesinde kullanılmıştır. SP1’in yukarı kısmında yer alan gene spesifik bölgenin amplifikasyonun sağlanmasında, ikinci bir primer olan “SP2” ile nested PCR yapılmıştır. İkinci bir PCR reaksiyonu için ise SP3 primeri, SP2 ile aynı amaç için kullanılmıştır. Bu primerler tasarlanırken, primerler arasında yaklaşık 100-150 bç mesafe bırakılmıştır. 3’ RACE PCR için ise cDNA’nın 3’ ucuna doğru “SP5” primeri tasarlanmıştır. Her iki teknik için tasarlanan primerlerin GC içerikleri %50-60 arasında olup, uzunlukları 20 ila 25 bç arasında değişmektedir. *EmVg3*’ün tüm cDNA dizisine ulaşabilmek için tasarlanan RACE PCR primerleri Şekil 4.9’da, primerlere ait detaylar ise Çizelge 4.2’de verilmiştir.

>5’ RACE

GGAAAAAGGAAAGCAGTACACTTACCAGCTTCATGGTAGAACATTGGCTGGAATCCACCAAGTTAAGGAC
CAATATACTGGAGTACTTATCCGAGCTAAGCTTGTGGTGAACGCAGATGCCGACAACCAAATCACACTACA
GGTTTATGACGCTGAATCCGCGGAAGTCAACCAATACCTGAGCAATGGATGGGCAACTCCTATTGCAGATA
AAGAAGTGCAATACAAGGGTATCCAGCTCCACAACAGTCCTTTCCAATTGCATCTCAAAAATGGAGTTGTG
AAAAAATGCTTGTGGAAAAAATGTACCGACTTGGGAAGTTAATTTACTGAAAGCAATTGCCAGCCAGTTC
CAGGTAGACACACAAGCAGTAAATCTTAAAAAATCTAAATGGAACAACGTGCCAAGTGGGAAACAGATGA
GTGGAATCTACAAGACCAAAGAAGATTCTGTCAATGGTGTGTTATGAAACTTGCTATGAAGTCTACCCAATG
CAAGAATACGTCCTTCAAAGCCGACCAGAAATTTGTACCTCTCCAGCCTTCAGGAAGATGGGCAAGTTAT
GAACATTGAAAAGTCAAGGAATTTCTCAAACAGTGACCACCACATGGTGTACCGATATGGGATGAATGGA
CATGAAGGATGGAAAGCAGCCACCAACCAGATGGGAAATTTGCTTGCTAGGTCATCTACAAGTCGAATTGT

>3’ RACE

ATGGAATCAATATCTTCTACGATGGTCATCGGGCGCAGGTCTACATTCCAATATTTACAGGAACAAAGTTC
GAGGTCTATGCGGTACCTTCGACGGCGAACCTGTCAACGACTTTACCGCTCCAACCAACTGCGTCTGAAG
AACTATCAACAATTCACAGCACTCCTACGCTGTTGTGGATCCCAATGTCAAGGTCCAGCTAACGAACTCAGT
CGACAAGCCCAGAGTGCACCCTGCTCAACGAAAGAAGTACTTTTTGCCGACGTTATATCCGATGCTGAAGC
AGGGCGAGCTTACAAGCATGCGAGCCCACGAGTCACCCCTAACATCATCAAATCCATCAGCAAGACCCAC
AGGGCTGTACTGTTACAGGGTCATGGTTGTCTCAAGGAAGGAAAAACCTGCTTCTCCATCAAACCCCAA
CCATCCTGCAACACTAACTGCCAACCCCAAGGAACCTTGAAAAGACTATTGAATTCATTGCTTGAACCAA
TCAAGTGCTACTCAACTGGGTGGCCATGGTCAAGAAAGGAGCCAACCC

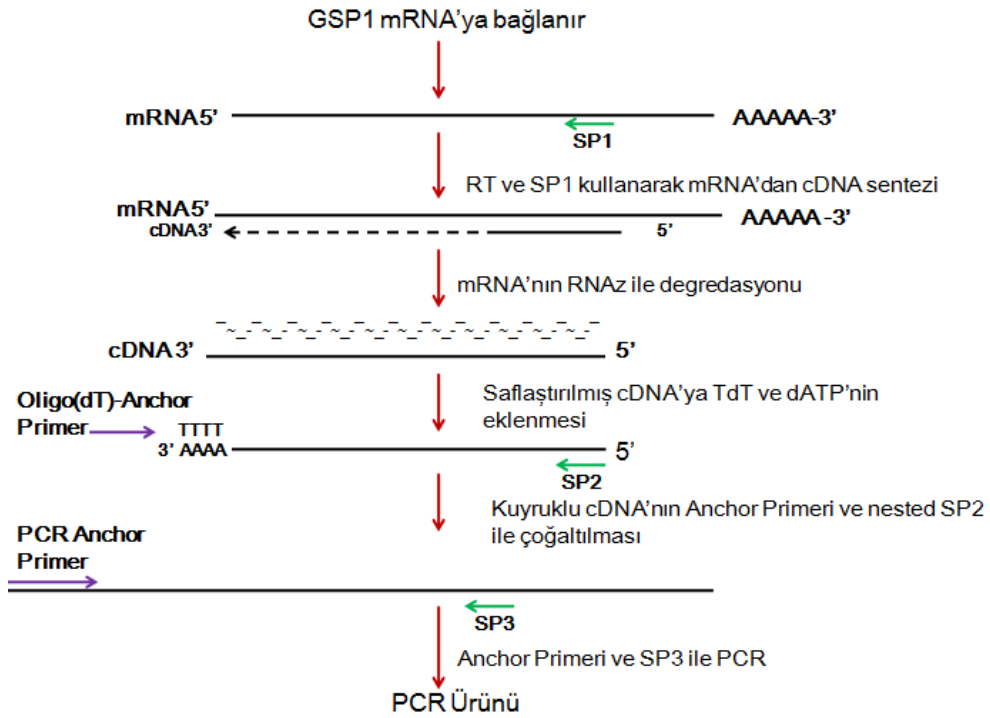
Şekil 4.9. *EmVg3* RACE PCR primerleri

Çizelge 4.2. *EmVg3* cDNA'sına özgü tasarlanan RACE PCR primer özellikleri

Primer	Primer Dizisi	Bç	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	%G+C
SP3	AGTTGCCCATCCATTGCTCA	20	58,4	50
SP2	GGCTGGCAATTGCTTTCAGT	20	58,4	50
SP1	TCTGGTCGGCTTGAAGGAC	20	60,5	55
SP5	TCCTACGCTGTTGTGGATTC	20	58,4	50

4.2.7.2. 5' RACE PCR

EmVg3'ün 5' ucuna doğru tüm cDNA dizisini elde edebilmek için, 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation kitinde detaylı olarak anlatılan, 5'RACE PCR prosedürüne uygun olarak çalışılmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. 5' RACE PCR reaksiyonuna genel bir bakış

5' RACE PCR'in ilk aşaması olan, mRNA'dan cDNA'nın transkribe edilmesinde SP1 primeri kullanılmıştır. Reaksiyonda kullanılan reaktifler ve miktarları aşağıda sunulmuştur:

<u>Reaktif</u>	<u>Hacim</u>
cDNA Sentez Tamponu	4 µl
Deoksinükleotid Karışımı	2 µl
cDNA Sentez Primeri SP1 (12.5 µM)	1 µl
Total RNA	0,2-2 µg
Transcriptor Revers Transkriptaz Enzimi	1 µl
Toplam hacim	20 µl

Hazırlanan reaksiyonlar 55⁰C'de 60 dakika, 85⁰C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Elde edilen reaksiyon ürünleri, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Cat. No. 11732668001) kullanılarak, kit prosedürüne uygun şekilde saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış cDNA örneğinin 3' ucunda poli (A) ucu oluşturulmak için kullanılan reaktifler, aşağıda sunulan miktarlarda hazırlanmıştır:

<u>Reaktif</u>	<u>Hacim</u>
Purifiye cDNA ürünü	19 µl
10x Reaksiyon Tamponu	2.5 µl
2 mM dATP	2.5 µl

Karışım 94⁰C'de 3 dakika inkübe edilerek buza alınmıştır. Üzerine 1 µl Terminal Transferaz (80 u/ µl) eklenerek, 37⁰C'de 20 dakika, enzim inaktivasyonu için ise 70⁰C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Elde edilen dA-kuyruklu cDNA'nın PCR reaksiyonunun hazırlanılmasında kullanılan reaktifler aşağıda sunulmuştur:

Reaktif	Hacim
dA-kuyruklu cDNA	5 µl
Oligo dT-Ankor Primer	1 µl
Spesifik primer SP2 (12.5 µM)	1 µl
Deoksinükleotid Karışımı	1 µl
Expand High Fidelity Enzim Karışımı	0.75 µl
10x Expand High Fidelity Tamponu	5 µl
ddH ₂ O	36.25 µl
Toplam hacim	50 µl

PCR reaksiyonu bağlanma sıcaklığı 55°C olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşulları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. 5' RACE PCR ikinci aşama PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	94	2 dk	1
Denatürasyon	94	15 sn	10
Bağlanma	55	30 sn	
Uzama	72	40 sn	
Denatürasyon	94	15 sn	25
Bağlanma	55	30 sn	
Uzama	72	40 sn	
Son uzama	72	7 dk	1

Elde edilen PCR ürünü ile SP3 primeri kullanılarak yeni bir amplifikasyon gerçekleştirmek üzere, aşağıdaki miktarlarda reaktifler hazırlanmıştır:

Reaktif	Hacim
PCR ürünü	1 µl
PCR Ankor Primer	1 µl
SP3 (12,5 µM)	1 µl
Deoksinükleotid Karışımı	1 µl
10x Expand High Fidelity Tamponu	5 µl
Expand High Fidelity Enzim Karışımı	0,75 µl
ddH ₂ O	40,25 µl
Toplam hacim	50 µl

PCR reaksiyonu bağlanma sıcaklığı 58°C olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşulları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

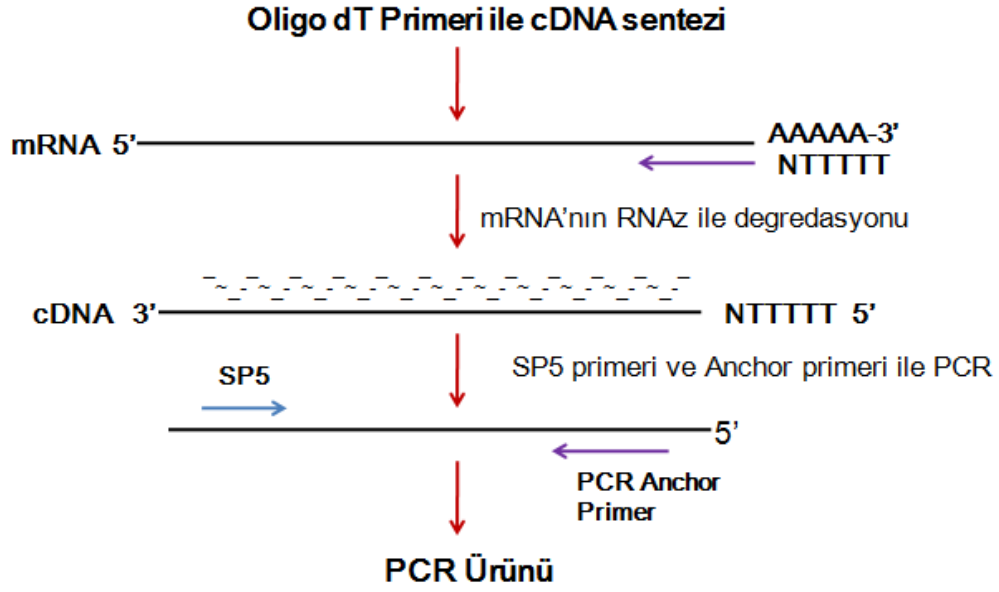
Çizelge 4.4. 5’ RACE PCR üçüncü aşama PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	94	2 dk	1
Denatürasyon	94	15 sn	10
Bağlanma	58	30 sn	
Uzama	72	40 sn	
Denatürasyon	94	15 sn	25
Bağlanma	58	30 sn	
Uzama	72	40 sn	
Son uzama	72	7 dk	1

Elde edilen PCR ürününden 20 µl alınıp, %1’lik agaroz jele yüklenerek, amplifikasyon kontrol edilmiştir.

4.2.7.3. 3’ RACE PCR

EmVg3’ün 3’ ucuna doğru tüm cDNA dizisini elde edebilmek için, 5’/3’ RACE Kit, 2nd Generation kitinde ayrıntılı olarak sunulan, 3’RACE PCR prosedürüne uygun olarak çalışılmıştır. 3’ RACE PCR’a ilişkin deney akışı aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. 3' RACE PCR reaksiyonuna genel bir bakış

Oligo-dt primerleri kullanılarak cDNA sentezinin gerçekleştirildiği reaksiyon reaktifleri ve miktarları aşağıda verilmiştir:

Reaktif	Hacim
cDNA Sentez Tamponu	4 µl
Deoksinükleotid Karışımı	2 µl
Oligo dT-Ankor Primer	1 µl
Total RNA	0,5-2 µg
Transcriptor Revers Transcriptaz Enzimi	1 µl
Toplam hacim	20 µl

Reaksiyon karışımı 55⁰C'de 60 dakika, 85⁰C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Çizelge 4.5'de koşulları verilen PCR reaksiyonu, elde edilen cDNA ürünü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan reaktifler ve miktarları aşağıda sunulmuştur:

Reaktif	Hacim
cDNA ürünü	1 µl
PCR Ankor Primer	1 µl
Spesifik Primer SP5 (12,5 µM)	1 µl
Deoksinükleotid Karışımı	1 µl
10x Expand High Fidelity Tamponu	5 µl
Expand High Fidelity Enzim Karışımı	0,75 µl
ddH ₂ O	40,25 µl
Toplam hacim	50 µl

Çizelge 4.5. 3' RACE PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	94	2 dk	1
Denatürasyon	94	15 sn	10
Bağlanma	55	30 sn	
Uzama	72	40 sn	
Denatürasyon	94	15 sn	25
Bağlanma	55	30 sn	
Uzama	72	40 sn	
Son uzama	72	7 dk	1

Elde edilen PCR ürününden 20 µl alınıp, %1'lik agaroz jele yüklenerek, amplifikasyon kontrol edilmiştir.

4.2.7.4. Jel Saflaştırma

PCR ve RACE PCR ürünleri Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Cat. No. 28704) prosedürüne uygun olarak, aşağıdaki sunulan aşamalarla jelden saflaştırılmıştır:

- ❖ Agaroz jelde görüntülenen PCR ürünleri bistüri yardımıyla jelden kesilmiştir.
- ❖ Jel parçacıkları hassas terazide tartılarak, miktarlarının 3 katı kadar (100 mg~100 µl) Buffer QG eklenmiştir.
- ❖ Örnekler 50°C'de 10 dakika inkübe edilirken, 2-3 dakika aralıklarla karıştırılmıştır. Jel tamamen çözüldükten sonra, karışımın sarı renk aldığı gözlenmiştir.

- ❖ Örneklere jel parçacığıyla aynı miktarda izopropanol eklenerek, homojenizasyon sağlanmıştır.
- ❖ Koleksiyon tüpü, Qiaquick Spin kolona yerleştirilerek, örnekler kolon üzerine eklenmiş ve 1 dakika boyunca 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası koleksiyon tüpünde toplanan kısım atılmış ve kolon tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
- ❖ Kolon üzerine 0,5 µl QG buffer eklenmiş ve 1 dakika 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası koleksiyon tüpünde toplanan kısım atılmış ve kolon tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
- ❖ 0,75 ml Buffer PE yıkama işlemi için kolona eklenmiş ve 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde toplanan kısım atılmış ve kolon tüpe tekrar yerleştirilmiştir. Aynı işlem ikinci kez tekrar edilmiştir.
- ❖ Mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilen spin kolon membranı üzerine, 30 µl Buffer EB Qiaquick üzerine eklenerek, 1 dakika 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- ❖ Örnekler %1’lik agaroz jelde ve nanodropta saflık ve miktar tayini için kontrol edilmiştir.

Jel saflaştırılması yapılan örnekler için dizileme hizmeti alınarak, PCR ürünü ve tüm cDNA dizileri analiz edilmiştir. Her bir genin karakterizasyonu için hizalama, korunmuş domain, korunmuş motif, tahmini sinyal peptidi, tahmini fosforilasyon potansiyeli, tahmini glikozilasyon potansiyeli ve tahmini üç boyutlu yapı analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.2.7.5. Filogenetik Analiz

Dizi analizi sonrası vitellogeninlere ait elde edilen diziler, GenBank’ta kayıtlı olan diğer böcek vitellogeninleri ile MUSCLE programı aracılığıyla hizalanmıştır. MEGA 6.06 programı (116) kullanılarak yapılan analizde yöntem olarak Neighbour Joining Clustal-W seçilmiş, bootstrap değeri ise 1000 olarak alınmıştır.

4.2.8. EŞ ZAMANLI PCR (RT-qPCR)

EmVg genlerine spesifik RT-qPCR primerleri karakterize edilen *EmVg*’lerden yararlanılarak tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerde şu özelliklere dikkat edilmiştir: Primer uzunlukları 19-24 bç arasında, amplicon büyüklüğü ise <200 bç olmalıdır. İleri ve geri primerleri arasındaki sıcaklık farkı 3°C’den fazla olmamalıdır. Erime sıcaklığının 57-63 °C arasında, %G+C oranının 50-60 arasında olması ve primerlerin saç tokası yapısı

oluşturacak formda olmamasına dikkat edilmiştir. Kullanılan primerlere ilişkin bilgiler Çizelge 4.6’da, RT-qPCR reaksiyon karışımı ise aşağıda verilmiştir:

Reaktif	Hacim
LightCycler® 480 SYBR Green I Master 2x	10 µl
İleri Primer (10 µM)	0,8 µl
Geri Primer (10 µM)	0,8 µl
cDNA	1 µg
Toplam hacim	20 µl

Çizelge 4.6.Eş Zamanlı PCR analizlerinde kullanılan primerlere ait dizi bilgisi, bağlanma sıcaklığı ve %G+C oranı

Primer adı	Primer Dizisi 5’-3’	Bağlanma Sıcaklığı	%G+C
<i>EmVg1 F</i>	AGCGATAAGAACAAGGGACAG	62	48
<i>EmVg1 R</i>	CTGATGTAGGCGAGGAATCTG	64	52
<i>EmVg2 F</i>	TTCGCATTCTCTGAGCTAGTAAG	66	43
<i>EmVg2 R</i>	AGCCGGTCTTTGAAATAGGG	60	50
<i>EmVg3 F</i>	AGCCGACCAGAATTTGTACC	60	50
<i>EmVg3 R</i>	TCCTTCATGTCCATTCATCCC	62	48
<i>Emβ-Aktin F</i>	AATCGCTGACAGGATGCAG	58	53
<i>Emβ-Aktin R</i>	GTTGGAAGGTAGACAGGGAAG	64	52
<i>Emα-Tubulin F</i>	CTCTACTTATGGAACGCCTGTC	66	50
<i>Emα-Tubulin R</i>	GTCGGAGTGTTCAAGAGTGG	62	55

Eş zamanlı PCR analizlerinde hedef gen bölgelerinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek üzere, biyolojik ve tekniksel üçlü tekrarlar hâlinde reaksiyonlar hazırlanmıştır. Reaksiyonlara negatif kontroller eklenmiş, *β-Aktin* ve *α-Tubulin* ise housekeeping genler olarak kullanılmıştır. Primerlerin dimer yapısı oluşturup oluşturmadığı, reaksiyon sonunda erime eğrisi analizi ile kontrol edilmiştir. Eş zamanlı PCR analizinde kullanılan koşullar Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Eş Zamanlı PCR analizlerinde kullanılan PCR koşulları

Aşama	İşlem	Sıcaklık	Süre
Aktivasyon	İlk Denatürasyon	95°C	8 dakika
Amplifikasyon	Denatürasyon	95°C	10 saniye
	Bağlanma	55-65°C	20 saniye
	Uzama	72°C	30 saniye
Erime Eğrisi	Denatürasyon	95°C	5 saniye
	Yeniden bağlanma	55-65°C	1 dakika
	Denatürasyon	95°C	0
Soğuma	Soğuma	40°C	10 saniye

RT-qPCR analizi sonucunda elde edilen CT değerleri, β -Aktin ve α -Tubulin housekeeping genlerine ait CT değerleri ile karşılaştırılmak üzere, $2^{-\Delta CT}$ formülü kullanılarak normalize edilmiştir (56). İstatiksel değerlendirme, One-way ANOVA ve Duncan's multiple range testleri kullanılarak, SPSS 16.0 (Schweiz AG, Zurich, Switzerland) yazılımı yardımı ile yapılmıştır. *P*-değerinin 0.05'ten küçük olması istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. VİTELLOGENİN GENLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Kışlayan sünelere ait yağ dokusundan oluşturulmuş cDNA kütüphanesinde bulunan bütün vitellogenin contiglerinin taranması sonucunda (115), 00358 numaralı contigin vitellogenin-1 proteinini kodlayan tüm cDNA dizisine sahip olduğu tespit edilmiştir. Diğer contigler arasında tüm cDNA dizisi yapısına en yakın olan diziler tespit edilip, mevcut dizi bilgisinden yararlanılarak, PCR ve RACE PCR yöntemleriyle EmVg2 ve EmVg3 cDNA'larının tam nükleotid dizilerine ulaşılmıştır.

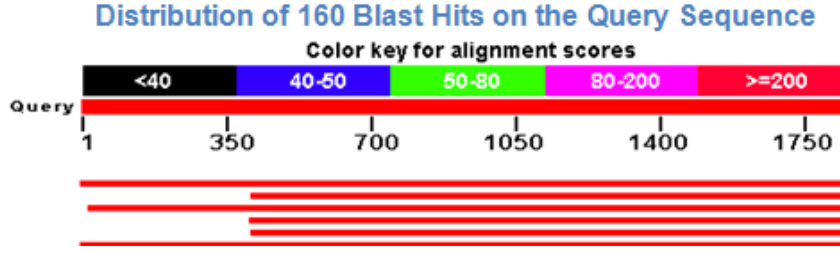
5.1.1. EMVG1 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

5.1.1.1. *EmVg1* Geninin cDNA Kütüphanesinde Taranması

cDNA kütüphanesinde bulunan 00358 numaralı contigin vitellogenin-1 proteini (*EmVg1*) olduğu BLAST programı aracılığı ile tespit edilmiştir (Şekil 5.1). *EmVg1* aminoasit dizisi incelenerek, tahmini proteinin Metionin (M) aminoasidi ile başladığı ve bir sonlanma kodonu (TAG) ile bittiği, 5580 nükleotid ve 1859 aminoasit uzunluğunda olduğu görülmüştür. "Bioinformatic Tools" programı aracılığı ile tahmini protein molekül ağırlığının yaklaşık 210 kDa olduğu gözlenmiştir.

5.1.1.2. *EmVg1*'in BLAST Ve Domain Analizleri

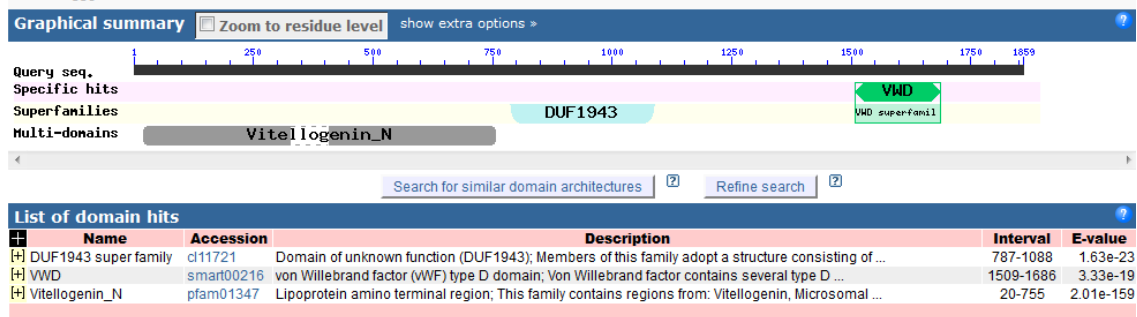
cDNA kütüphanesinde bulunan contig00358'in bir vitellogenin proteini olduğu NCBI BLAST analizi ile tespit edilmiştir. Bu analizle *EmVg1*'in, *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae) *Vg1*'ine %49 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 5.1).



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
vitellogenin-1 (Plautia stali)	1433	1842	95%	0.0	49%	BAA88075.1
vitellogenin-2 (Plautia stali)	1325	1684	95%	0.0	46%	BAA88076.1
vitellogenin-3 (Plautia stali)	1133	1451	94%	0.0	40%	BAA88077.1
vitellogenin (Riptortus clavatus)	1060	1405	94%	0.0	41%	AAB72001.1
vitellogenin (Apolvqus lucorum)	894	1207	94%	0.0	36%	AFW97644.1
vitellogenin (Lethocenus devrollei)	890	1183	94%	0.0	35%	BAG12118.1

Şekil 5.1. EmVg1 proteinin BLAST analizi

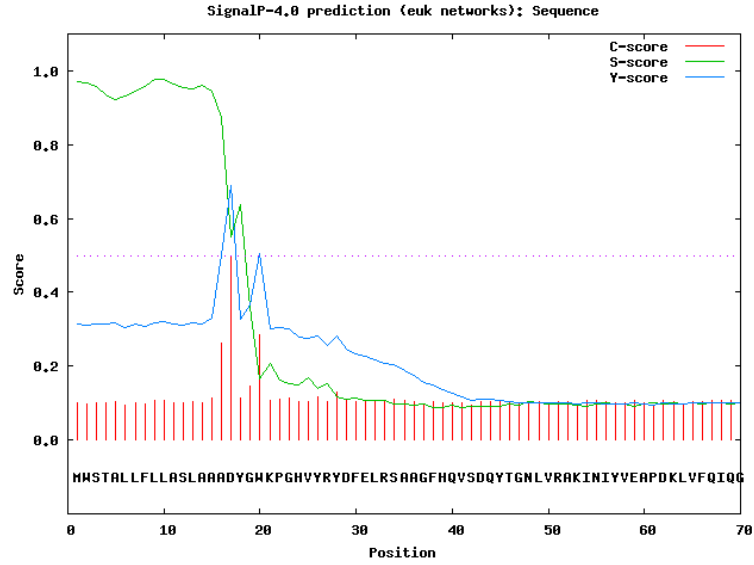
EmVg1’de bulunan vitellogenin domaini, tahmini protein dizisi kullanılarak “Conserved Domains” programı aracılığı ile yapılan analizle tespit edilmiştir (117). EmVg1 Şekil 5.2’de görüldüğü üzere, 20..755 pozisyonunda Vitellogenin domainine, 1509..1686 pozisyonunda ise Von Willebrand factor (VWF) domainine sahiptir.



Şekil 5.2. EmVg1 proteinine ait korunmuş domainler

5.1.1.3. EmVg1 Proteini Sinyal Peptidi Analizi

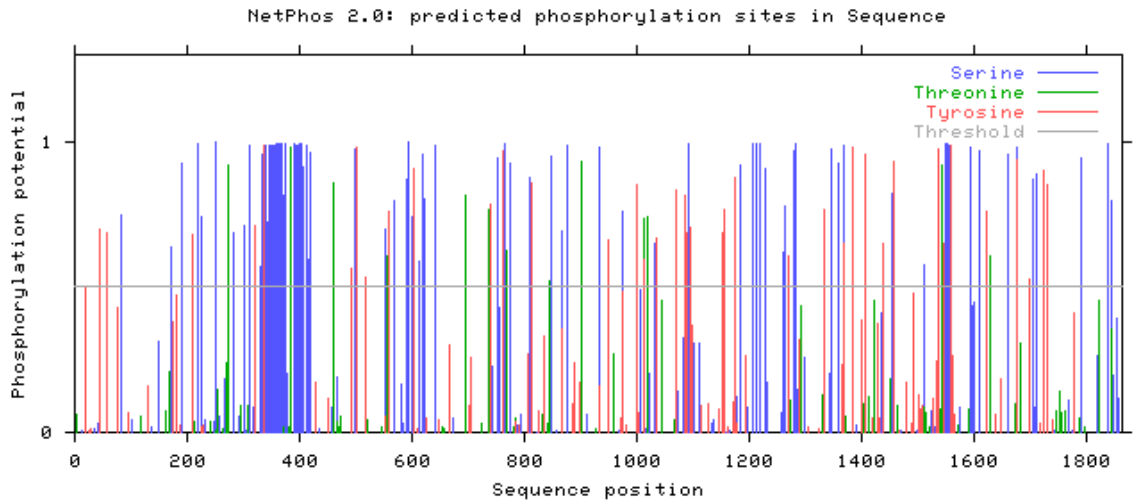
EmVg1 tahmini proteinine ait sinyal peptidinin tahmininin gerçekleştirilmesinde, SignalP 4.0 analiz programı kullanılmıştır (118). Tahmini 16 rezidülek sinyal peptidi tespit edilmiş ve 16. ve 17. rezidüler arasında muhtemel bir kesim noktasının (AAA-DY) olduğu görülmüştür (Şekil 5.3). Sinyal peptid dizisi, aminoasit dizisinin bulunduğu Şekil 5.7’de ayrıca altı çizili olarak gösterilmiştir.



Şekil 5.3. EmVg1 proteini sinyal peptit analizi

5.1.1.4. EmVg1 Proteini Fosforilasyon Potansiyeli

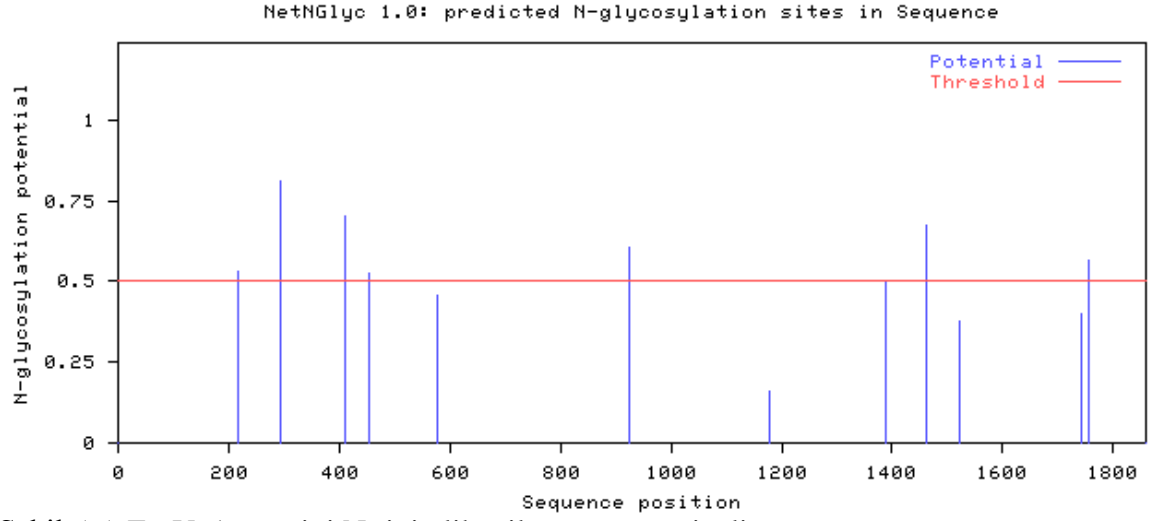
“NetPhos(2)” fosforilasyon tahmin programı EmVg1 proteininde sırası ile 14, 107 ve 41 adet treonin, serin ve tirozin rezidüsünün fosforile olduğunu göstermiştir (119) (Şekil 5.4). Fosforilasyon potansiyeline sahip olan aminoasitler, Şekil 5.7’de ayrıca gösterilmiştir.



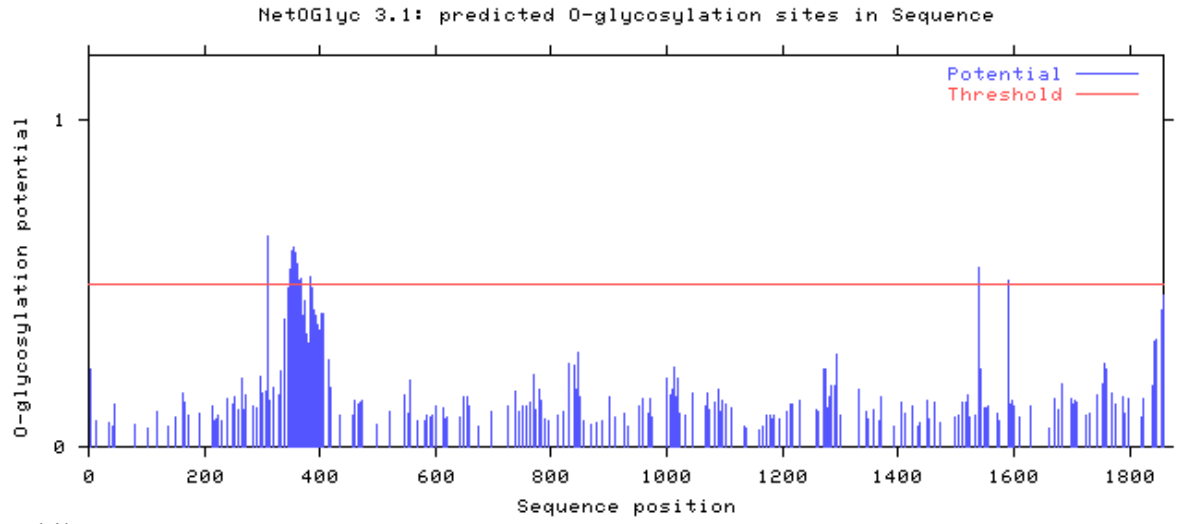
Şekil 5.4. EmVg1 proteinin fosforilasyon potansiyeli

5.1.1.5. EmVg1 Proteini Glikozilasyon Potansiyelleri

“NetNGlyc 1.0” N-tipi glikozilasyon tahmin programı 7 asparajin rezidüsünün N-tipi glikozilasyon potansiyeline sahip olduğunu (120) (Şekil 5.5 ve Şekil 5.7), “NetOGlyc 3.1” O-tipi glikozilasyon tahmin programı ise 4 tane treonin ve 19 tane serin rezidüsünün O-tipi glikozilasyon potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 5.6 ve Şekil 5.7) (121).



Şekil 5.5. EmVg1 proteini N-tipi glikozilasyon potansiyeli

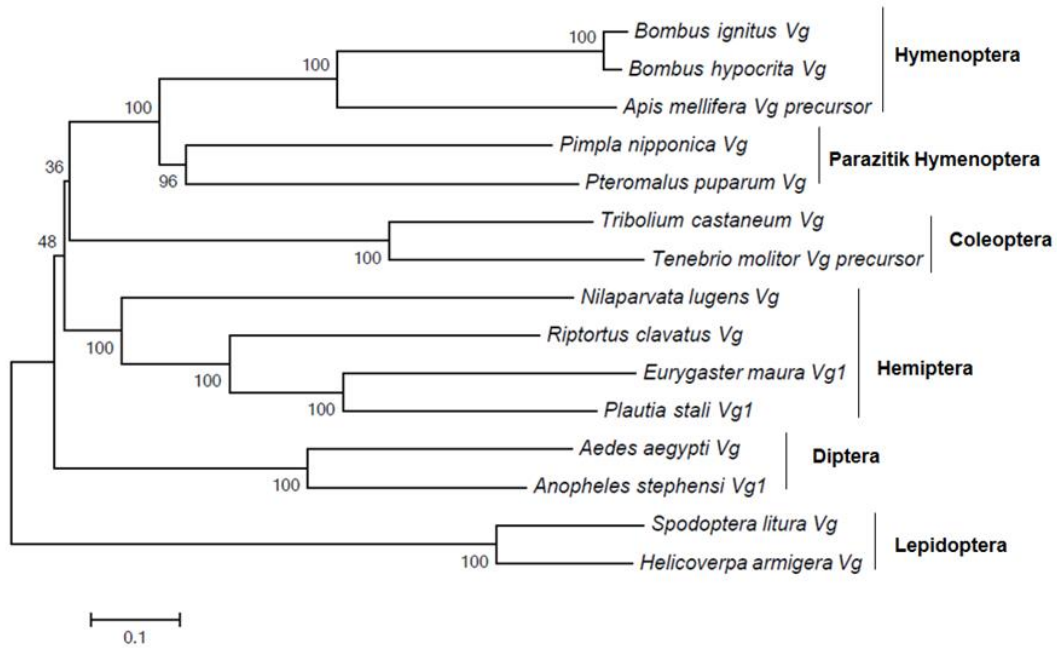


Şekil 5.6. EmVg1 proteini O-tipi glikozilasyon potansiyeli

terminal bölgesinde 872-875. ve 1306-1309. aminoasit dizilerinin KXXR motif yapısında olduğu saptanmıştır (Şekil 5.7 sarı taralı bölge).

5.1.1.6. EmVg1 Filogenetik Analizi

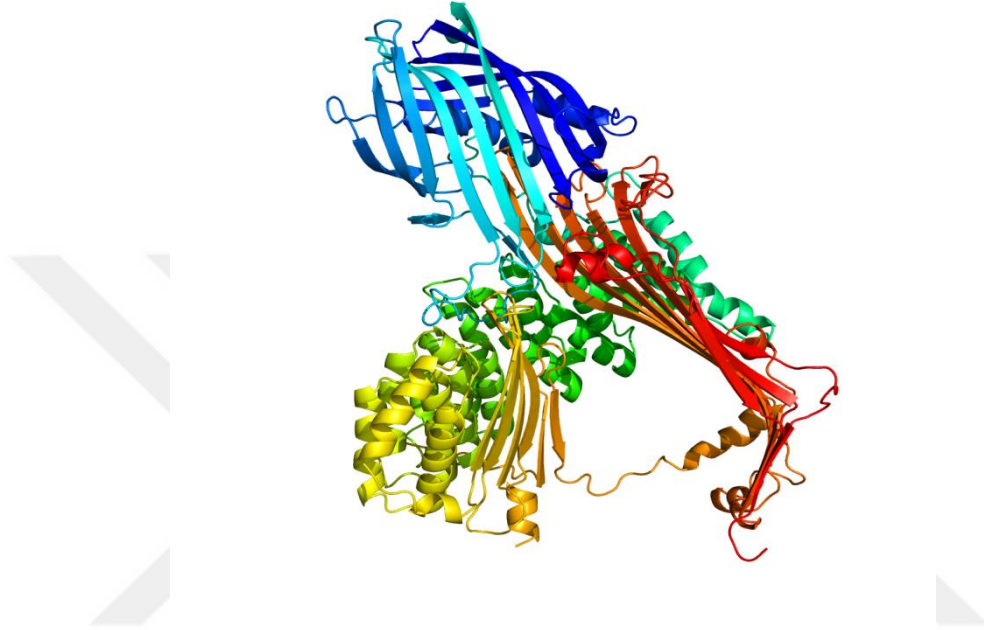
Hymenoptera, Parazitik Hymenoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera ve Lepidoptera takımlarına ait vitellogenin aminoasit dizilerinin kullanımıyla yapılan filogenetik analiz sonucunda iki ana grup ortaya çıkmıştır. Birinci ana dalı Hymenoptera takımından *Bombus ignitus*, *Bombus hypocrita*, *A. mellifera*; Parazitik Hymenopterlerden *Pimpla nipponica*, *Pteromalus puparum*; Coleoptera takımından *Tribolium castaneum*, *Tenebrio molitor*; EmVg1'in de aralarında bulunduğu Hemiptera takımından *Nilaparvata lugens*, *Riptortus clavatus*, *Plautia stali* ve Diptera takımından *Aedes aegypti* ve *Anopheles stephensi* oluşturmuştur. İkinci ana dalı ise Lepidoptera takımından *Spodoptera litura* ve *Helicoverpa armigera* oluşturmuştur. Hemiptera takımına ait vitellogenin proteinleri ayrı bir klad içerisinde toplanırken, EmVg1 ve *Plautia stali* Vg1'inin de bu klad içerisinde aynı nodun altında iki dala ayrıldığı görülmüştür (Şekil 5.8).



Şekil 5.8. EmVg1 proteini filogenetik ağacı: Analizde kullanılan vitellogenin proteinlerinin gen bankası kayıt numaraları *Bombus ignitus* (ACM46019), *Bombus hypocrita* (ACU00433), *Apis mellifera* (NP_001011578), *Pimpla nipponica* (AAC32024), *Pteromalus puparum* (ABO70318), *Tribolium castaneum* (XP_970210), *Tenebrio molitor* (AAU20328), *Nilaparvata lugens* (AEL22916), *Riptortus clavatus* (AAB72001), *Plautia stali* (BAA88075.1), *Aedes aegypti* (AAA18221.1), *Anopheles stephensi* (ABD97990.1), *Spodoptera litura* (ABU68426), *Helicoverpa armigera* (AGL08685.1).

5.1.1.7. EmVg1 Tahmini Proteininin Üç Boyutlu Tahmini Yapısı

EmVg1'in tahmini üç boyutlu yapısı Hidden Markov modellemesini kullanan "Phyre²" programı (122) aracılığı ile analiz edilmiştir. Aminoasit dizisinin 939 rezidüsünün (%51) Protein Data Bank'ına kayıtlı C11shA proteinine gösterdiği %22 oranında benzerlikten yararlanılarak, tahmini üç boyutlu yapısı oluşturulmuştur (Şekil 5.9).



Şekil 5.9. EmVg1 proteininin tahmini üç boyutlu tahmini yapısı

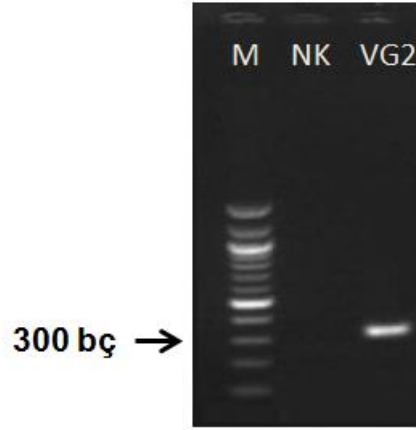
5.1.2. EMVG2 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

5.1.2.1. EmVg2 Geninin cDNA Kütüphanesinde Taranması

E. maura yağ dokusu cDNA kütüphanesinde bulunan 5617 bp uzunluğundaki contig00013'e ait dizi NCBI verileri ile kıyaslandığında, vitellogenin-2 olduğu düşünülen bu proteinin nükleotid dizisinde eksiklik olduğu ve dizinin "dur" kodonuna rastladığı görülmüştür (Şekil 4.5). Bu sebeple ilgili bölgeye özgün primerler tasarlanıp, doğru dizi bilgisine ulaşmak için PCR yapıp dizileme aşamasına gidilmiştir.

5.1.2.2. EmVg2 Geninin Eksik Dizisine Ait PCR ve Dizi Analiz Sonuçları

cDNA sentez ürünü kullanılarak, *EmVg2* genine özgü tasarlanmış primerlerle PCR gerçekleştirilmiştir. Oluşan PCR ürünü %2'lik agaroz jele yüklenmiş, elektroforez işlemi yapıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi aracılığı ile görüntülenmiştir (Şekil 5.10).



Şekil 5.10. *EmVg2* PCR ürünü agaroz jel görüntüsü (M:Markır 100 bç, NK: Negatif kontrol ve *EmVg2*)

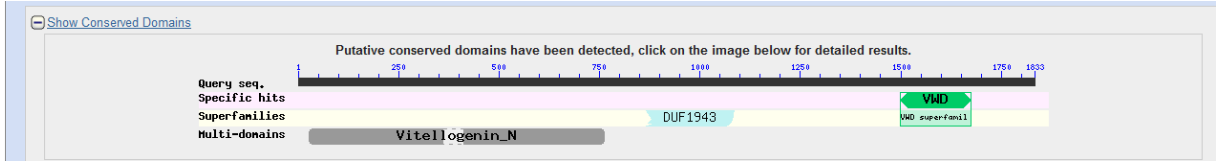
Purifiye edilen PCR ürünü, dizileme hizmeti alınarak, iki yönlü okumalarla analiz edilmiştir. Dizi analizi sonucu ileri ve geri primerlerin yönlerinden elde edilen dizi bilgisi ile eksik nükleotid bulunarak, tüm cDNA dizisi tamamlanmıştır (Şekil 5.11 ve Şekil 5.12). *EmVg2*'nin 5618 bç nükleotid dizi uzunluğuna, tahmini proteininin ise 1833 aminoasite sahip olduğu görülmüştür. Bioinformatic Tools” programı aracılığı ile tahmini protein molekül ağırlığının yaklaşık 207 kDa olduğu saptanmıştır.

Geri Primer	GTGAGCCCGGCCAAATAAACTCCAAAAAT
İleri Primer	GTGAGCCCGGCCAAATAAACTCCAAAAAT
Contig00013	GTGAGCCCGGCCAAATAAACTCCAAA-AT
	***** **

Şekil 5.11. Contig00013’ün dizi analizi sonuçları ile hizalanması

5.1.2.3. *EmVg2* BLAST ve Domain Analizleri

EmVg2 aminoasit dizisinin vitellogenin 2 proteini olduğu BLAST analizi ile saptanmıştır. Analiz sonucu *EmVg2*'nin, *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae) Vg2 proteinine %36 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 5.12).



Sequences producing significant alignments:

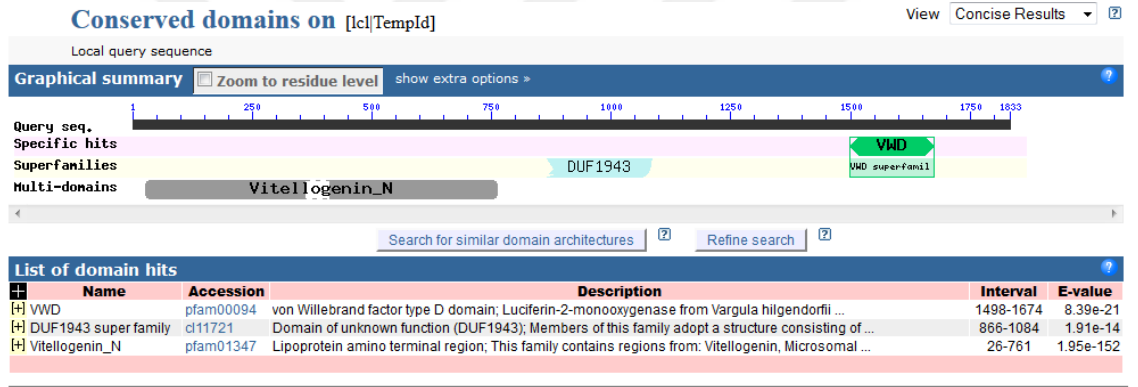
Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenPart](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
vitellogenin-3 [Plautia stali]	1370	1370	76%	0.0	48%	BAA88077.1
vitellogenin-2 [Triatoma infestans]	1106	1106	98%	0.0	36%	AIA09041.1
vitellogenin [Riptortus clavatus]	990	990	77%	0.0	38%	AAB72001.1
vitellogenin [Homalodisca vitripennis]	898	898	98%	0.0	32%	AAZ06771.1

Şekil 5.12. EmVg2 proteinine ait BLAST analizi

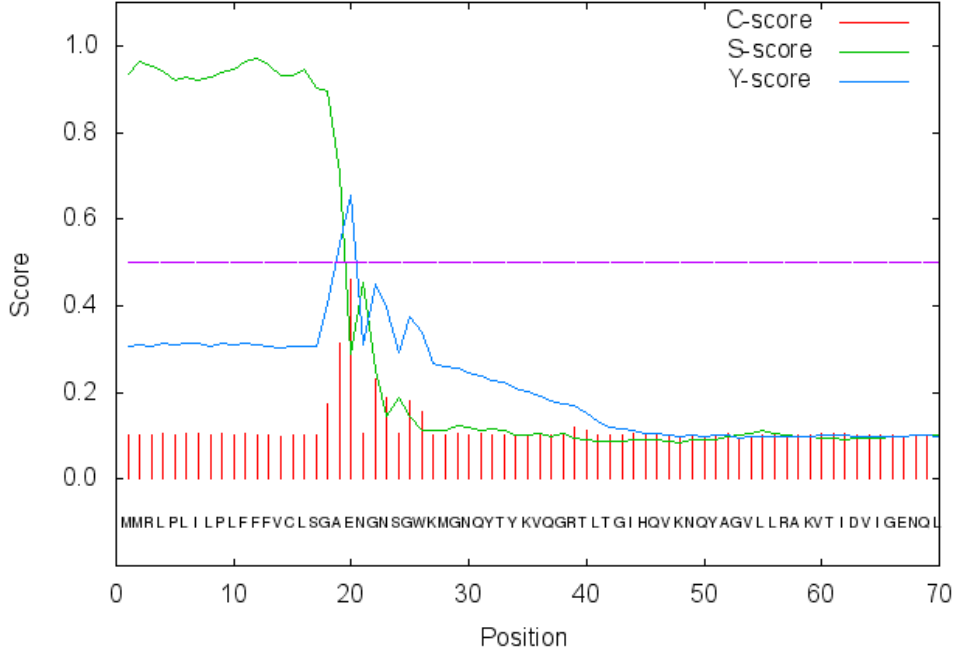
“Conserved Domains” programı aracılığı ile EmVg2’nin, 26...761 pozisyonunda vitellogenin domain profiline, 1498..1674 pozisyonunda ise Von Willebrand factor (VWF) domain profiline sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 5.13).



Şekil 5.13. EmVg2 proteinine ait korunmuş domainler

5.1.2.4. EmVg2 Proteini Sinyal Peptid Analizi

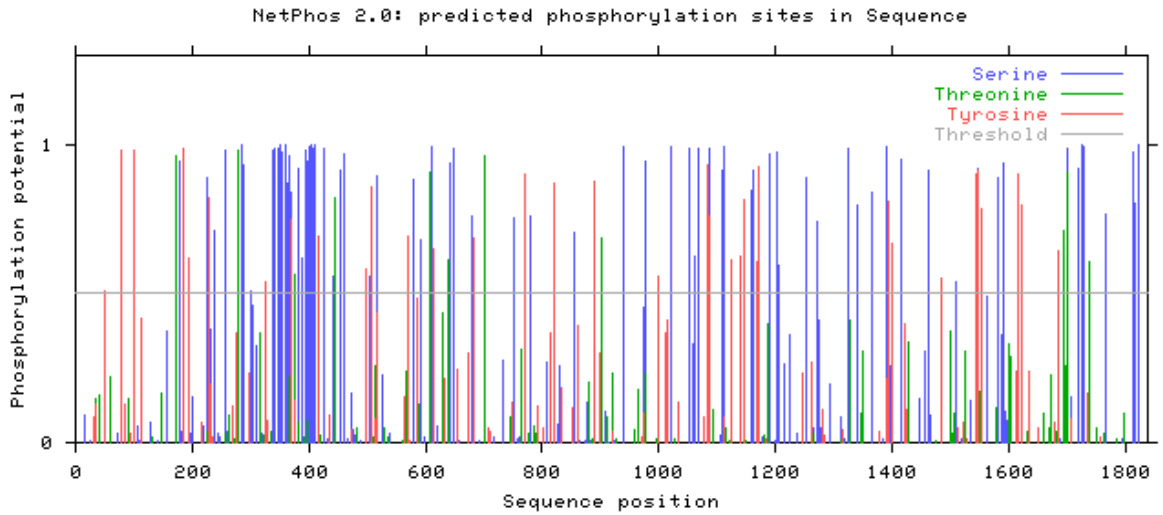
EmVg2’nin sinyal peptidinin tahminine yönelik “SignalP 4.0” programı (118) aracılığı ile yapılan analizde, 19 rezidürlük tahmini sinyal peptidi tespit edilmiştir (Şekil 5.14). Sinyal peptid dizisi aminoasit dizisinin bulunduğu Şekil 5.17’de altı çizili olarak gösterilmiştir.



Şekil 5.14. EmVg2 proteini sinyal peptit analizi

5.1.2.5. EmVg2 Proteini Fosforilasyon Potansiyeli

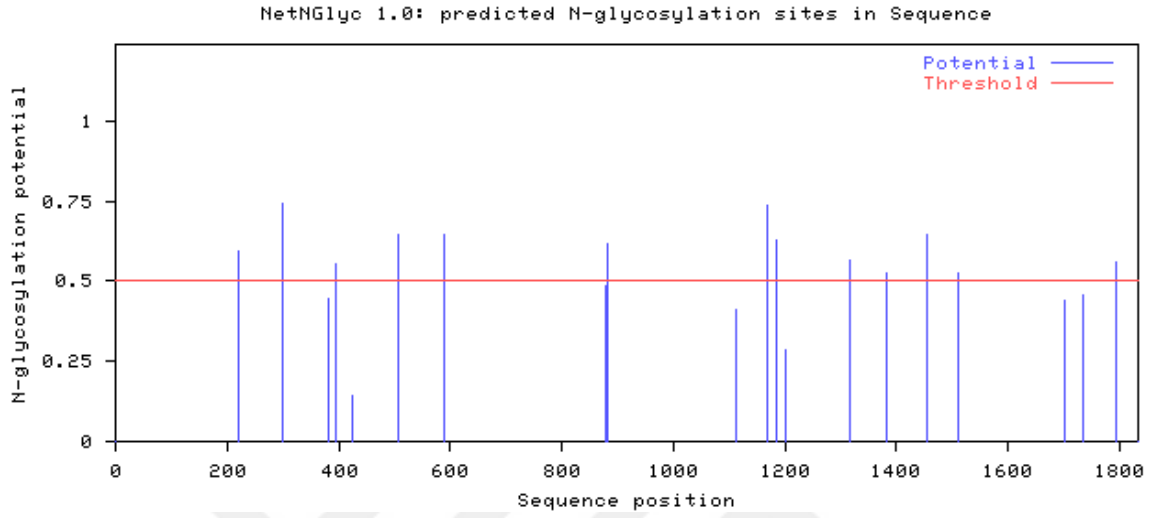
NetPhos(2) fosforilasyon tahmin programı (119) aracılığı ile yapılan fosforilasyon potansiyeli analizi sonucunda, EmVg2’de sırasıyla 11, 82, 34 adet treonin, serin ve tirozin aminoasitlerinin fosforile olduğu saptanmıştır (Şekil 5.15). Fosforilasyon potansiyeline sahip olan aminoasitler Şekil 5.17’de ayrıca gösterilmiştir.



Şekil 5.15.EmVg2 proteininin fosforilasyon potansiyeli

5.1.2.6. EmVg2 Glikozilasyon Potansiyeli

“NetNGlyc 1.0” N-tipi glikozilasyon tahmin programı(120) EmVg2’nin 13 asparajin rezidüsünün N-tipi glikozilasyon potansiyeline sahip olduğunu gösterirken, EmVg2’de O-tipi glikozilasyon potansiyeli saptanamamıştır (121) (Şekil 5.16 ve Şekil 5.17).



Şekil 5.16. EmVg2 proteininin N-tipi glikozilasyon potansiyeli

>EmVg2

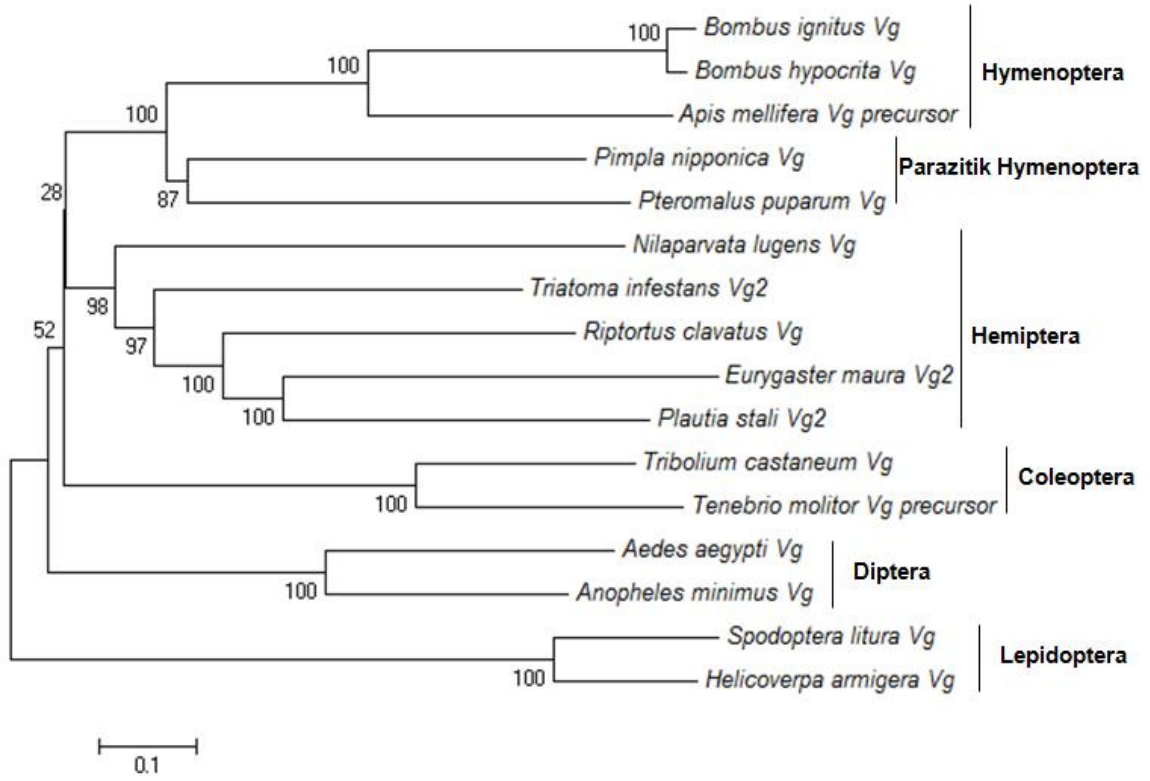
MMRLPLILPLFFVCLSGAENGNSGWKMGNQYTYKVQGRTLTGIHQVKNO**Y**AGVLLRAKVT
IDVIGENQLSLQVKDAE**Y**ADVNRYLVEGWVTYIPEEEVE**Y**KRLALQSSACQVYLQKGVVQR
MVVEESLPTWELNFKAIASQFQVDTQAVNLKKS IWNVPNGEQQNGVF**T**KEG**S**VHGI SE
TL**Y**QINPMPE**Y**LVQSSPGLVPLPHLQGDGQVYNIKSR**N**FTN**S****Y**RDVYSYGMD**S**HGGWSA
GSNNLGDLLQRT**S**GSRIVITGDLKKYTIQYTET**T**EKIVVAP**S**MSDKRKGIAISYLN**S**LES
VIPSSGQPPLITSPRTVNSLA**Y**EYHRNHHTRN**S**AE**S**SGE**S**SG**S**SH**S**ASDEKKME**S**FKD**S**KT
S**Y**SAEWI**W****T**NYDVKN**S**STEMKLI**S**NTDEND**S**ST**S**SSSS**S**HED**S**SI**S**SSHEE**Y**PPSHTNINES**S**PF
NAFSIHFLFGQE**S**SHAEO**T**VEKIIKL**S**SKIGH**S**IINPKNIFSDHLLSYFSILSGVTAANSQ
QLRQAVEKI**Y**PK**V**SDVE**Y**NR**T**ETQNY**S**SWALRDALSIAGTGPALVTLNSMIKEGKLQGE
EAAALLAMLPTNAAYPTTE**Y**MNYFFEMVKS**S**DEVQSQR**Y**LN**S**SAIFAFSELVRKGQVDRA**T****S**
KHR**Y**PIHLWSAKHRAEVTEKYIPYFKDRL**T**SAMAAGD**S**VKAQVYIRSLGNFAHPRILAVFE
PYLEGKLPAS**D****Y**QRFLMVDSL NIMVRVHPD**T**ARPVLYRIYQNEGENSFVRVAAVVQLMKAK
PSPQLLQHMAMRTNYDH**S**SKHVNAIKSSILTAVKGD**Y**EADPELITAARS**S**AINFLT TENYGT
QHCRNILRAYIDKHRSNMHYRSNVA**Y**IHGPGDRISSAILYSIQKINGI IHEPEVNQYHLS
SSQDLYNLLWSQLQEWKNHQSNSET**T**NGSDFT**Y**QKIHEALNAKY**E**T**Q**KQVEGSLVITLSG
AIRYFTFDSHTIEQLPDFLRQI**S**SRKLOEGINFEHGKFFNQETVELRFPTAMGGGLFSYSYRT
P**S**FRHLQVKGKGHFEQNKPT**G**YNMFPFNAGINGKYHYLETNQRR**S**MIAFTFGQORYVAGLE
RIAQVNLPLEGELS**S**SGKNSAIK**V**SLKPR**S**VDNEEQNHFQYRENV**Y**TS**Y**QDVEDLTPILGG
PHVKLVESAP**S**SKSYNETFGKEHTG**Y**IQVEI**R**NER**N**LKDI**Y**SVFKDLK**Y**MPTDILNMM**S**QL
DE**S**MGNK**Y**YN**S**YVAPNSATIILAY**N**TTSEM**S**EPGQIN**S**KNL**S**HR**S**MRRLKNHDESNNMD
QPSAVNNRMEALLRNANSGVQNGKAYVLDAS**V**SFDENPNKGQYSLTVAHAES**S**PVSELSRYL
VYYRGIPIQESRNAQANQLELQLNIIKKPVLSTLNY**N**HSINMKPAS**T**VEAKINFGKKE**S**EI
LIKGTAERTEERRNFVEKDPM**S**VLCKEQMEQGFQWQYPC**Q**NASLAAS**S**SDK**Y**QLSVK**Y**NNI
PQFVNRVANKIH**S**SIGRYFAYEYNTENAFDAKNPKGQVNVAAKFSEDFQFL**N**VSIEG**S**ISS
HFKDIELNDITVPFVPWLI**Y**EKQI**N**RIARGVCTMDAATVTT**S**NR**T**YPLEMSN**C**YHVL**T**
TYFPKLEQGSQHVDQEH**Y**KK**S**DY**N**TK**Y**FAILAKEIDSNKKVIKVVVLGENVV**T**LE**P**S**D**NDGI
SVN**S**NGESIGISEGTITRWKAGQOYLEA**Y**IQPGNK**Y**VVLHFLNHG**T**KV**Y**YDG**H**RAQLIIPN
RYLNRVR**GLCG**TFDGE**P**VNDFTTTNN**C**VL**R**DYKQFTAS**Y**AISDG**Q**CT**M**PET**T**S**Q**ENASCYT
KGVKLV**D**V**S**DSEAGR**S**SSKEEVHAY**N**TIKPLIKNPQGCTNHKVLIDYFEGM**T**C**F**S**I**K**P**Q
VACQPNCKPQGQIEKTIQFHCL**N**ESSATRH**W**VAKVKGAN**P**DF**S**Q**K**SN**R**Q**M**S**V**KL**P**E**K**CV
PNP

Şekil 5.17. EmVg2 proteini moleküler karakterizasyonu: Proteinin sinyal peptidi (altı çizili koyu), fosforile (serin rezidüleri mavi taralı, tirozin kırmızı taralı, treonin yeşil taralı) ve N-tipi glikozile (asparajin rezidüleri mor taralı) olarak tahmin edilmiş rezidüleri

EmVg2'nin aminoasit dizisi incelendiğinde, özellikle 395. ve 411. aminoasitler arasında bulunan poliserin bölgesi dikkat çekmektedir (Şekil 5.17 mavi taralı serinrezidüleri). İki adet RXXR motifine 1129-1131. ve 1491-1492. pozisyonlarında rastlanmıştır (Şekil 5.17 pembe taralı). EmVg2 dizisinin C-terminal bölgesinde 1654-1657. pozisyonunda böcek vitellogenin dizilerinin tipik korunmuş motifi olan GLCG tetrapeptidi (Şekil 5.17 kahverengi taralı bölge) ve bu motifin 14 aminoasit yukarısında ise DGXR motifinin yer aldığı görülmüştür (Şekil 5.17 gri taralı bölge).

5.1.2.7. EmVg2 Filogenetik Analizi

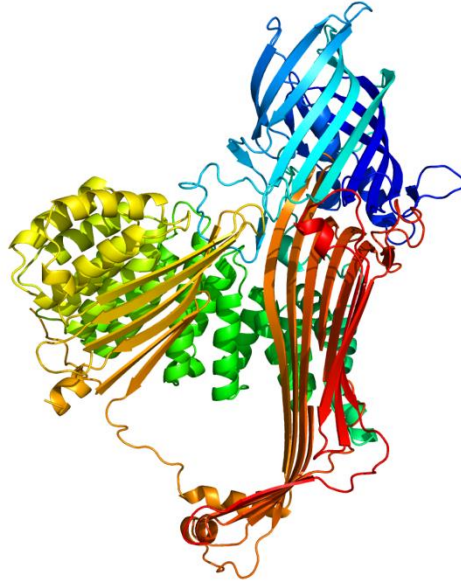
Filogenetik analiz Hymenoptera, Parazitik Hymenoptera, Hemiptera, Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera takımlarına ait vitellogenin ve vitellogenin 2 aminoasit dizilerinin kullanımıyla gerçekleştirilmiş ve analiz sonucunda iki ana dal ortaya çıkmıştır. Birinci ana dalı Hymenoptera takımından *Bombus ignitus*, *Bombus hypocrita*, *A. mellifera*; Parazitik Hymenoptera takımından *Pimpla nipponica*, *Pteromalus puparum*; Hemiptera takımından *Nilaparvata lugens*, *Riptortus clavatus* vitellogenin proteinleri, *Triatoma infestans*, *E. maura*, *Plautia stali* vitellogenin-2 proteinleri; Coleoptera takımından *Tribolium castaneum*, *Tenebrio molitor* ve Diptera takımından *Aedes aegypti* ve *Anopheles minimus* vitellogenin proteinleri oluşturmuştur. Lepidoptera takımından oluşan ikinci ana dalı ise *Spodoptera litura* ve *Helicoverpa armigera* vitellogenin proteinleri meydana getirmiştir. Hemiptera takımına ait vitellogenin proteinleri ayrı bir klad içerisinde toplanırken, *Plautia stali* Vg2'si ve EmVg2 bu klad içerisinde aynı nodun altında iki dala ayrılmıştır (Şekil 5.18).



Şekil 5.18. EmVg2 proteini filogenetik ağacı: Analizde kullanılan vitellogenin proteinlerinin gen bankası kayıt numaraları *Bombus hypocrita* (ACU00433), *Bombus ignitus* (ACM46019), *Apis mellifera* (NP_001011578), *Pimpla nipponica* (AAC32024), *Encarsia formosa* (AAT48601), *Pteromalus puparum* (ABO70318), *Tribolium castaneum* (XP_970210), *Tenebrio molitor* (AAU20328), *Anopheles minimus* (AHN13887.1), *Nilaparvata lugens* (AEL22916), *Riptortus clavatus* (AAB72001), *Plautia stali* (BAA88076.1), *Spodoptera litura* (ABU68426), *Helicoverpa armigera* (AGL08685.1).

5.1.2.8. EmVg2 Tahmini Proteininin Üç Boyutlu Tahmini Yapısı

EmVg2'in tahmini üç boyutlu yapısı "Phyre²" programı (122) kullanılarak oluşturulmuştur. EmVg2 aminoasit dizisinin Protein Data Bank'ına kayıtlı C11shA proteinine %17 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 5.19).



Şekil 5.19. EmVg2 tahmini proteini tahmini üç boyutlu tahmini yapısı

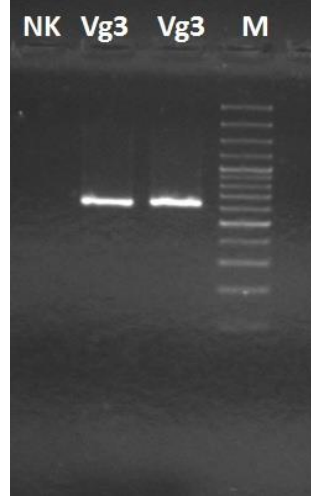
5.1.3. *EMVG3* GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

5.1.3.1. *EmVg3* Geninin cDNA Kütüphanesinde Taranması

E. maura yağ dokusu cDNA kütüphanesinde bulunan 3835 bç ve 1363 bç uzunluklarındaki 00092 ve 00385 numaralı contiglere ait nükleotid dizilerinin NCBI veri tabanında araştırılması sonucunda, her iki dizinin de vitellogenin-3 genine ait olduğu saptanmıştır. İki gen dizisinin birleştirilmesi sonucunda eksik kalan nükleotid dizileri PCR ve RACE PCR teknikleri ile tamamlanarak *EmVg3* genine ait tüm cDNA dizi bilgisine ulaşılmıştır.

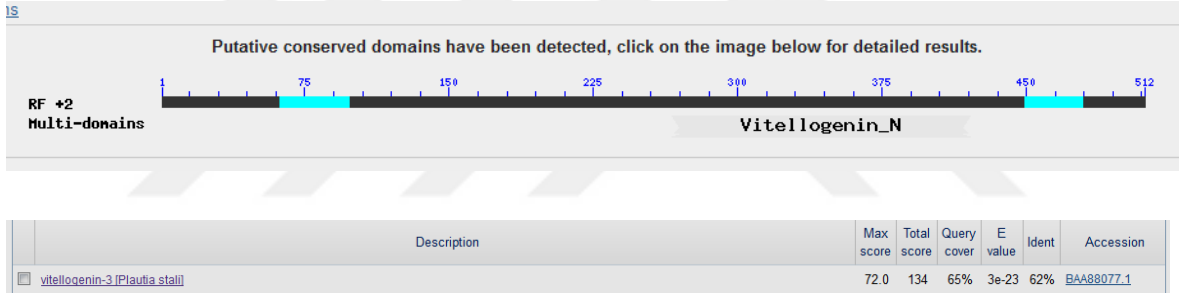
5.1.3.2. *EmVg3* Geninin Eksik Dizisine Ait PCR ve Dizi Analiz Sonuçları

EmVg3 dizisine ait 00385 ve 00092 numaralı contiglerin birleştirilmesi için (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8) yapılan PCR'dan elde edilen ürünler, %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 5.20).



Şekil 5.20. *EmVg3* PCR jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol, *EmVg3*, *EmVg3*, M: Markır 100 bç)

PCR ürününün 500 ile 600 bç arasında bant verdiği, jel görüntüleme sistemi aracılığı ile görülmüştür. Saflaştırılan PCR ürünlerinden gerçekleştirilen dizi analizi sonucunda elde edilen dizinin, Vg3'e ait olduğu BLAST analizi ile tespit edilmiştir (Şekil 5.21).



Şekil 5.21. Contig00385 ve contig00092 arası nükleotid dizisi BLAST görüntüsü

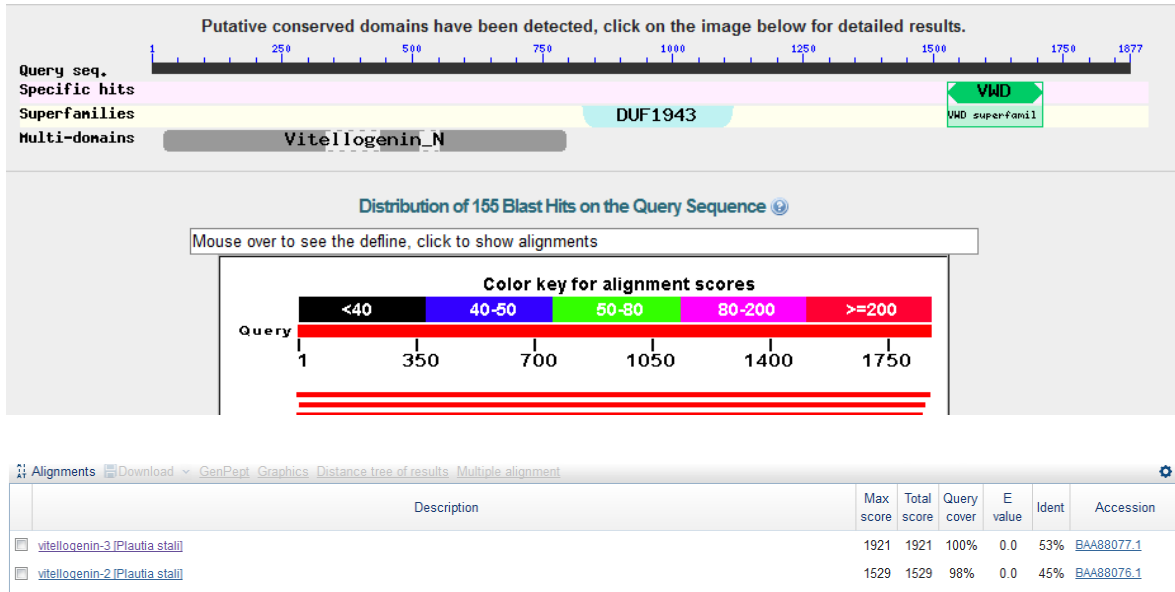
5.1.3.3. *EmVg3* RACE PCR ve Dizi Analiz Sonuçları

EmVg3 cDNA'sının tüm dizisini elde etmek için RACE PCR yöntemi uygulanmıştır. 5' ve 3' yönlerinde elde edilen PCR ürünleri pürifiye edildikten sonra, dizi analizi hizmeti alınarak tüm cDNA dizisi tamamlanmıştır. *EmVg3* tahmini proteininin 1877 aminoasit uzunluğunda, molekül ağırlığının ise yaklaşık 210 kDa olduğu tespit edilmiştir.

5.1.3.4. *EmVg3* BLAST ve Domain Analizi

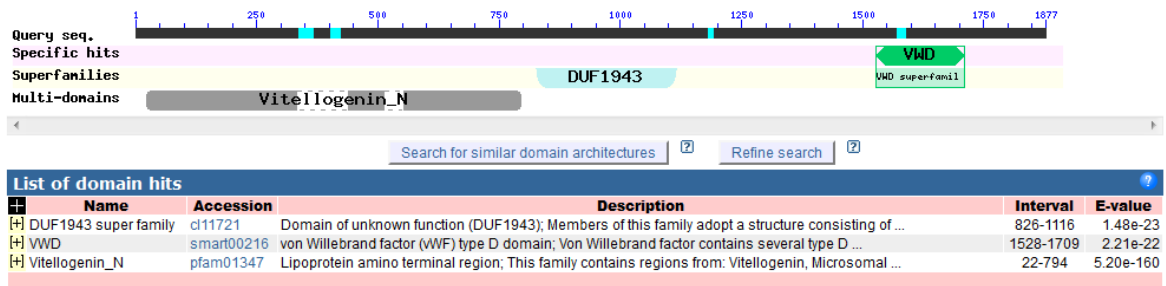
PCR VE RACE PCR yöntemleri kullanılarak tamamlanmış nükleotid dizisi aracılığı ile ulaşılan aminoasit dizisinin, vitellogenin-3 proteinine ait olduğu BLAST analizi ile

saptanmıştır. Analiz sonucunda EmVg3'ün *Plautia stali* Vg3'üne %53 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 5.22).



Şekil 5.22. EmVg3 proteininin BLAST analizi

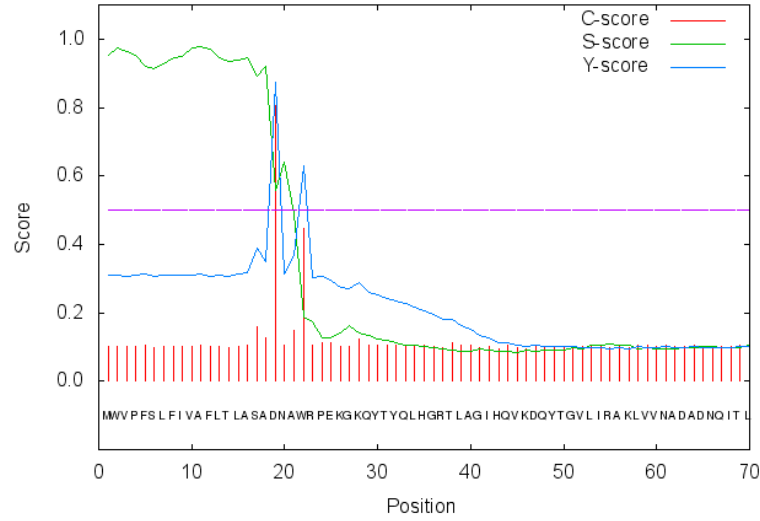
EmVg3'te “Conserved Domains” analiz programı ile 22..794 pozisyonunda vitellogenin domaininin, 1528..1709 pozisyonunda ise Von Willebrand factor (VWF) domaininin yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 5.23).



Şekil 5.23. EmVg3 proteinine ait korunmuş domainler

5.1.3.5. EmVg3 Proteini Sinyal Peptid Analizi

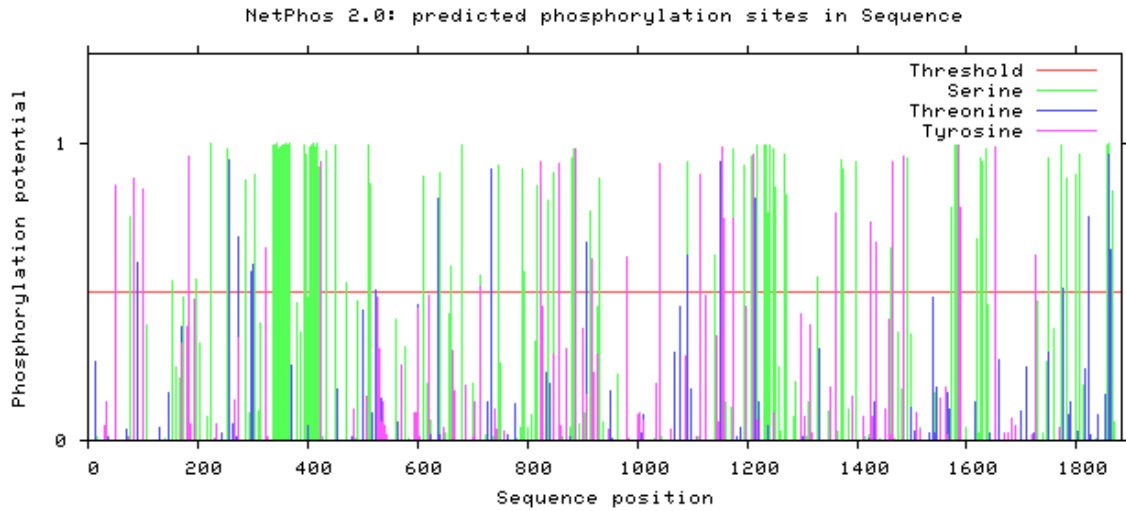
EmVg3'e ait sinyal peptidinin tahminine yönelik yapılan analiz, “SignalP 4.0” programı (118) ile gerçekleştirilmiş ve tahmini 18 rezidürlük sinyal peptidi tespit edilmiştir (Şekil 5.24). Sinyal peptid dizisi EmVg3 aminoasit dizisinin bulunduğu Şekil 5.28'de altı çizili olarak gösterilmiştir.



Şekil 5.24. EmVg3 proteininin sinyal peptit analizi

5.1.3.6. EmVg3 Proteini Fosforilasyon Potansiyeli

“NetPhos(2)” fosforilasyon tahmin programı (119) EmVg3’te sırası ile 17, 112 ve 29 adet treonin, serin ve tirozin rezidüsünün fosforilasyon potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 5.25). Fosforilasyon potansiyeline sahip aminoasitler Şekil 5.28’de ayrıca gösterilmiştir.

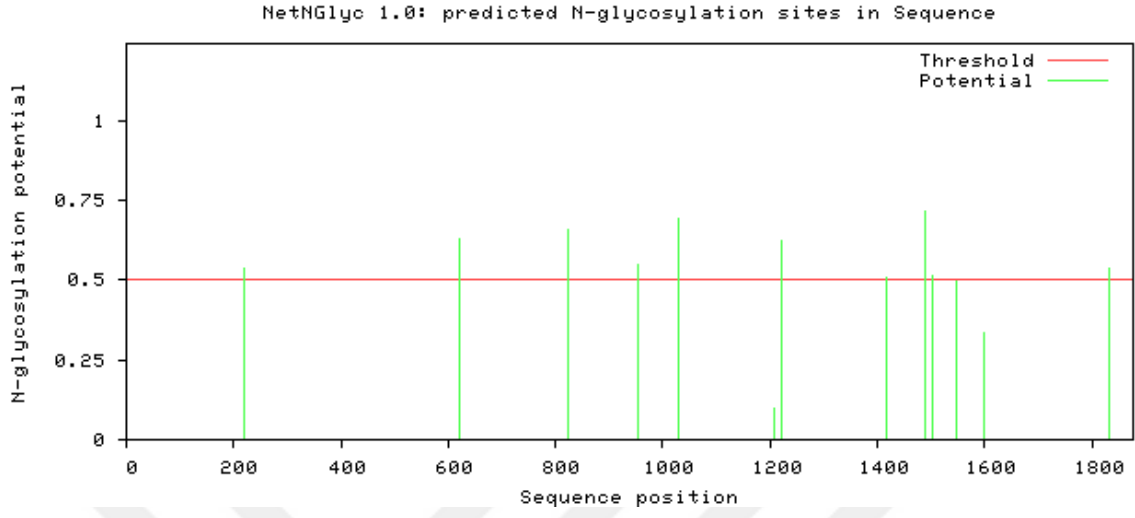


Şekil 5.25. EmVg3 proteini fosforilasyon potansiyeli

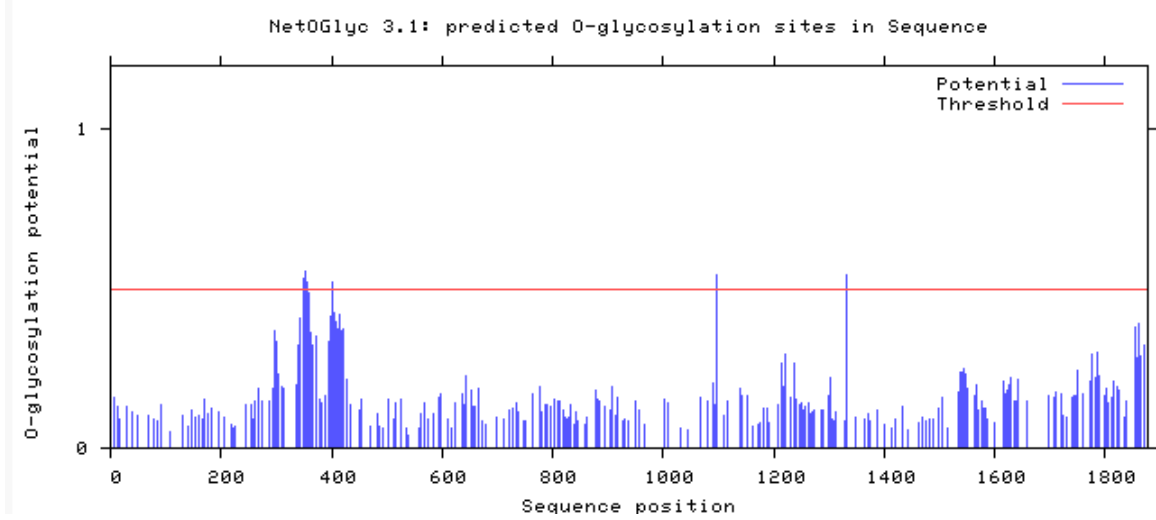
5.1.3.7. EmVg3 Proteini Glikozilasyon Potansiyelleri

“NetNGlyc 1.0” N-tipi glikozilasyon tahmin programı(120) 10 asparajin rezidüsünün N-tipi glikozilasyon potansiyeline, “NetOGlyc 3.1” O-tipi glikozilasyon tahmin programı

(121) ise 3 treonin ve 9 serinin O-tipi glikozilasyon potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 5.26, Şekil 5.27 ve Şekil 5.28).

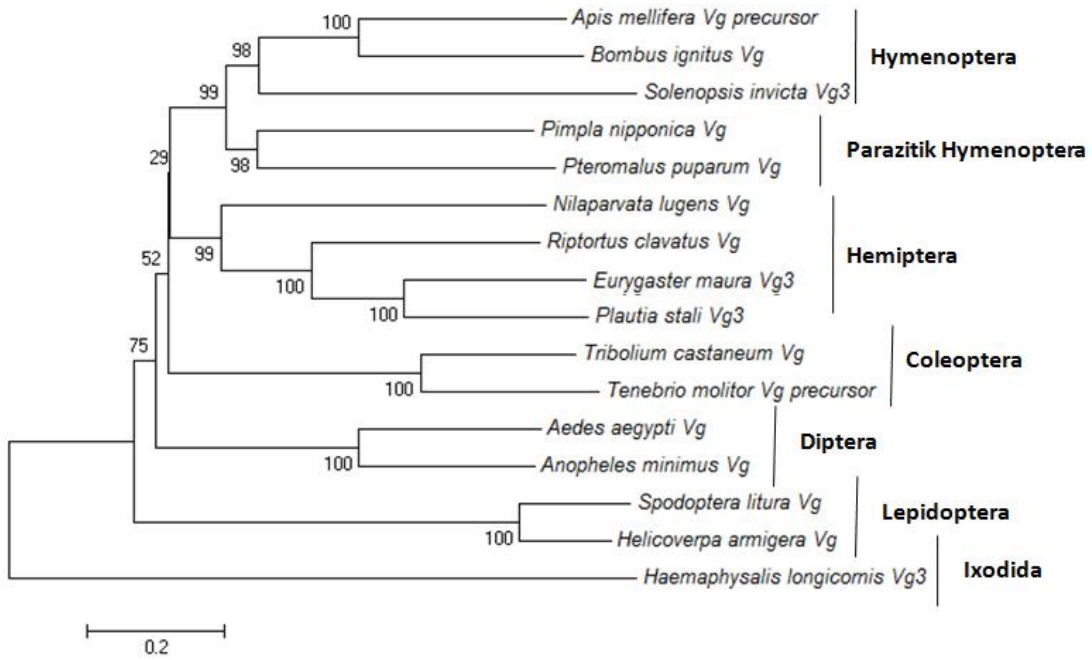


Şekil 5.26. EmVg3 N-tipi glikozilasyon potansiyeli



Şekil 5.27. EmVg3 O-tipi glikozilasyon potansiyeli

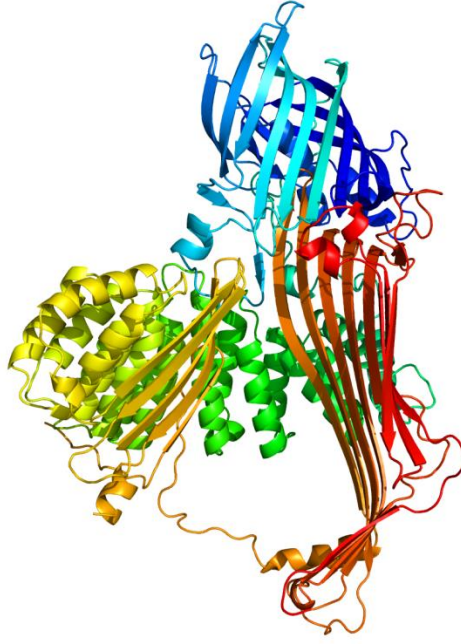
takımından *Nilaparvata lugens*, *Riptortus clavatus* vitellogenin, *Plautia stali* vitellogenin 3 proteinleri; Coleoptera takımından *Tribolium castaneum*, *Tenebrio molitor*; Diptera takımından *Aedes aegypti* ve *Anopheles minimus*; Lepidoptera takımından ise *Spodoptera litura* ve *Helicoverpa armigera* vitellogenin proteinleri meydana getirmiştir. Ixodida takımından *Haemaphysalis longicornis* vitellogenin 3 proteininin ise ikinci ana dala ayrıldığı tespit edilmiştir. Hemiptera takımına ait vitellogenin proteinleri ayrı bir klad içerisinde toplanmış ve *Plautia stali* Vg3'ü ile EmVg3'ün bu klad içerisinde aynı nodun altında iki dala ayrıldığı saptanmıştır (Şekil 5.29).



Şekil 5.29. EmVg3 proteini filogenetik ağacı: Analizde kullanılan vitellogenin proteinlerinin gen bankası kayıt numaraları *Apis mellifera* (NP_001011578), *Bombus ignitus* (ACM46019), *Solenopsis invicta* (AAY22961.1), *Pimpla nipponica* (AAC32024); *Pteromalus puparum* (ABO70318), *Nilaparvata lugens* (AEL22916), *Riptortus clavatus* (AAB72001), *Plautia stali* (BAA88077.1), *Tribolium castaneum* (XP_970210), *Tenebrio molitor* (AAU20328), *Anopheles minimus* (AHN13887.1), *Spodoptera litura* (ABU68426), *Helicoverpa armigera* (AGL08685.1), *Haemaphysalis longicornis* (AB359902.1).

5.1.3.9. EmVg3 Tahmini Proteininin Üç Boyutlu Tahmini Yapısı

“Phyre²” programı (122) kullanılarak EmVg3 aminoasit dizisinin C11shA protein modeline %18 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiş ve EmVg3'ün tahmini üç boyutlu yapısı oluşturulmuştur (Şekil 5.30).

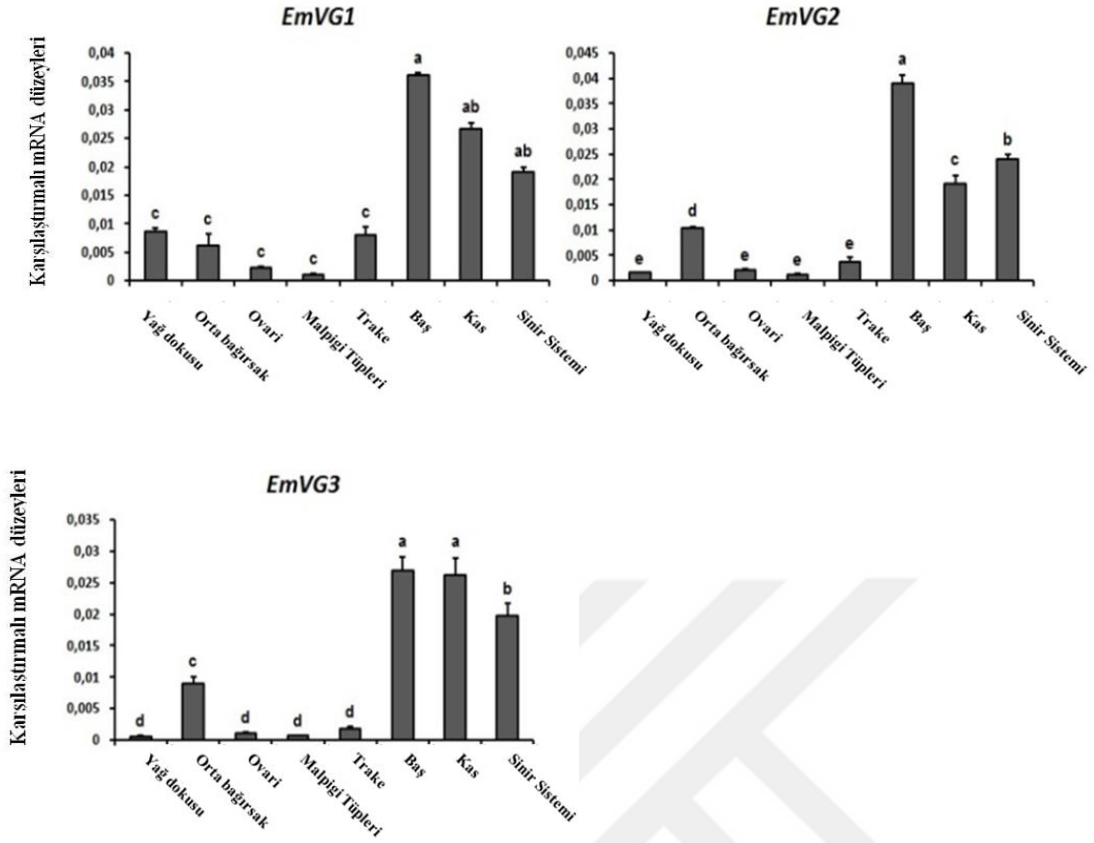


Şekil 5.30. EmVg3 tahmini proteininin üç boyutlu tahmini yapısı

5.2. VİTELLOGENİN GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

5.2.1. SÜNENİN FARKLI DOKU VE ORGANLARINDAKİ EMVG'LERİN İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Süne Vg genlerine spesifik primerlerle, yağ dokusu, orta bağırsak, ovarı, malpigi tüpleri, trake, baş ve sinir sistemi gibi çeşitli doku ve organlara RT-qPCR tekniği uygulanmıştır. Elde edilen verilerin analizinde mutlak ölçüm yöntemi kullanılarak, vitellogenin ifade profilleri oluşturulmuştur (Şekil 5.31).



Şekil 5.31. Sünenin farklı doku ve organlarındaki *EmVg* ifade profilleri

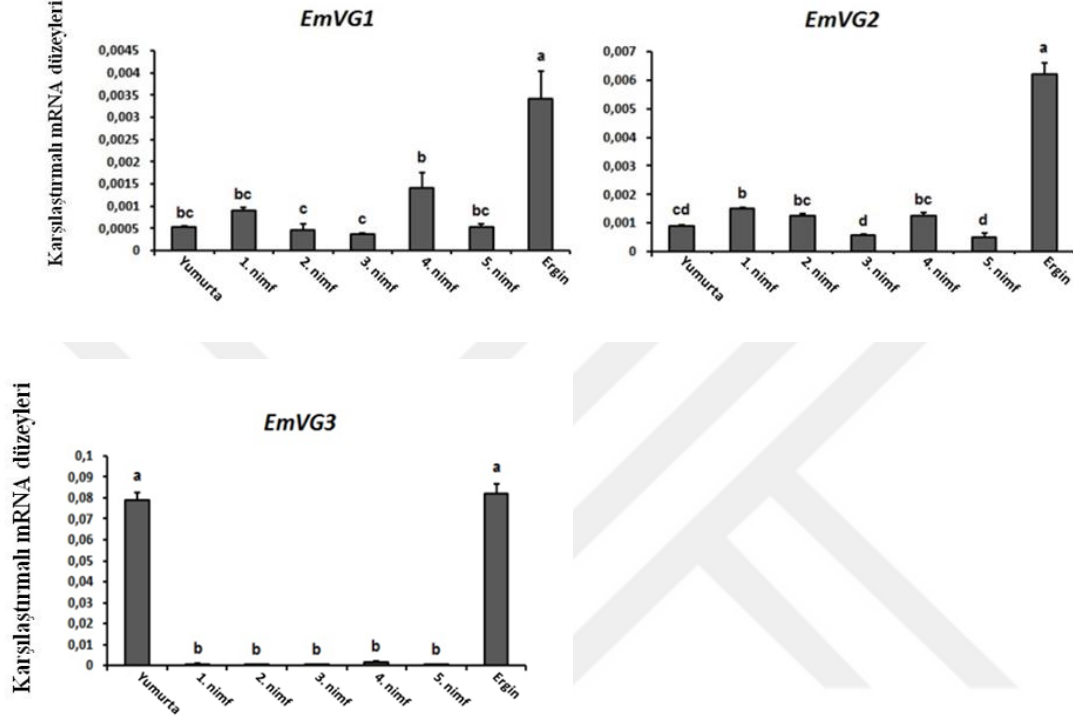
EmVg1 geninin en fazla ifade olduğu organ baştır. Başa göre malpigi tüpleri, ovari, mide, trake, yağ dokusu, sinir sistemi ve kas sistemindeki ifade düzeyleri yaklaşık olarak sırasıyla 35.54, 3.96, 1.96, 1.71, 1.65, 1.21 ve 1.09 kat daha az bulunmuştur (Şekil 5.31).

EmVg2 geninin en fazla ifade olduğu organ baş olarak tespit edilmiştir. Diğer dokulardaki ifade düzeyleri başa göre sinir sistemi, kas sistemi, orta bağırsak, trake, ovari, yağ dokusu ve malpigi tüplerinde yaklaşık olarak sırasıyla 1.15, 1.23, 1.55, 2.72, 4.83, 7.84 ve 14.87 kat daha az bulunmuştur(Şekil 5.31).

Baş *EmVg3* geninin en fazla ifade olduğu organ olarak belirlenmiştir. İstatistiksel açıdan baş ve kas sistemi arasındaki kat sayısının 1 olduğu, dolayısı ile her ikisinde ifade düzeylerinin eşit olduğu saptanmıştır. Baş ve kasa kıyasla diğer doku ve organlardaki ifade düzeyleri sinir sisteminde 1.08, orta bağırsakta 1.37, trakede 3.03, ovaride 4.63, malpigi tüplerinde 10.39 ve yağ dokusunda 17.87 kat daha az bulunmuştur (Şekil 5.31).

5.2.2. SÜNENİN FARKLI GELİŞME DÖNEMLERİNDEKİ *EMVG* İFADE DÜZEYLERİ

Sünenin farklı gelişme dönemlerine ait yumurta, beş nimf dönemi ve ergin bireylerdeki vitellogenin genlerine ait ifade profilleri Şekil 5.32’de sunulmuştur:



Şekil 5.32. *EmVg* genlerinin farklı gelişme dönemlerindeki ifade profilleri

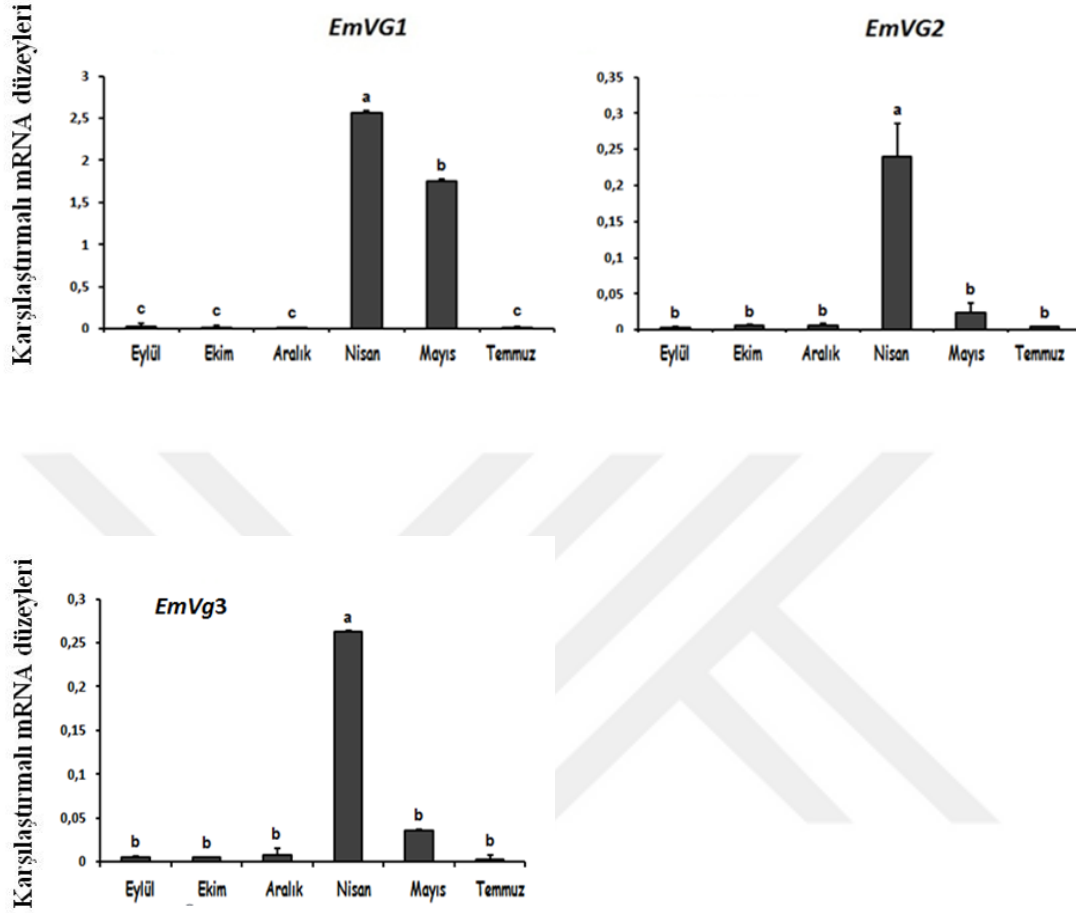
Sünenin farklı dönemlerine ait *EmVg1* ve *EmVg2* genlerinin ifade profilleri, bu genlerin süne yumurtadan ergine dek, sünenin tüm biyolojik döngüsü süresince ifade olduklarını göstermiştir. RT-qPCR analizleri üç genin ifade düzeylerinin özellikle ergin dönemde en fazla olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte *EmVg1*'in 4. dönem nimfteki, *EmVg3*'ün ise yumurta dönemindeki ifadesi dikkate değer bulunmuştur (Şekil 5.32).

5.2.3. SÜNEDE *EMVG*'LERİN BİYOLOJİK İFADE DAĞILIMLARI

5.2.3.1. Süne Dişi Bireylerinde *EmVg* İfade Düzeyleri

Farklı zamanlarda toplanan ergin dişi sünelerin vitellogenin ifade dağılımları birbirine benzer profiller sergilemiştir. *EmVg1*, *EmVg2* ve *EmVg3*'ün dişilerde en fazla göç öncesi

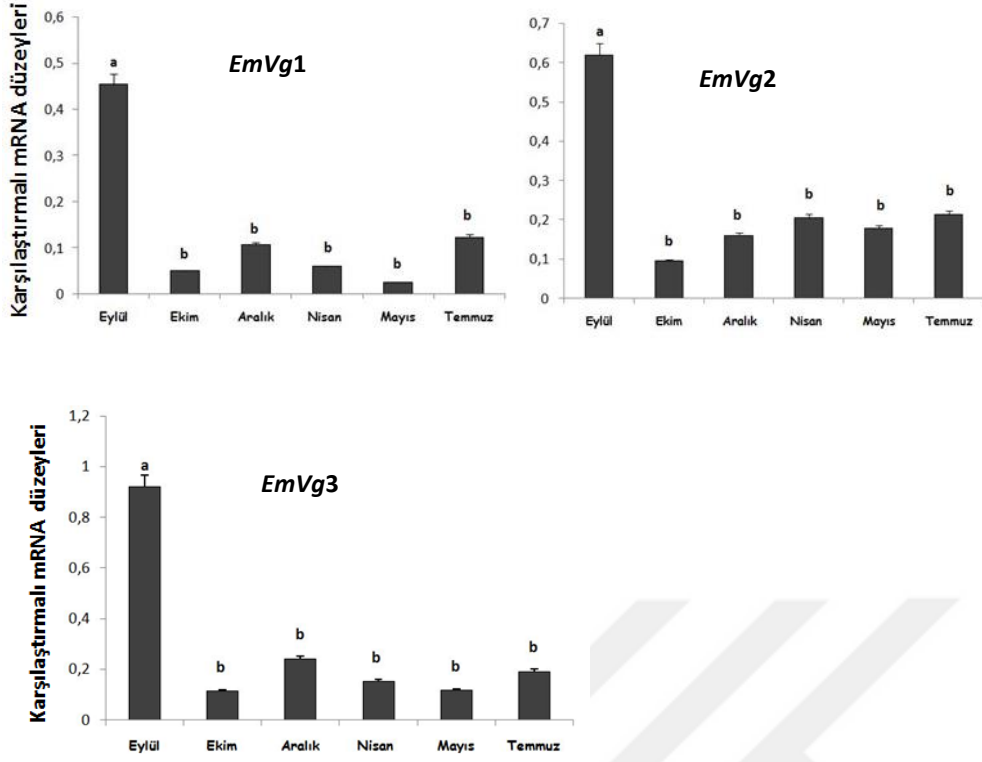
dönemde, ikinci sırada ise kışlaklardan ovalara göç etmiş dönemde ifade oldukları tespit edilmiştir (Şekil 5.33).



Şekil 5.33. *EmVg* genlerinin dişi bireylerdeki ifade profilleri

5.2.3.2. Süne Erkek Bireylerinde *EmVg* İfade Düzeyleri

EmVg1, *EmVg2* ve *EmVg3* genlerinin erkek bireylerde en fazla yazlama döneminde ifade oldukları, her üç genin diğer dönemlerde birbirine yakın oranlarda ifade oldukları, dolayısıyla benzer ifade profili sergiledikleri tespit edilmiştir (Şekil 5.34).



Şekil 5.34. *EmVg1-2-3* genlerinin erkek bireylerdeki ifade profilleri

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. VİTELLOGENİN GENLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Bu tez çalışmasında *E. maura*'ya ait üç adet vitellogenin geninin tüm cDNA dizisine ulaşılmış ve bu diziler karakterize edilmiştir. Böcek Moleküler Biyolojisi alanında bugüne kadar yapılan Vg karakterizasyon çalışmalarında, *Riptortus clavatus*, *Bombus ignitus*, *Bombus hypocrita*'da olduğu gibi, birçok böcekte bir adet Vg bulunduğu tespit edilmiştir (80, 88, 123). *Plautia stali*'de üç, *Periplaneta americana*'da iki, *Aedes aegypti*'de ise beş adet vitellogeninin bulunduğu gibi bu durumun aksini teşkil eden bazı çalışmalar da mevcuttur (83, 124-126). Vitellogenin sayısının böceklere göre farklılık göstermesinin sebebi henüz bilinmemektedir. Ancak bu genlerin hormonal regülasyonda arz ettiği önemden yola çıkılarak, farklı vitellogeninlerin farklı görevlerde bulunabileceği düşünülmektedir (33).

6.1.1. EMVG1 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

EmVg1 cDNA'sının nükleotid dizisi 5595 uzunluğunda ve tahmini proteinine ait aminoasit dizisinin ise 1863 uzunluğunda, bunun da yaklaşık 210 kDa'a karşılık geldiği tespit edilmiştir. EmVg1'de gözlemlenen yapı, büyüklüğü itibari ile diğer böcek Vg dizilerine benzerlik göstermektedir. BLAST analizi sonucunda, EmVg1'in en yüksek benzerliği 5802 nükleotid ve 1907 aminoasit içeren *Plautia stali* Vg'sine %49 oranında gösterdiği görülmüştür (Şekil 5.1). EmVg1'in amino asit dizisi incelendiğinde uzun serin aminoasit zincirleri dikkat çekmektedir. 423 ve 443. aminoasitler arasında serin aminoasitince zengin uzun bir zincir görülmektedir (Şekil 5.7 mavi taralı serin rezidüleri). Ayrıca 388 ve 405. aminoasitler arasında üç tane daha serin aminoasitince zengin, ancak daha kısa olan serin zincirlerine rastlanmıştır. Böcek vitellogenin proteinlerinin en belirgin özelliği, uzun serin rezidülerinden oluşan protein domainleri bulundurmasıdır. Bu domainlere "poliserin bölgesi" adı verilmektedir. Poliserin bölgelerinin işlevi henüz bilinmemekle beraber, vitellogenin proteinlerinin poliserin bölgesinde fosforile olduğu tahmin edilmektedir (33, 127). Bu hipotezden yola çıkarak EmVg1'in yüksek oranda fosforile olduğu düşünülebilir.

Çoğu böcekte Vg'ler glikozilasyon, fosforilasyon ve bazen de sülfasyonu takiben büyük oligomerik moleküller hâlinde hemolimfe salınmadan önce, küçük ve büyük alt ünitelere

ayrılırlar (128, 129). R/K)XX(R/K motifi kesim işlemini gerçekleştirmek üzere subtilisin-benzeri endoproteazlar tarafından tanınmaktadır (130, 131). EmVg1'e en fazla benzerlik gösteren *P. Stali*'de RXXR motifinin Vg1 (RKTR) ve Vg2'de (RTIR) bulunduğu, ancak Vg3'de bulunmadığı rapor edilmiştir (83). EmVg1 aminoasit dizisinin C-terminal bölgesinde 872-875. ve 1306-1309. pozisyonlarında KXXR motifi yer almaktadır (Şekil 5.7 sarı taralı bölge). Diğer böcek vitellogeninlerinin N-terminal bölgesinde bulunan RXRR motifine ise 1207-1209. pozisyonunda rastlanmıştır (Şekil 5.7 pembe taralı bölge). EmVg1'in C-terminal bölgesinde 1667-1670. pozisyonunda böcek vitellogenin dizilerinin tipik korunmuş motifi olan GLCG tetrapeptidi bulunmaktadır (Şekil 5.7 kahverengi taralı bölge).

6.1.2. EMVG2 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Yapılan analizler sonucunda EmVg2'nin 5515 nükleotid, tahmini protein dizisinin ise 1833 aminoasit uzunluğunda olduğu, bunun da yaklaşık 207 kDa ağırlığa karşılık geldiği saptanmıştır. EmVg2'nin 5644 nükleotid ve 1856 aminoasit içeren *Plautia stali* Vg2'sine %36 oranı ile en yüksek benzerliği gösterdiği BLAST analizi sonucunda tespit edilmiştir (Şekil 5.12). EmVg2'nin aminoasit dizisi incelendiğinde 395. ve 411. aminoasitler arasında yer alan ve EmVg1'e kıyasla daha kısa olan poliserin bölgesi dikkat çekmektedir (Şekil 5.17 mavi taralı serin rezidüleri). Dizide iki adet RXXR motifine 1129-1131. ve 1491-1492. pozisyonlarında rastlanmıştır (Şekil 5.17 pembe taralı bölge). Bu durumda EmVg2'nin EmVg1'den farklı olarak potansiyel iki adet kesim bölgesine sahip olduğu, dolayısı ile üç altüniteye ayrıldığı düşünülebilir. Böcek vitellogeninlerinin korunmuş motifi olan GLCG tetrapeptidi, EmVg2'nin C-terminal bölgesinde 1654-1657. pozisyonda yer almaktadır (Şekil 5.17 kahverengi taralı bölge). Bazı böceklerde GLCG'nin yaklaşık 20 aminoasit yukarısında bulunan DGXR motifine, EmVg2'de GLCG'nin 14 aminoasit yukarısında rastlanmıştır (Şekil 5.17 gri taralı bölge).

6.1.3. EMVG3 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

EmVg3 tüm cDNA dizisinin 5634 nükleotide, tahmini protein dizisinin 1877 aminoasite sahip olduğu, protein molekül ağırlığının ise yaklaşık 210 kDa olduğu yapılan analizler sonucunda görülmüştür. BLAST analizi EmVg3'ün, 5865 nükleotid ve 1903 aminoasit içeren *Plautia stali* Vg3'üne %53 oranı ile en yüksek benzerliği gösterdiğini ortaya

koymuştur (şekil 5.22). EmVg3 aminoasit dizisinde, 347. ve 421. aminoasitler arasında yer alan, EmVg1 ve EmVg3'e kıyasla daha uzun olan poliserin bölgeleri dikkat çekmektedir (şekil 5.28 mavi taralı serin rezidüleri). EmVg3'te *P. Stali*'de olduğu gibi RXXR motifi bulunmamaktadır (83). Diğer EmVg'lere kıyasla en fazla KXXK/R motifi EmVg3'te 7 adet olarak bulunmuştur (şekil 5.28 sarı taralı). EmVg3'ün, EmVg1 ve EmVg2'den fazla potansiyel kesim bölgesine sahip olduğu ve kesim sonrası çok sayıda altüniteye ayrıldığı düşünülebilir. Korunmuş GLCG motifi, EmVg3 C-terminal bölgesinde 1675-1678. pozisyonunda yer almaktadır (şekil 5.28 kahverengi taralı bölge). DGXR motifine ise, EmVg2'de olduğu gibi GLCG'nin 14 aminoasit yukarısında rastlanmıştır (şekil 5.28 gri taralı bölge).

6.2. SÜNEDE EMVG'LERİN İFADE DÜZEYLERİ

6.2.1. EMVG'LERİN DOKUSAL İFADE DÜZEYLERİ

EmVg1, *EmVg2* ve *EmVg3* genlerinin en fazla ifade olduğu organ baştır (şekil 5.31). *EmVg1*'de baştaki ifade düzeyini sırasıyla kas sistemi, sinir sistemi, yağ dokusu, trake, orta bağırsak, ovarı ve malpigi tüpleri takip etmiştir. *EmVg2*'nin baştan sonra en fazla ifade olduğu doku ve organlar ise sırası ile sinir sistemi, kas sistemi, mide, trake, ovarı, yağ dokusu ve malpigi tüpleridir. *EmVg3*'te, baş ve kas sistemi arasındaki ifade düzeyi kat sayısının istatistiksel açıdan 1 olduğu, dolayısı ile her ikisinin de eşit ifade olduğu saptanmıştır. Baş ve kası takiben en yüksek *EmVg3* ifadesi sırası ile sinir sistemi, orta bağırsak, trake, ovarı, malpigi tüpleri ve yağ dokusunda bulunmuştur (şekil 5.31).

Tufail ve Takeda (2002) *Leucophaea maderae* (Orthoptera: Blaberidae)'de yaptıkları çalışmada vitellogenin geninin sadece dişi yağ dokusu RNA'larında gözlendiğini, ovarilerde ve erkek yağ dokusunda görölmediğini Northern Blot yöntemi ile tespit etmişlerdir (85). Ayrıca Dictyoptera, Hemiptera, Coleoptera, Diptera, Lepidoptera ve Hymenoptera takımlarına ait böceklerle yapılan diğer çalışmalarda vitellogenin geninin yağ dokusunda ifade olduğu saptanmıştır (11, 80, 82, 83, 124, 132-138).

Diğer yandan Vg'nin işçi arılarda yağ dokusu ve ovarinin yanı sıra başta bulunan yağ dokusu, hipofaringeal bez ve beyinde bulunduğu bildirilmiştir (16, 95, 139). Bu genin işçi arılar tarafından larva, kraliçe ve diğer ergin arıların beslenmesi için arı sütü üretiminde

(12), bağışıklığın devreye girmesinde, strese direnç sağlanmasında ve uzun yaşamın sürdürülmesinde görev aldığı rapor edilmiştir (14, 16, 17, 93). Ayrıca hormon seviyelerini etkileyerek davranışsal olgunlaşma ve toplayıcı arıların toplama eğilimlerinde rol aldığı bildirilmiştir (15, 16).

Süne sosyal böceklere benzer şekilde toplu hâlde kışlağa göç, diyapoz dönemini geçirme, ovalara inme ve beslenme hareketlerini gerçekleştirirken, grup psikolojisi ile hareket eden bir canlıdır. Kışlayan böceklerin kışlama ve diyapozu kırma sürecinde güçlü bir savunma sistemi ve hormonal işleyişe, ayrıca strese direnç metabolizmasına ihtiyaçları vardır. Süne gün uzunluğunun algılanması, diyapozun gerçekleşmesi ve kırılması için ilk işarettir. Böceğin diyapoza girmesi ve diyapozdan çıkması gözlere ve ışığa duyarlı hücrelerin fotoperiyodik sinyalleri beyne iletmesi ile gerçekleşmektedir (140, 141). Özellikle hormonal regülasyon göz önünde bulundurulduğunda juvenil hormonun, vitellogenin genlerinin transkripsiyonunu stimüle etmede ve vitellogeninin üretiminin kontrolünde gerekli olduğu bilinmektedir (38, 40). Vitellogenin genlerinin çalışılan dokular arasında en fazla beynin bulunduğu baş bölgesinde ifade olarak, sünenin sosyal böceklere benzeyen toplu davranışlarında, diyapoz dönemini atlama ve kırmada, hem de üreme ile ilgili işlevlerinde vitellogeninin anahtar role sahip olduğu düşünülebilir.

EmVg'lerin baştan sonra en fazla, kas ve sinir sisteminde ifade oldukları saptanmıştır (Şekil 5.31). Süne kışlama öncesi ve sonrası uçuşu için kanatlarını kullanırken, uçuş kasları sayesinde hareket eder. Kasların devreye girmesini sağlayan ise sinir sistemidir. İfade profilleri incelendiğinde, baştan sonra kas ve sinir sisteminde yüksek oranda bulunan vitellogeninin, süne hayati organizasyonları gerçekleştirmek için görev alabileceğini akıllara getirmektedir. Bütün bunlar, vitellogenin geninin süne üreme döneminin haricinde başta diyapoz regülasyonu olmak üzere, böcek bünyesinde farklı görevlerde bulunmak üzere ifade olduğuna işaret etmektedir.

6.2.2. EMVG'LERİN DÖNEMSEL İFADE DAĞILIMLARI

EmVg1 ve *EmVg2* genlerine ait dönemsel ifade dağılımı, bu genlerin yumurtadan ergine sünenin tüm biyolojik döngüsü süresince ifade olduklarını göstermiştir. Üç genin de en fazla ergin dönemde ifade olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *EmVg1*'in 4. dönemdeki, *EmVg3*'ün ise yumurtadaki yüksek ifade düzeyleri dikkate değer bulunmuştur (Şekil 5.32).

Beyazsinekte yapılan bir çalışmada, Vg1 ve Vg2 genlerinin ergin dönemde yüksek miktarda ifade oldukları rapor edilmiştir. Pupa fazında her iki gen az miktarda ifade olurken, Vg2 ifadesinin ise sadece yumurta-nimf aşamasında gözleendiği tespit edilmiştir (142).

Diyapoz dönemini atlatan kışlamış süne ergin bireyleri ovalara göç eder. Ovalarda beslenme, çiftleşme ve yumurtlama evrelerini geçirmek zorunda olan ergin bireylerin, ovarı gelişimini tamamlayabilmeleri için vitellogenin proteinine ihtiyaçları vardır. Gelişme dönemleri arasında ergin dönemde yüksek oranda ifade olduğu gözlenen vitellogeninler, bu durumu destekler niteliktedir. Şekil 5.32’de *EmVg1*’in dördüncü dönemde gözlenen yüksek ifadesi dikkat çekmektedir. Süne üreme açısından gelişimin dördüncü dönem nimfte başladığı düşünülebilir.

Scharf *et al.* (2005) termitlerde yaptıkları RT-qPCR analizinde, vitellogeninlerin nimflerde dikkate değer miktarda ifade olduklarını rapor etmiş ve bu durumun vitellogeninin maternal kökenli olmasına kaynaklandığını öne sürmüştür. Aynı çalışmada Vg1 geninin yumurtada yüksek miktarda ifade olduğu tespit edilmiştir. Kastlara özgü diğer dönemlerde artan ifade miktarları ise, bu genlerin kast farklılaşmasında önemli rol almak üzere ifade olma ihtimaline bağlanmıştır (143). *EmVg3* geninin süne yumurtasında erginle benzer seviyede ifade olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, gelişme sürecindeki oositte üreme öncesi birikmiş vitellogeninin bulunduğu fikrini akıllara getirmektedir. Ovipar böceklerde yumurta içerisinde embriyonun gelişimi için, protein, şeker ve lipitten oluşan bol miktarda yolk maddesi bulunmaktadır. Vitellogenin proteini, yolk maddesinin akümüasyonunu ve oositlerde depolanmasını sağlar. Diğer bir deyişle, böceklerde yumurta dolayısıyla embriyo gelişimi için vitellogenin proteininin varlığı hayatidir (144).

6.2.3. SÜNEDE EMVG’LERİN BİYOLOJİK İFADE DAĞILIMLARI

6.2.3.1. Süne Dişi Bireylerinde *EmVg* İfade Dağılımları

Farklı zamanlarda toplanan ergin dişi sünelerin vitellogenin ifade profillerinin birbirine benzerlik gösterdiği görülmüştür. Dişi bireylerde *EmVg1*, *EmVg2* ve *EmVg3*’ün en fazla ifade olduğu ay Nisan, yani göç öncesi dönemdir. İkinci sırada en fazla ifade olduğu ay ise Mayıs, yani kışlaklardan göç etmiş dönemdir (Şekil 5.33).

Süne dişi bireylerinin ovaya inmeden önce genital organlarının olgunlaşmaya başladığı için, göç öncesi ve göç sonrası dönemlerde yüksek oranda vitellogenin ifadesinin gözlenmesi son derece anlamlıdır (145, 146). Bu durum kısaca şu şekilde açıklanabilir; süne göç öncesi dönemde vitellogenin sentezi gerçekleştirilmekte ve ardından hemolimfe salgılanmaktadır.

Birçok böcekte ergin diyapozu, üremenin baskılanması olarak ifade edilir. Diyapozun en göze çarpan yönü ise, ergin dişilerde oogenezinin kesilmesidir (147). *Tetranychus urticae*'nin diyapozda ve diyapozda olmayan ergin dişilerinin ovarilerinde, vitellogenin genlerinin ifade düzeyleri kıyaslanmıştır. Sonuç olarak, diyapozdaki ergin dişilerde vitellogenin mRNA'sının sentezlenmediği gözlenirken, diyapozda olmayanlarda ise ifadenin gerçekleştiği saptanmıştır (110). Süne ergin dişilerinde *EmVg1*, *EmVg2*, *EmVg3* genlerinin en fazla, diyapozun hemen ardından ovalara göç öncesi dönemde ifade olduğu görülmüştür (Şekil 5.33). Bu durum üremeye hazırlanan süne, vitellogeninin ovarinin gelişimine katkıda bulunmak üzere ifade olduğunu göstermektedir. Üremenin bu periyotta, yani göç öncesi dönemde gerçekleşme durumu, üç vitellogenin geninin de çiftleşme dönemi öncesinde (Mayıs ayı), ovarilerin gelişimini birincil görev olarak sağlamak üzere ifade olduğu düşüncesini ortaya koymaktadır.

6.2.3.2. Süne Erkek Bireylerinde *EmVg* İfade Dağılımları

EmVg1, *EmVg2* ve *EmVg3*'ün erkek bireylerde en fazla ifade oldukları ayın Eylül yani yazlama dönemi olduğu görülmüştür. Üç genin diğer dönemlerde de dikkate değer biçimde ifade olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.34).

Vitellogenin, geçmiş çalışmalarda dişi üreme sistemi ile ilişkili, dişiye özgü bir protein olarak rapor edilmiştir (9). Daha sonra yapılan çalışmalar genin erkek bireylerde de ifade olduğunu ortaya koymuştur. Piulachs *et al.* (2003) *A. mellifera*'nın yeni ergin döneme girmiş erkek arılarında vitellogenin ifadesini rapor etmiştir (11). *B. hypocrita*'nın erkek arılarında da Vg ifadesi tespit edilmiş, en yüksek miktarın henüz pupadan çıkmış ergin erkeklerde olduğu gözlenmiştir (88). Kraliçe arıların yanı sıra, erkek arılar ve steril olan işçi arılarda da vitellogeninin ifade edilmesi, bu genin dişi üreme sisteminin haricinde, farklı fonksiyonların sağlanmasında da görev aldığını göstermiştir (11, 101, 148, 149). Vitellogeninin işçi ve kraliçe arılarda antioksidan görevi yaptığını kanıtlayan çalışmalardan

yola çıkararak, genelde cinsiyete bağımlı sentezlendiği düşünölen bu proteinin erkek bireylerde antioksidan görevi gördüğü varsayılabilir (17, 93). Balarısı işçi arılarında vitellogeninin ilişkili olduğu görevler arasında sosyal açıdan özelleşmenin, evrimsel gelişimin ve düzenli üreme sisteminin sağlanması bulunduğu düşünöldüğünde, süne erkek bireylerinde yaşamsal fonksiyonların idame ettirilmesinde vitellogeninlerin cinsiyetten bağımsız olarak erkek bireylerde farklı görevlerde de bulunabileceği düşöncesi ortaya çıkmaktadır. Bu genlerin erkek bireylerde dişi bireylere kıyasla diğer dönemlerde de dikkate değer bir şekilde ifade olması, bu kanıyı güçlendirir niteliktedir.

6.3. SONUÇ

Bu tez çalışması ile dişilere özgü gen olarak anılan vitellogenin genlerinin moleküler düzeyde karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Tahmini proteine ait korunmuş domainler, kesim motifleri ile korunmuş motifler belirlenmiş, EmVg'lerin en fazla Hemiptera takımından *Plautia stali*'ye benzerlik gösterdiği görölmüştür. Üç proteine ait aminoasit dizisinin filogenetik, tahmini sinyal peptit, fosforilasyon ve glikozilasyon analizleri yapılmıştır. Bu genlerin dişi, erkek, gelişme dönemi ile doku ve organlardaki ifade düzeyleri detaylı olarak incelenmiştir. Buğdayın en önemli zararlısı olan sünenin vitellogenin genlerinin ifade düzeylerinin ve karakterizasyonlarının aydınlatılması sayesinde, süne bu genin sadece dişilere özgü bir gen olmadığı, erkek ve nimf dönemlerinde de sentezlendiği ortaya konulmuştur. Ayrıca dişi yağ dokusu ile özdeşleştirilen bu gen grubunun, süne farklı bir ifade düzenine sahip olduğu, en fazla başta ifade olduğu görölmüştür. Bu bulgu sünenin sosyal böcek olmamasına rağmen, vitellogenin ifadesi hususunda sosyal böcekler gibi bir işleyişe sahip olduğunu, bu durumun da vitellogenin genlerinin üremenin yanı sıra, başka görevlerde de yer alabileceğine işaret etmektedir.

Günümüzde zararlı ile mücadelede uygulanan Biyoteknolojik çalışmalar, zararı oluşturan hedef genin bilgisine sahip olmayı gerektirmektedir. Böylece hedef genin baskılanması ve susturulmasına olanak sağlanabilmekte, hatta böceğin beslendiği bitki üzerinden bir takım modifikasyonlarla, böceğin gelişimi ve üremesi engellenebilmektedir. Bu tez ile vitellogeninlerin tahmini protein yapısı, genlerin en fazla hangi doku ve organlarda ifade olduğu, ayrıca genin hangi dönemden itibaren transkribe olmaya başladığı bilgileri

sunularak, ÷lkemizde ciddi ekonomik kayıplara sebep olan s÷ne zararlısı ile m÷cadelede gelecekte uygulanacak çalışmalara kolaylık sağlanacaktır.



7. KAYNAKLAR

- 1 Özkan M, Babaroğlu N. SÜNE. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı: *SES Reklam İletişim ve Baskı Hizmetleri*. 2015, Ankara.
- 2 Birişik N, Kütük H, Karacaoğlu M, Yarpuzlu F, İslamoğlu M, Öztemiz S. Teoriden Pratiğe Biyolojik Mücadele Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü Eskişehir yolu 9 km. Lodumlu /Ankara: *Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı*. 2012.
- 3 Lodos N. Türkiye Entomolojisi-II (Genel Uygulamalı ve Faunistik). Ege Üniv. Matbaası, İzmir: *Ege Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü*. 1986.
- 4 Özbek H, Hayat R. Tahıl, sebze, yem ve endüstri bitki zararlıları. Atatürk Üniversitesi, Erzurum: *Ziraat Fakültesi Yayınları*. 2003.
- 5 Kütük H, Canhilal R, İslamoğlu M, Kanat AD, El-Bouhssini M. Predicting the number of nymphal instars plus new-generation adults of the Sunn Pest from overwintered adult densities and parasitism rates. *J. Pest Sci.* 2010;83(1):21-5.
- 6 Tufail M, Takeda M. Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *J. Insect Physiol.* 2009 Feb;55(2):87-103.
- 7 Chen TT, Hillen LJ. Expression of the Vitellogenin Genes in Insects. *Gamete Res.* 1983;7(2):179-96.
- 8 Hagedorn HH, Kunkel JG. Vitellogenin and vitellin in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 1979;24(1):475-505.
- 9 Pan ML, Bell WJ, Telfer WH. Viteliogenic Blood Protein Synthesis by Insect Fat Body. *Science* 1969;165(3891):393-4.
- 10 Engels W, Kaatz H, Zillikens A, Simões ZLP, Trube A, Braun R, Dittrich F. Honey-Bee Reproduction - Vitellogenin and Caste-Specific Regulation of Fertility. *Adv. Invert. Reprod.* 1990. 5:495-502.

- 11 Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuk AR, Cruz J, Simões ZLP, Bellés X. The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2003;33(4):459-65.
- 12 Amdam GV, Norberg K, Hagen A, Omholt SW. Social exploitation of vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003 Feb 18;100(4):1799-802.
- 13 Amdam GV, Page RE. The developmental genetics and physiology of honeybee societies. *Anim. Behav.* 2010 May;79(5):973-80.
- 14 Amdam GV, Simões ZLP, Hagen A, Norberg K, Schroder K, Mikkelsen O, Kirkwood TBL, Omholt SW. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp. Gerontol.* 2004 May;39(5):767-73.
- 15 Guidugli KR, Nascimento AM, Amdam GV, Barchuk AR, Omholt S, Simões ZL, Hartfelder K. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Lett.* 2005 Sep 12;579(22):4961-5.
- 16 Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE, Amdam GV. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol.* 2007 Mar;5(3):e62.
- 17 Seehuus SC, Norberg K, Gimsa U, Krekling T, Amdam GV. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2006 Jan 24;103(4):962-7.
- 18 Brown ES. Notes on the migration and direction of flight of *Eurygaster* and *Aelia* species (Hemiptera, Pentatomoidea) and their possible bearing on invasions of cereal crops. *J. Anim. Ecol.* 1965;34(1):93-107.
- 19 Adıgüzel N. Fluctuations in Sunn-pest Populations in South-eastern Anatolia. . *EPPO Bull.* 1981;11(2):19-22.
- 20 Critchley BR. Literature review of sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. (Hemiptera, Scutelleridae). *Crop Prot.* 1998 Jun;17(4):271-87.

- 21 Kinaci E, Kinaci G, Yildirim AF, Atli A. Sunn pest problems in Central Anatolia and the role of wheat varieties in integrated control (Reprinted from Wheat: Prospects for global improvement, 1998). *Euphytica*. 1998;100(1-3):63-7.
- 22 Parker BL, Costa SD, Skinner M, El Bouhssini M. Sampling sunn pest (*Eurygaster integriceps* Puton) in overwintering sites in northern Syria. *Turk. J. Agric For.* 2002;26(3):109-18.
- 23 Abbas H. Türkiye'deki *Eurygaster* Lap. (Heteroptera: Scutelleridae) Türleri Üzerinde Sistematik Araştırmalar. *Fen Bilimleri Enstitüsü: Ege Üniversitesi*; 1990.
- 24 İslamoğlu M, Kornoşor S. Adıyaman Nemrut Kışlağında Farklı Kışlak Bitkilerinde Süne (*Eurygaster integriceps* Put.) Yoğunluğunun Parker Metoduna Göre Belirlenmesi. *ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2010;23(1).
- 25 Lodos N. Türkiye, Irak, İran ve Suriye'de Süne (*Erygaster integriceps* Put.) problemi üzerine araştırmalar: *Ege Üniversitesi Matbaası*; 1961.
- 26 Köksel H, Sivri D, Özboy O, Başman A, Karaca H. Hububat Laboratuvarı El Kitabı: *Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Yayınları*; 2000.
- 27 Aw-Hassan BA, Mazid A, Gul A, Moghaddam MH, Hamoud HH, El-Bouhssini M. Analysis of policies on integrated pest management on sunn pest in Iran, Syria and Turkey. *Second International Conference on Sunn pest, ICARDA*. Aleppo, Syria.; 2004. p. 275.
- 28 Melan K. Süne ve ülkesel Süne projesi. *Ülkesel Tahıl Sempozyumu*. Konya; 2008. p. 346-53.
- 29 Örün H. Türkiye'de Süne mücadelesinin genel durumu, dünü ve bugünü. Entegre Süne Mücadelesi I. Workshop raporu. *Ankara: Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü*; 1998.
- 30 Koçak E. Türkiye'de Süne Mücadelesinde 80 Yıl (1928 – 2007). *Ülkesel Tahıl Sempozyumu* Konya; 2008. p. 354–60.

- 31 Akıncı AR, Soysal A. Süne'nin (*Eurygaster* spp.) yumurta parazitoitlerinden *Trissolcus grandis* Thomson (Hym.Scelioinidae)'nin kitle üretim imkanlarının araştırılması(Proje no:BKA/05-BM-009,1996 yılı gelişme raporu). *Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü* Antalya.13s.
- 32 Klowden MJ. Physiological systems in insects. 3rd ed: *Academic Press*; 2013.
- 33 Tufail M, Takeda M. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *J. Insect Physiol.* 2008 Dec;54(12):1447-58.
- 34 Chino H, Yamagata M, Takahashi K. Isolation and Characterization of Insect Vitellogenin - Its Identity with Hemolymph Lipoprotein-Ii. *Biochim. Et Biophys. Acta.* 1976;441(2):349-53.
- 35 Koeppe J, Ofengand J. Juvenile Hormone-Induced Biosynthesis of Vitellogenin in *Leucophaea maderae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1976;173(1):100-13.
- 36 Dellacioppa G, Engelmann F. The Vitellogenin of *Leucophaea maderae* - Synthesis as a Large Phosphorylated Precursor. *Insect Biochem.* 1987;17(3):401-15.
- 37 Belles X. Vitellogenesis directed by juvenile hormone. In: Raikhel AS ST, editor. *Progress in Vitellogenesis Reproductive Biology of Invertebrates.* Inc.,Enfield, USA-Plymouth UK: *Science Publishers*; 2005. p. 157-97.
- 38 Engelmann F. Vitellogenesis controlled by juvenile hormone. *Endoc. Insects.* 1983;1: 259-70.
- 39 Hagedorn HH. The role of ecdysteroids in reproduction. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehen. Insect Phys. Biochem. Pharma.* New York: Pergamon Press; 1985. p. 205-61.
- 40 Wyatt GR, Davey KG. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Adv. Insect Physiol.* 1996, 26: 1.
- 41 Tufail M, Nagaba Y, Elgendy AM, Takeda M. Regulation of vitellogenin genes in insects. *Entomol.Sci.* 2014;17(3):269-82.

- 42 Brown MR, Clark KD, Gulia M, Zhao Z, Garczynski SF, Crim JW, Suderman RJ, Strand MR. An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2008 Apr 15;105(15):5716-21.
- 43 Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*. 2000 Jun 15;405(6788):827-36.
- 44 Mutz KO, Heilkenbrinker A, Lonne M, Walter JG, Stahl F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2013 Feb;24(1):22-30.
- 45 Nyrén P. The History of Pyrosequencing®. *Pyrosequencing® Protocols Humana Press*; 2007. p. 1-13.
- 46 Marsh S. *Pyrosequencing® applications: Humana Press*. 2007.
- 47 Mason J, Griffiths M. Molecular Diagnosis of Leukemia. *Expert Rev. Mol. Diag.* 2012;12(5):511-26.
- 48 Bai X, Zhang W, Orantes L, Jun TH, Mittapalli O, Mian MA, Michel AP. Combining next-generation sequencing strategies for rapid molecular resource development from an invasive aphid species, *Aphis glycines*. *PLoS One*. 2010;5(6):e11370.
- 49 Levine R. i5k: the 5,000 insect genome project. *American Entomologist*. 2011;57(2):110-3.
- 50 Heller MJ. DNA microarray technology: Devices, systems, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2002;4:129-53.
- 51 David JP, Coissac E, Melodelima C, Poupardin R, Riaz MA, Chandor-Proust A, Reynaud S. Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genom.* 2010;11:216.
- 52 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnol. Series* 1992;17(17).

- 53 Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *Biotechniques* 1997. 22(1), 130-139.
- 54 Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):986-94.
- 55 Winer J, Jung CKS, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Analytic. Biochem.* 1999 May 15;270(1):41-9.
- 56 Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
- 57 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
- 58 Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1988 Dec;85(23):8998-9002.
- 59 Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1977 Dec;74(12):5350-4.
- 60 Streit S, Michalski CW, Erkan M, Kleeff J, Friess H. Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. *Nat. Protoc.* 2009;4(1):37-43.
- 61 Chelly J, Kahn A. RT-PCR and mRNA quantitation: Birkhäuser Boston; 1994.
- 62 Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* 2012 Sep;4(9):429-34.

- 63 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
- 64 Castel SE, Martienssen RA. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 2013 Feb;14(2):100-12.
- 65 Dağeri A, Güz N, Gürkan MO. Böceklerle mücadelede yeni bir strateji: RNA interferans. *Türk. Entomol. Bül.* 2012;2(3).
- 66 Yu N, Christiaens O, Liu J, Niu J, Cappelle K, Caccia S, Huvenne H, Smagghe G. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Sci.* 2013 Feb;20(1):4-14.
- 67 Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 2007 Nov;25(11):1322-6.
- 68 Lin L, Qiu-Hong C, Yong-Jun L. Knock down of *Nilaparvata lugens* Genes through dsRNA Feeding on Artificial Diet and Transgenic Plants. *J Agric. Biotech.* 2013;21(9):1028-36.
- 69 Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.* 2007 Nov;25(11):1307-13.
- 70 Soares CA, Lima CM, Dolan MC, Piesman J, Beard CB, Zeidner NS. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Mol. Biol.* 2005 Aug;14(4):443-52.
- 71 Surakasi VP, Mohamed AA, Kim Y. RNA interference of beta1 integrin subunit impairs development and immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.* 2011 Nov;57(11):1537-44.

- 72 Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, Plummer KM, Birch NP, Newcomb RD. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol. Biol.* 2006 Jun;15(3):383-91.
- 73 March JC, Bentley WE. RNAi-based tuning of cell cycling in *Drosophila* S2-cells effects on recombinant protein yield. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007 Jan;73(5):1128-35.
- 74 Shah C, Forstemann K. Monitoring miRNA-mediated silencing in *Drosophila melanogaster* S2-cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008 Nov;1779(11):766-72.
- 75 Sivakumar S, Rajagopal R, Venkatesh GR, Srivastava A, Bhatnagar RK. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *J Biol. Chem.* 2007 Mar 9;282(10):7312-9.
- 76 Tian H, Peng H, Yao Q, Chen H, Xie Q, Tang B, Zhang W. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS One.* 2009;4(7):e6225.
- 77 Timmons L, Court DL, Fire A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene.* 2001 Jan 24;263(1-2):103-12.
- 78 Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature.* 1998 Oct 29;395(6705):854.
- 79 He B, Chu Y, Yin M, Mullen K, An C, Shen J. Fluorescent nanoparticle delivered dsRNA toward genetic control of insect pests. *Adv Mater.* 2013 Sep 6;25(33):4580-4.
- 80 Hirai M, Watanabe D, Kiyota A, Chinzei Y. Nucleotide sequence of vitellogenin mRNA in the bean bug, *Riptortus clavatus*: analysis of processing in the fat body and ovary. *Insect Biochem. Mol Biol.* 1998 Aug;28(8):537-47.
- 81 Comas D, Piulachs MD, Belles X. Vitellogenin of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, blattellidae): nucleotide sequence of the cDNA and analysis of the protein primary structure. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2000 Sep;45(1):1-11.

- 82 Tufail M, Lee JM, Hatakeyama M, Oishi K, Takeda M. Cloning of vitellogenin cDNA of the American cockroach, *Periplaneta americana* (Dictyoptera), and its structural and expression analyses. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 2000 Sep;45(1):37-46.
- 83 Lee JM, Hatakeyama M, Oishi K. A simple and rapid method for cloning insect vitellogenin cDNAs. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2000 Mar;30(3):189-94.
- 84 Lee JM, Nishimori Y, Hatakeyama M, Bae TW, Oishi K. Vitellogenin of the cicada *Graptopsaltria nigrofuscata* (Homoptera): analysis of its primary structure. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2000 Jan;30(1):1-7.
- 85 Tufail M, Takeda M. Vitellogenin of the cockroach, *Leucophaea maderae*: nucleotide sequence, structure and analysis of processing in the fat body and oocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002 Nov;32(11):1469-76.
- 86 Tufail M, Bembenek J, Elgendy AM, Takeda M. Evidence for two vitellogenin-related genes in *Leucophaea maderae*: The protein primary structure and its processing. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2007 Dec;66(4):190-203.
- 87 Shu Y, Zhou J, Tang W, Lu K, Zhou Q, Zhang G. Molecular characterization and expression pattern of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) vitellogenin, and its response to lead stress. *J. Insect Physiol.* 2009 Jul;55(7):608-16.
- 88 Li J, Huang J, Cai W, Zhao Z, Peng W, Wu J. The vitellogenin of the bumblebee, *Bombus hypocrita*: studies on structural analysis of the cDNA and expression of the mRNA. *J. Comp. Physiol. B.* 2010 Feb;180(2):161-70.
- 89 Horigane M, Shinoda T, Honda H, Taylor D. Characterization of a vitellogenin gene reveals two phase regulation of vitellogenesis by engorgement and mating in the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Mol. Biol.* 2010 Aug;19(4):501-15.
- 90 Tufail M, Naemullah M, Elmogy M, Sharma PN, Takeda M, Nakamura C. Molecular cloning, transcriptional regulation, and differential expression profiling of vitellogenin in two wing-morphs of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Mol. Biol.* 2010 Dec;19(6):787-98.

- 91 Blariza MJ, Soria NW, Torres AG, Grosso CG, Garcia BA. cDNA isolation and characterization of two vitellogenin genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *Gene*. 2014 Jun 10;543(1):118-24.
- 92 Zhong R, Ding TB, Niu JZ, Xia WK, Liao CY, Dou W, Wang JJ. Molecular characterization of vitellogenin and its receptor genes from citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor). *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(3):4759-73.
- 93 Corona M, Velarde RA, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes KA, Robinson GE. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2007 Apr 24;104(17):7128-33.
- 94 Martin D, Maestro O, Cruz J, Mane-Padros D, Belles X. RNAi studies reveal a conserved role for RXR in molting in the cockroach *Blattella germanica*. *J. Insect Physiol.* 2006 Apr;52(4):410-6.
- 95 Seehuus SC, Norberg K, Krekling T, Fondrk K, Amdam GV. Immunogold localization of vitellogenin in the ovaries, hypopharyngeal glands and head fat bodies of honeybee workers, *Apis mellifera*. *J. Insect Sci.* 2007;7:1-14.
- 96 Cruz-Landim C. Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Editora Unesp; 2008.
- 97 da Cruz-Landim C. Ovarian development in Meliponine bees (Hymenoptera : Apidae): the effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. *Genet. Mol. Biol.* 2000 Mar;23(1):83-8.
- 98 Paes de Oliveira VT, Berger B, Cruz-Landim Cd, Simões ZLP. Vitellogenin content in fat body and ovary homogenates of workers and queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides* during vitellogenesis. *Insect Sci.* 2012;19(2):213-9.
- 99 Chen ME, Lewis DK, Keeley LL, Pietrantonio PV. cDNA cloning and transcriptional regulation of the vitellogenin receptor from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Mol. Biol.* 2004 Apr;13(2):195-204.

- 100 Amdam GV, Omholt SW. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *J. Theor. Biol.* 2002 May 21;216(2):209-28.
- 101 Engels W, Fahrenhorst H. Alters- und kastenspezifische Veränderungen der Haemolymph-Protein-Spektren bei *Apis mellifera*. *Devel. Genes Evol.* 1974;174(3):285-96.
- 102 Scheiner R. Responsiveness to sucrose and habituation of the proboscis extension response in honey bees. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol Sens. Neural Behav. Physiol.* 2004 Sep;190(9):727-33.
- 103 Amdam GV, Norberg K, Page RE, Jr., Erber J, Scheiner R. Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behav. Brain Res.* 2006 May 15;169(2):201-5.
- 104 Gershman B, Puig O, Hang L, Peitzsch RM, Tatar M, Garofalo RS. High-resolution dynamics of the transcriptional response to nutrition in *Drosophila*: a key role for dFOXO. *Physiol. Genom.* 2007;29(1):24-34.
- 105 Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, Li H, Kenyon C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2003 Jul 17;424(6946):277-84.
- 106 Suren-Castillo S, Abrisqueta M, Maestro JL. FoxO inhibits juvenile hormone biosynthesis and vitellogenin production in the German cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2012 Jul;42(7):491-8.
- 107 Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 2005 May-Jun;16(4):183-9.
- 108 Lee RY, Hench J, Ruvkun G. Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway. *Curr. Biol.* 2001;11(24):1950-7.

- 109 Sim C, Denlinger DL. Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2008 May 6;105(18):6777-81.
- 110 Kawakami Y, Goto SG, Ito K, Numata H. Suppression of ovarian development and vitellogenin gene expression in the adult diapause of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *J. Insect Physiol*. 2009 Jan;55(1):70-7.
- 111 Parthasarathy R, Sheng Z, Sun Z, Palli SR. Ecdysteroid regulation of ovarian growth and oocyte maturation in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 2010 Jun;40(6):429-39.
- 112 Libbrecht R, Corona M, Wende F, Azevedo DO, Serrao JE, Keller L. Interplay between insulin signaling, juvenile hormone, and vitellogenin regulates maternal effects on polyphenism in ants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2013 Jul 2;110(27):11050-5.
- 113 Lu K, Shu Y, Zhou J, Zhang X, Zhang X, Chen M, Yao Q, Zhou Q, Zhang W. Molecular characterization and RNA interference analysis of vitellogenin receptor from *Nilaparvata lugens* (Stal). *J. Insect Physiol*. 2015 Feb;73:20-9.
- 114 Ciudad L, Piulachs MD, Belles X. Systemic RNAi of the cockroach vitellogenin receptor results in a phenotype similar to that of the *Drosophila* *yolkless* mutant. *FEBS J*. 2006 Jan;273(2):325-35.
- 115 Guz N, Toprak U, Dageri A, Oktay Gurkan M, Denlinger DL. Identification of a putative antifreeze protein gene that is highly expressed during preparation for winter in the sunn pest, *Eurygaster maura*. *J. Insect Physiol*. 2014 Sep;68:30-5.
- 116 Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol*. 2013 Dec;30(12):2725-9.
- 117 Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(Database issue):D225-9.

- 118 Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods*. 2011;8(10):785-6.
- 119 Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 1999 Dec 17;294(5):1351-62.
- 120 Gupta R, Jung E, Brunak S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. Unpublished. 2004.
- 121 Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 2013 May 15;32(10):1478-88.
- 122 Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* 2015 Jun;10(6):845-58.
- 123 Lee KY, Lee SB, Sohn HD. Molecular cloning and characterization of a vitellogenin of the bumblebee *Bombus ignitus*. *Int. J. Indust. Entomol.* 2009;18(1):33-40.
- 124 Chen JS, Cho WL, Raikhel AS. Analysis of mosquito vitellogenin cDNA. Similarity with vertebrate phosphovitins and arthropod serum proteins. *J. Mol. Biol.* 1994 Apr 15;237(5):641-7.
- 125 Romans P, Tu Z, Ke Z, Hagedorn HH. Analysis of a vitellogenin gene of the mosquito, *Aedes aegypti* and comparisons to vitellogenins from other organisms. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1995 Sep;25(8):939-58.
- 126 Tufail M, Hatakeyama M, Takeda M. Molecular evidence for two vitellogenin genes and processing of vitellogenins in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001;48(2):72-80.
- 127 Finn RN. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosphovitins and other subdomains in vitellogenins. *Biol. Reprod.* 2007 Jun;76(6):926-35.
- 128 Dhadialla TS, Raikhel AS. Biosynthesis of Mosquito Vitellogenin. *J. Biol. Chem.* 1990 Jun 15;265(17):9924-33.

- 129 Raikhel AS, Dhadialla TS. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.* 1992;37(1):217-51.
- 130 Barr PJ. Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell.* 1991 Jul 12;66(1):1-3.
- 131 Rouille Y, Duguay SJ, Lund K, Furuta M, Gong Q, Lipkind G, Oliva AA Jr, Chan SJ, Steiner DF. Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Front Neuroendocrinol.* 1995 Oct;16(4):322-61.
- 132 Hiremath S, Lehtoma K. Complete nucleotide sequence of the vitellogenin mRNA from the gypsy moth: novel arrangement of the subunit encoding regions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1997 Jan;27(1):27-35.
- 133 Hiremath S, Lehtoma K. Structure of the gypsy moth vitellogenin gene. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1997;36(3):151-64.
- 134 Kageyama Y, Kinoshita T, Umesono Y, Hatakeyama M, Oishi K. Cloning of cDNA for vitellogenin of *Athalia rosae* (Hymenoptera) and characterization of the vitellogenin gene expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1994 Jun;24(6):599-605.
- 135 Martín D, Piulachs M-D, Comas D, Bellés X. Isolation and sequence of a partial vitellogenin cDNA from the cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae), and characterization of the vitellogenin gene expression. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1998;38(3):137-46.
- 136 Nose Y, Lee JM, Ueno T, Hatakeyama M, Oishi K. Cloning of cDNA for vitellogenin of the parasitoid wasp, *Pimpla nipponica* (Hymenoptera: Apocrita: Ichneumonidae): vitellogenin primary structure and evolutionary considerations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1997 Dec;27(12):1047-56.
- 137 Trewitt PM, Heilmann LJ, Degrugillier SS, Kumaran AK. The boll weevil vitellogenin gene: nucleotide sequence, structure, and evolutionary relationship to nematode and vertebrate vitellogenin genes. *J. Mol. Evol.* 1992 Jun;34(6):478-92.

- 138 Yano K, Sakurai MT, Watabe S, Izumi S, Tomino S. Structure and expression of mRNA for vitellogenin in *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1994 May 17;1218(1):1-10.
- 139 Munch D, Amdam GV. The curious case of aging plasticity in honey bees. *FEBS Lett*. 2010 Jun 18;584(12):2496-503.
- 140 Goto SG, Shiga S, Numata H. Photoperiodism in insects: perception of light and the role of clock genes. *Photoperiodism*. Oxford: Oxford University Press; 2010. p. 258-86.
- 141 Numata H, Udaka H. Photoperiodism in Mollusks. *Photoperiodism*. Oxford: Oxford University Press; 2010. p. 173-92.
- 142 Wang XW, Luan JB, Li JM, Bao YY, Zhang CX, Liu SS. De novo characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development. *BMC Genom*. 2010 Jun 24;11.
- 143 Scharf ME, Wu-Scharf D, Zhou X, Pittendrigh BR, Bennett GW. Gene expression profiles among immature and adult reproductive castes of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Insect Mol. Biol*. 2005 Jan;14(1):31-44.
- 144 Hagedorn HH, Maddison DR, ZhiJian T. The evolution of vitellogenins, cyclorrhaphan yolk proteins and related molecules. *Adv. Ins. Physiol.* (United Kingdom). 1998;27:335-84.
- 145 Amiri A, Bandani AR. Comparison of Energy Reserves in Prediapause and Diapausing Adult Sunn Pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae). *J. Agric. Sci. Techn.* 2013 May;15(3):435-44.
- 146 Shinyaeva LI. Spermatogenesis in the noxious pentatomid (*Eurygaster integriceps*) during the period of prediapause and diapause formation. *Zoologicheskii Zhurnal* 1980;59(7):1025-32
- 147 Denlinger DL. Hormonal control of diapause. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehen. Insect Physiol. Biochem. Pharma*. Oxford: Pergamon; 1985. p. 353–412.

148 Rutz W, Luscher M. The occurrence of vitellogenin in workers and queens of *Apis mellifica* and the possibility of its transmission to the queen. *J. Insect Physiol.* 1974 May;20(5):897-909.

149 Trenczek T, Engels W. Occurrence of vitellogenin in drone honeybees (*Apis mellifica*). *Int J. Invert.Reprod. Dev.* 1986;10(3):307-11.



8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Aslı Dağeri

Doğum Yeri: Adıyaman

Doğum Tarihi: 29.10.1985

Medeni Hali: Bekâr

Yabancı Dili: İngilizce, Almanca (başlangıç seviyesinde)

Eğitim Durumu

Lise: Adıyaman Anadolu Lisesi (1999-2003)

Lisans: Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji (2004-2008)

Yüksek Lisans: Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji (2008-2010)

İş Tecrübesi

Kurumu: TÜBİTAK 110O167 “Sünede Faydalı Genlerin Belirlenmesi”

Görevi: Proje Bursiyeri

Yılları: 2011-2013

Kurumu: Heinrich-Heine Üniversitesi, Evrimsel Genetik Enstitüsü

Görevi: Asistan Doktora Öğrencisi

Yılları: 08/2013-10/2013

Kurumu: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi

Görevi: Uzman

Yılları: 2014-...

9. TEZ DÖNEMİNDE YAPILAN YAYINLAR

Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Makaleler

Guz N, Toprak, U, Dageri A, Gurkan MO, Denlinger DL. Identification of a putative an antifreeze protein gene that is highly expressed during preparation for winter in the sunn pest, *Eurygaster maura*. *J. of Insect Physiol.* 2014, 68:30-35.

Guz N, Dağeri A, Erdoğan T, Mousavi M, Bayram Ş, Gürkan MO. Transcriptional profiling of transferrin gene from Egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*. *Türk. J. Biol.* 2013, 37(5), 582-590.

Ulusal Dergilerde Yayınlanan Derlemeler

Dağeri A, Guz N, Gürkan MO. Böceklerle mücadelede yeni bir strateji: RNA interferans. *Türk. Entomol. Bül.* 2012, 2(3) 223-230.

Guz N, Dağeri A, Aksoy S. Endosimbiyotik bakterilerin böcekler üzerine etkisi. *Türk. Entomol. Bül.* 2015, 5(2) 101-113.

Doktora Öncesi Yayınlar

Vural HC, Dageri A. Optimization of DNA isolation for RAPD PCR analysis of selected (*Echinaceae purpurea* L. Moench) medicinal plants of conservation concern from Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* 2009, 8(1), 16-19.

Dağeri A, Martin E, Şahin A. Cytogenetics of some of the Turkish drogs. *Int. J. Nat. Eng. Sci.* 2007, 1(3), 49-53.

KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Dageri A, Guz N, Toprak U, Gurkan MO. Vitellogenin genes in Sunn Pest (*Eurygaster maura* (Hemiptera: Scutelleridae)): Characterizations and Gene Expression Profiles. 18th International Plant Protection Congress 2015, Berlin, Almanya, Ağustos.

Guz N, Toprak U, Hegedus D, Coutu C, Dageri A, Mousavi M, Bayram Ş, Gürkan MO. Comparative fat body transcriptome analysis of Sunn Pest in overwintering and summer populations. 24th International Congress of Entomology 2012, Daegue, Güney Kore, Ağustos.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Dağeri A, Guz N, Toprak U, Gürkan MO. Süne embriyonal gelişimine moleküler bir bakış: Vitellogeninler. V. Bitki Koruma Kongresi 2014, Antalya, Şubat.

Guz N, Dageri A, Erdogan T, Mousavi M, Bayram S, Gürkan MO. Functional analysis of transferrin gene in *Spodoptera littoralis*. IVth Plant Protection Congress of Turkey 2011, Kahramanmaraş, Haziran.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Insect Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinsphys

Identification of a putative antifreeze protein gene that is highly expressed during preparation for winter in the sunn pest, *Eurygaster maura*



Nurper Guz^{a,*}, Umut Toprak^a, Asli Dageri^a, M. Oktay Gurkan^a, David L. Denlinger^b

^a Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Ankara, Ankara, Turkey

^b Departments of Entomology and Evolution, Ecology and Organismal Biology, Ohio State University, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2014

Received in revised form 19 June 2014

Accepted 30 June 2014

Available online 7 July 2014

Keywords:

Sunn pest

Antifreeze protein

Cold tolerance

Diapause

ABSTRACT

A cDNA library generated from the fat body of field-collected, diapausing adults of the sunn pest, *Eurygaster maura* revealed the presence of a transcript that encodes a protein that shares the distinct physiochemical and structural features of an insect antifreeze protein. The transcript, which is most abundant in the midgut, accumulates in adults as they leave the fields in late summer and migrate to surrounding mountainous areas to overwinter. Transcript abundance again declines when adults return to the fields the following spring. This winter pattern of abundance suggests that this protein may be critical for winter survival in the cold regions where the bug enters its obligatory diapause.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Several recent transcriptome studies reveal dramatic differences in gene expression between diapausing and nondiapausing insects (e.g. Baker and Russell, 2009; Ragland et al., 2010, 2011; Emerson et al., 2010; Poelchau et al., 2013). Prominent among such distinctions are genes that are up-regulated during diapause to enhance resistance to low temperature, desiccation, microbial attack, and other forms of environmental stress (Denlinger, 2002). The identification of such genes offers insights on specific mechanisms that may be used by the diapausing insect to successfully overwinter and may provide valuable biomarkers for identifying the insect's diapause status.

It was the goal of this project to identify key features of diapause and potential diapause-specific markers in the sunn pest, *Eurygaster maura* (Hemiptera: Scutelleridae), the dominant pest of cereal crops in the Near- and Middle-East, West and Central Asia, North Africa, and Eastern and Southern Europe (Brown, 1965; Critchley, 1998; Parker et al., 2002). This univoltine species feeds and completes its development in grain fields during spring and

summer and then migrates as an adult to the mountains in late summer where it enters an obligatory diapause. Diapause consists of two phases: an early period of aestivation during the hot, dry months of late summer and autumn and hibernation during the cold winter months (Critchley, 1998). In the spring, the adults terminate diapause and fly back to the fields where they mate and lay eggs. It is not at all clear how this insect survives in the mountains where prevailing temperatures in the overwintering areas can be as low as $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

In this study we used a targeted approach to identify genes that may contribute to the overwintering success of *E. maura*. Among genes of potential interest were those encoding antifreeze proteins (AFPs), a group of proteins once thought to be limited to Antarctic fish (DeVries, 1971) and a few insects (Duman, 1977; Duman et al., 1998), but now appear to be more widely distributed than originally assumed (Duman, 2001; Duman et al., 2010). A scan of the cDNA library for proteins with possible antifreeze protein domains revealed one conspicuous cDNA that reflects a pronounced winter pattern of expression, suggesting a prominent role for this gene in the insect's overwintering biology. The transcript is particularly abundant in the adult midgut. The fact that this predicted structure suggests that this cDNA may encode an antifreeze protein is consistent with the abundance of this transcript in overwintering adults.

* Corresponding author. Tel.: +90 312 596 1524; fax: +90 312 318 7029.

E-mail address: nurperguz@agri.ankara.edu.tr (N. Guz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.06.021>

0022-1910/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2. Materials and methods

2.1. Biological material

E. maura eggs were collected from wheat fields (Haymana Fields, Ankara, Turkey). Nymphal stages (1st to 5th stage) and one-week old adults were obtained from the hatched eggs for developmental expression analyses. These insects were reared on wheat pots in a rearing room set at 20 °C and 16:8 h light-dark photoperiod. Insects used for tissue specific expression analysis were dissected immediately after being transferred from the field to the laboratory.

The time course studies were conducted using adult males and females collected from wheat fields (Haymana Fields) or overwintering areas (Beynam Forests) in Ankara Province, Turkey. The time points include (1) Aestivation (aestivating adults in the higher mountain altitudes in September), (2) Pre-hibernation (adults preparing for hibernation in the lower mountain altitudes in October), (3) Hibernation (hibernating adults under the soil/snow blanket in the mountains in December), (4) Pre-migration (adults preparing for migration from the mountain in April), (5) Migrated (newly-migrated adults in the field in May) and (6) Feeding (new generation, actively feeding adults in the field in July). Time-course studies were conducted separately for females and males due to their physiological differences (e.g. potential differences in timing of reproductive processes). Females and males were separated according to the genital segment on the abdomen (Critchley, 1998).

2.2. Tissue dissection

Fat body, midgut, ovary, Malpighian tubules, trachea, head, flight muscles and nervous system (brain in the head and ganglia in each body segment) were dissected from 25 adult females using sterilized forceps under a dissecting microscope in ice-cold phosphate buffered saline (pH 7.4). Total RNA was isolated from tissues using TRizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. An additional DNase digestion was performed using RNase-Free DNase (Ambion).

2.3. Sequencing

A fat body cDNA library was constructed from overwintering *E. maura* adults using a 454 GS FLX (Roche). The fat body was dissected from approximately 50 adults and collected in a tube containing 1.0 ml TRizol reagent (Invitrogen). Tissue was homogenized and total RNA was extracted according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Total RNA quality was assessed on an RNA 6000 Pico Chip using an Agilent 2100 Bioanalyzer. The cDNA library construction involved fragmentation of total RNA using the Zinc Chloride method, and fragments were purified with selection for 300–1000 nt size fragments using a "cDNA Rapid Library Prep kit" (Roche). RNA fragments were used to prepare libraries for 454 pyrosequencing according to the manufacturer's instructions (Roche). The output from the GS FLX titanium sequencing runs was assembled into contigs and annotated via a BLAST algorithm using Newbler assembler (version 2.3). The cDNA library was scanned for proteins with antifreeze protein domains using National Center for Biotechnology Information Conserved Domain Search (Marchler-Bauer et al., 2011).

2.4. Antifreeze protein sequence features and phylogeny

Evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The percentage of replicate trees

in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches (Felsenstein, 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method (Zuckerkanndl and Pauling, 1965) and are in units of the number of amino acid substitutions per site. A phylogenetic analysis was based on proteins in GenBank with AFP domains, including the AFP identified in *E. maura* from this study, five AFPs from Coleoptera, four from Lepidoptera, and two AFPs from Diptera that were reported in the NCBI database. All positions containing gaps and missing data were eliminated. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 (Tamura et al., 2011).

The putative antifreeze protein from *E. maura* (EmAFP) and motif predictions were assessed using InterProScan software (Hunter et al., 2011). Physicochemical properties were calculated from the primary structure of EmAFP using parameters that included theoretical isoelectric point (pI), molecular weight, extinction coefficient (Gill and Von Hippel, 1989), half-life (Tobias et al., 1991), instability index (Guruprasad et al., 1990), aliphatic index (Ikai, 1980) and grand average hydropathicity (GRAVY) (Kyte and Doolittle, 1982), based on the Expasy's ProParam (Gasteiger et al., 2005) (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) prediction server. The subcellular localization of EmAFP was predicted using TargetP (www.expasy.org/tools), and predictions of signal peptides were identified using the SignalP server (www.expasy.org/tools) (Emanuelsson et al., 2007). N- and O-glycosylation sites of EmAFP were predicted using NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) and NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). Tertiary structure of EmAFP was predicted using the UCSF Chimera package (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) and Phyre web server (Kelley and Sternberg, 2009) and visualized by the Rasmol tool (Sayle and Milner-White, 1995). Disulfide bridges were analyzed using the CYS-REC tool which predicts the most probable bonding patterns between available cysteine residues (CYS_REC.<http://sun1.softberry.com/berry>).

2.5. Real time PCR (RT-PCR) Analyses

Real time PCR analyses were conducted to examine tissue-specific and stage-specific expression of the transcript as well as expression at biologically-important times throughout the life of the sunn pest. Tissue-specific expression was examined in the fat body, midgut, ovary, Malpighian tubules, trachea, head, flight muscles and nervous system of adult females, and stage-specific expression was examined in the egg, 1st-, 2nd-, 3rd-, 4th-, 5th nymphal and adult stages of females. The monitoring of expression in field-collected adults utilized adults collected at diverse stages including aestivation, pre-hibernation, hibernation, pre-migration, migrated and new generation as described above.

The cDNAs used for expression analyses were generated from total RNA using the "Transcriptor first strand cDNA synthesis kit" (Roche) according to the manufacturer's instructions. qRT-PCR was performed using the primer pair *EmAFP* F: 5' ACT CCA TTC AGT GTC TTG CC 3' and *EmAFP* R: 5' CAG ATC GAG GAT TCC AAG CTG 3'. The RT-PCR reaction was performed using LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche). Amplification conditions consisted of an initial pre-incubation at 95 °C for 10 min, followed by amplification of the target DNA with 35 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 1 s and 1 cycle of cooling at 40 °C for 10 s using a LightCycler 480 (Roche). A standard curve was generated for each set of primers and efficiency of each reaction was determined. Three biological replicates were prepared for each sample and three technical replicates were performed for each biological replicate. The data were normalized to an internal control, α -Tubulin (*EmTUB*)

mRNA, which was also obtained from the sunn pest fat body cDNA library. Transcript quantification for *tubulin* was performed using the primer pair *EmTUB* F: 5' CTC TAC TTA TGG AAC GCC TGT C 3' and *EmTUB* R: 5' GTC GGA GTG TTC AAG AGT GG 3'. The raw CT values were quantified to represent relative expression levels of each transcript using a modified comparative CT method (Pfaffl, 2001). Statistical analyses were performed using SPSS 16.0 software. Statistical significance was determined using One-way ANOVA and Duncan's multiple range tests; a *P*-value less than 0.05 was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Putative antifreeze protein sequence features and phylogeny

We identified a putative antifreeze protein from the cDNA library generated from the fat body of overwintering adults. The *EmAFP* cDNA was 334 bp in length and contained a putative open reading frame (ORF) of 291 bp encoding a 96 amino acid polypeptide. BLAST analysis revealed that the *EmAFP* shares similarity with other known AFPs. The highest homology was found with *Choristoneura fumiferana* antifreeze protein isoform 2.7a, which consists of 92 amino acids (52% identity). A comparison of the deduced amino acid sequence of the *EmAFP* cDNA with that of other insect AFP sequences is shown in Fig. 1. A phylogenetic tree, based on the alignment of amino acid sequences using the Clustal method (Fig. 2), shows that the insect AFPs are clustered in two main branches. One main branch consists of lepidopteran and the *E. maura* AFP, while the other consists of the coleopteran AFPs.

Interproscan revealed that the *EmAFP* sequence contains 'Insect Antifreeze Protein' motifs. Insect AFPs typically contain cysteines at every sixth residue and are characterized by 7 repeats of 12- or 13-mers (Thr-Cys-Thr motifs) (Graham et al., 1997; Liou et al., 2000). The Cys residues can form stable disulfide bridges throughout the protein and are flanked by Thr residues. These residues on the planar surface are thought to be the ice binding sites (Graether et al., 2000). *EmAFP* has conserved Cys residues and putative 'Thr buton' ice binding motifs (Thr-X-Thr; where X stands for any amino acid) every 12-13 residues, features typical of antifreeze protein repeats (Fig. 3). *EmAFP* has a predicted molecular weight of 10184.7 Da and an isoelectric point of 8.43. The computed *pI* value of *EmAFP* reveals that it is basic in character (*pI* > 7), a result that will be essential for developing buffer systems for protein purification by isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. The biocomputed half-life of *EmAFP* is greater than 20h. A protein with an instability index smaller than 40 is predicted to be stable, while a value above 40 predicts an unstable protein (Guruprasad et al., 1990). Based on the instability index ExPASy's ProtParam, *EmAFP* would be classified as stable (Instability index < 40). The aliphatic index of a protein is defined as the relative volume occupied by aliphatic side chains (alanine, valine, isoleucine, and leucine) and is regarded as a positive factor for thermostability of globular proteins. The very high aliphatic index

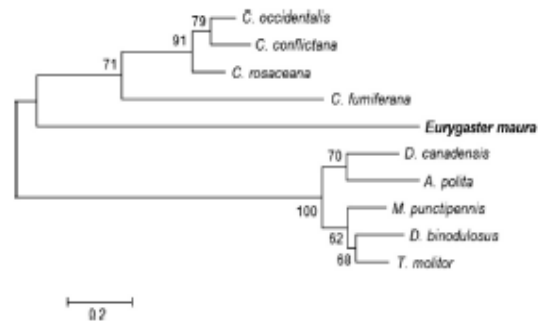


Fig. 2. Phylogenetic analysis of antifreeze proteins (AFP) from various insects. The species and GenBank accession numbers of the antifreeze sequences used to construct the phylogenetic tree are as follows: *Choristoneura occidentalis* AAW52735.1; *Choristoneura conflictana* AAW52729.1; *Choristoneura rosaceana* AAW52737.1; *Choristoneura fumiferana* AAK19295.1; *Dendroides canadensis* AAF86368.1; *Anatolica polita* ADU57095.1; *Microdera punctipennis* ADJ93819.1; *Dorcus binodulosus* BAF43606.1; *Tenebrio molitor* AFD54428.1.

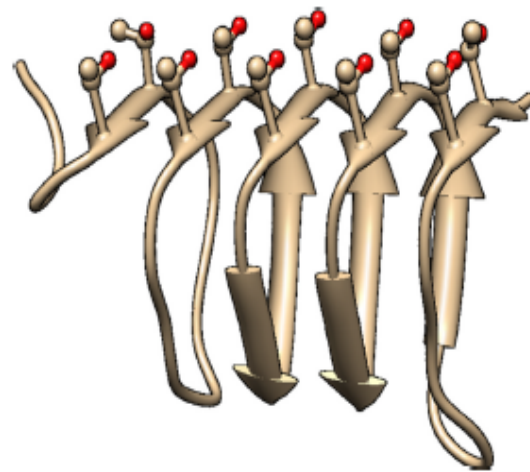


Fig. 3. Molecular model of the putative *EmAFP* with Thr residues 27, 29, 43, 45, 58, 60, 73, 75, 88, and 90.

of *EmAFP* (92.40) infers that this protein may be stable over a wide temperature range. The GRAVY (Low Grand Average hydropathy) value for a peptide or protein is calculated as the sum of hydropathy values of all the amino acids, divided by the number of residues in the sequence (Kyte and Doolittle, 1982). The (GRAVY) Index of *EmAFP* (0.0190) predicts that the putative AFP protein would have a strong interaction with water. The server SOSUI classifies the *EmAFP* as a soluble protein. *EmAFP* contains a putative signal peptide sequence, suggesting that this protein is secreted and primarily functions in extracellular space. The existence of signal peptides

<i>E. maura</i>	MFSQFVGLAFAFYVADNCLPAICACVVIDAASRCERSVQDSDRYRSEVLINLSTFQIREDSHKQKSTPSQVWGTGLNGVYDNIITIAS
<i>C. fumiferana</i>	SSDQVCSKSKSINSQCVNFCIVVNSQVYFSTCERKNGIYIYDQDRIIPGCSISHCQDGSAAADACKSISGCTLSAN
<i>C. rosaceana</i>	QISQYBRKNSANLADINDQVETDQVYSGANVMEANSENIRSSVAFDSTNSQYDGIYIYDQDRIIP
<i>C. occidentalis</i>	QISRSBRKNSANLADINDQVETDQVYSGANVMEANSENIRSSVAFDSTNSQYDGIYIYDQDRIIP
<i>C. conflictana</i>	QISRSBRKNSANLADINDQVETDQVYSGANVMEANSENIRSSVAFDSTNSQYDGIYIYDQDRIIP
<i>D. canadensis</i>	SLLLVISVANKFCHCYGQVSDCCQVSCCTDQVCPARTACTQSNQINALDQDHCNRAKQDQVYDQDRIIP
<i>M. punctipennis</i>	TRWFLIAYVWQVCSKSKSINSQCVNFCIVVNSQVYFSTCERKNGIYIYDQDRIIPGCSISHCQDGSAAADACKSISGCTLSAN
<i>A. polita</i>	ECYQCTQDCFSCHRECTQVNSQVAFDQSQVNSQVYSGANVMEANSENIRSSVAFDSTNSQYDGIYIYDQDRIIP
<i>D. binodulosus</i>	ESWLVAVVWQVCSKSKSINSQCVNFCIVVNSQVYFSTCERKNGIYIYDQDRIIPGCSISHCQDGSAAADACKSISGCTLSAN
<i>T. molitor</i>	AVTVMVLTFRVYVQVYDQVYSGANVMEANSENIRSSVAFDQDRIIPGCSISHCQDGSAAADACKSISGCTLSAN

Fig. 1. Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of AFP proteins from different insects. Sequences were aligned in Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and shaded using the BoxShade program at http://www.chembnet.org/software/BOX_form.html. The boxes in the alignment indicate the conserved putative ice-binding 'threonine butons' of the Thr-Xaa-Thr motifs.

is consistent with antifreeze proteins being secreted molecules, found mainly in the hemolymph and other extracellular fluids, as shown for beetles (Duman et al., 1998, 2004). Using the NetNGlyc and NetOGlyc web servers, we examined the amino acid sequence of EmAFP for possible N- and O-linked glycosylation. EmAFP was not predicted to contain N-linked glycosylation while it was predicted to possess only two O-linked glycosylation sites. The EmAFP sequence was modeled with 90% confidence and the mature peptides of EmAFP are predicted to form a left-handed β -helix (Fig. 3). SS-bonding states of cysteines and locations of disulfide bridges in EmAFP were predicted using the primary structure by the tool CYS_REC. The four cysteines found at positions 37, 51, 77 and 143 are probable sites of disulfide bonds.

3.2. Tissue and developmental specific expression of EmAFP

Quantitative analysis of EmAFP transcripts in adult tissues and organs including fat body, midgut, ovary, Malpighian tubules, head, trachea, flight muscles and nervous system suggests tissue-specific patterns of mRNA abundance. High abundance of EmAFP mRNA was observed only in the midgut (Fig. 4A); expression was much lower in all other tissues.

AFPs have been described previously in the hemolymph and gut fluid of freeze-tolerant and freeze-avoiding arthropods (Ramsay, 1964; Duman, 2001, 1984; Duman and Serianni, 2002; Duman et al., 2010; Wharton et al., 2009), but in *C. fumiferana* both Northern blot and in situ hybridization analysis confirmed that AFP transcripts are restricted to gut tissues (Qin et al., 2006). The discovery of tissue-specific differences in the AFPs of *D. canadensis* (DAFP), i.e. fat body, gut epithelia and hemolymph, suggest that diverse DAFPs may have evolved slightly different functions (Duman et al., 2002). Beetles in the genus *Rhagium* have thermal hysteresis antifreeze agents in their intracellular fluid as well as in the intestinal fluid and in the hemolymph, suggesting that all three compartments are well protected against spontaneous ice nucleation at low sub-zero temperatures (Kristiansen et al., 1999). Like many overwintering insects, larvae of the beetle *Rhagium mordax* empty their gut contents during autumn, a mechanism that removes potential ice nucleators (Wilkens and Ramløv, 2008), yet AFPs were still observed within the gut lumen in both winter and summer larvae (Johannes, 2013). Recently, DAFP transcripts were identified in Malpighian tubule epithelia, suggesting that DAFPs can inhibit ice nucleators present in insect primary urine, a potentially important site that may contain endogenous ice nucleating compounds that could induce freezing (Nickell et al., 2013). Although potent endogenous and exogenous ice nucleators have been found in several anatomic locations within insects including hemolymph (Zachariassen and Hamel, 1976; Duman and Patterson, 1978; Duman, 1980; Neven et al., 1986), Malpighian tubules (Lee et al.,

1992a) and gut fluid (Lee et al., 1991), the insect gut is the anatomic region most commonly associated with initiation of heterogeneous ice nucleation (Lee et al., 1993). Several species of ice nucleating active bacteria and fungi have also been isolated from the insect gut and have been shown to influence the insect's supercooling capacity (Kaneko et al., 1991a,b; Strong-Gunderson et al., 1990; Lee et al., 1991, 1992b). To enhance supercooling, these microorganisms must be evacuated from the gut or the expression of the phenotypes in the gut flora must be diminished or eliminated prior to overwintering (Lee et al., 1993). Interestingly, evacuation of bacterial ice nucleators, combined with masking of these nucleators by AFPs, appear to contribute to maintaining the supercooled state of freeze-avoidance in larvae of *D. canadensis* by extending the supercooling capacity of the gut fluid (Olsen and Duman, 1997b). The microbial fauna of the sunn pest is still undefined, thus it is unknown whether symbionts of the sunn pest interact with the host to possibly affect overwintering physiology.

Expression of the EmAFP gene was also profiled for all stages of development including egg, the five nymphal instars and adults (Fig. 4B). Expression of EmAFP was specific to the adults, the stage that overwinters. Similarly, most other AFPs were identified in insects during their overwintering stages, i.e. darkling beetles (Duman, 1977); fire colored beetles (Olsen and Duman, 1997a; Olsen et al., 1998; Duman, 1980, 2001; Duman et al., 2002) and mealworm beetles (Graham et al., 1997). Overwintering larvae of the beetle *D. canadensis* produce AFPs (Olsen et al., 1998; Duman, 2001; Duman et al., 2002), and in the spruce budworm, AFP gene expression is most abundant in the second instar larva, which is the overwintering stage of this moth (Qin et al., 2006), however AFP mRNAs are also present in spruce budworm eggs and first instars, both of which are nondiapausing stages (Qin et al., 2007). While *CAFP* appears to be developmentally regulated, i.e. not directly controlled by environmental conditions such as photoperiod or temperature (Doucet et al., 2000), *TmAFP* transcripts present in quiescent larvae of *Tenebrio* are responsive to environmental conditions (Qin and Walker, 2006).

3.3. Expression of putative EmAFP in association with diapause

To determine the expression pattern of putative EmAFP in relation to diapause both males (Fig. 5A) and females (Fig. 5B) of *E. maura* were monitored throughout the phases of their adult life, including pre-diapause, diapause and post-diapause, as well as in the new spring generation of bugs. Real-time PCR analysis showed that transcript expression was highest in the pre-diapause stage of the adult. In adult males of *E. maura*, the transcript was expressed primarily during late summer aestivation and pre-hibernation. More than a 50-fold increase in expression ($P < 0.05$) was detected both in aestivating individuals at high altitudes in the mountains

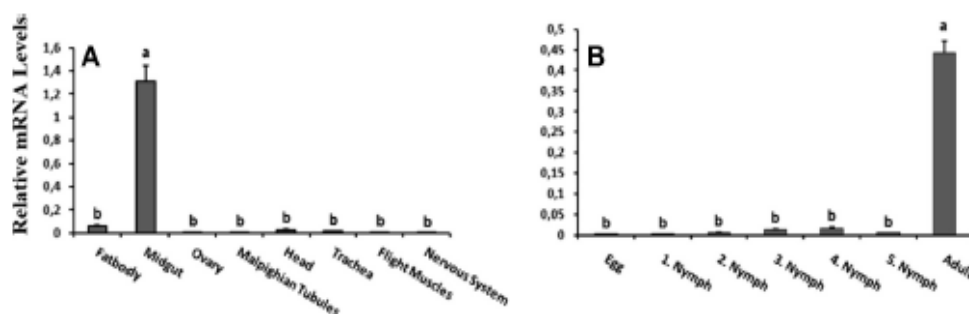


Fig. 4. qRT-PCR analysis of (A) adult tissue-specific expression and (B) developmental expression of EmAFP. Letters indicate statistically significant differences according to One-way ANOVA and Duncan's multiple range tests.

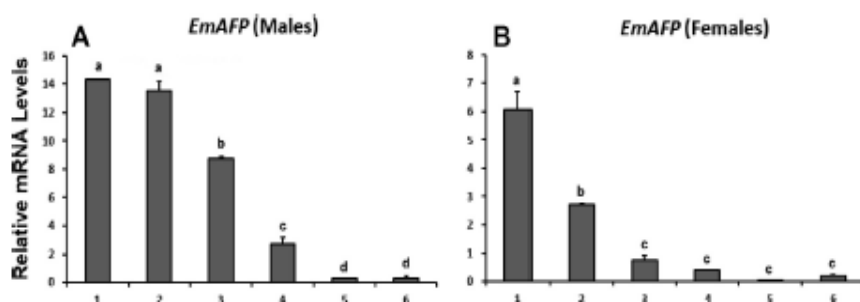


Fig. 5. Expression of *EmAFP* in (A) males and females (B) of *E. maura* throughout phases of their adult life. RT-PCR was conducted with total RNA from adults collected at 6 time points: (1) aestivation, aestivating adults that have migrated in the autumn to high altitudes in the mountains, (2) pre-hibernation, adults preparing for hibernation at lower altitudes in the mountains, (3) hibernation, hibernating adults found under the soil/snow blanket in the mountains, (4) pre-migration, adults preparing for migration in the mountains, (5) migrated, newly-migrated adults present in the grain fields and (6) feeding, actively-feeding adults of the next generation, collected in the fields. Letters indicate statistically significant differences according to One-way ANOVA and Duncan's multiple range tests.

and in adults preparing for hibernation at lower altitudes. Then, expression decreased nearly two fold in hibernating adults ($P < 0.05$). At the end of hibernation, while the insects were still in the mountains but preparing for migration, expression continued to be down-regulated. By the time the adults migrated to the grain fields expression of the putative AFP transcript was dramatically reduced. Expression patterns were similar in males and females but transcript levels remained consistently higher in males.

After returning to the fields in early spring, adults of the sunn pest reproduce and then die. The next generation feeds, develops and accumulates the fat reserves needed for the following overwintering period. Based on our transcript results, putative AFPs begin to be generated in the autumn while the insect is aestivating and during the preparatory phase for the overwintering diapause, but during diapause, expression declines, presumably because a sufficient titer of putative AFPs has already been generated. This is similar to the case of *D. canadensis*, in which AFP transcript levels peak in December, prior to the advent of the coldest months (Andorfer and Duman, 2000). Larvae of the spruce budworm, *C. fumiferana*, synthesize AFPs, as well as other cryoprotectants, prior to as well as throughout their second-instar diapause (Han and Baucé, 1993; Walker et al., 2001), and transcript levels decrease significantly after the breaking of diapause (Qin et al., 2006). Expression of two AFP genes from the desert beetle, *Anatolica polita*, is high in cold seasons and low during warm seasons, however, there is still significant expression of both antifreeze genes during the hottest months, suggesting other possible functions for these proteins beyond antifreeze activity (Ma et al., 2012). AFP activity varies during the year in *R. mordax*, ranging from low activity during spring/summer to high activity in winter (Wilkins and Ramløv, 2008). Expression of the AFP genes in *Tetranychus urticae* is more affected by diapause status than by low temperature, suggesting that in some cases the physiological status is more important than environmental factors in eliciting expression (Bryon et al., 2013). Thus, the available evidence suggests that both developmental status and environmental conditions can dictate the expression of AFPs, depending on the species.

Although the cDNA we have identified from *E. maura* has all the hallmarks of a gene encoding an antifreeze protein, functional studies are still needed to demonstrate its antifreeze properties, thus we continue to refer to this gene product as a putative AFP. The expression profiles are both stage and tissue specific, and the fact that the transcripts accumulate before the onset of diapause suggests that the encoded protein is likely used during obligate diapause in the sunn pest as a critical component of its overwintering success.

Acknowledgements

This research was funded by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK - Grant no: 1100167). We are grateful to Myrtle Harrington (Agriculture and Agri Food Canada, Canada) for *EmAFP* modelling.

References

- Andorfer, C.A., Duman, J.G., 2000. Isolation and characterization of cDNA clones encoding antifreeze proteins of the pyrochroid beetle *Dendroides canadensis*. *J. Insect Physiol.* 46, 365-372.
- Baker, D.A., Russell, S., 2009. Gene expression during *Drosophila melanogaster* egg development before and after reproductive diapause. *BMC Genomics* 10, 242.
- Brown, E.S., 1965. Notes on the migration and directions of flight of *Eurygaster* and *Aelia* species (Hemiptera, Pentatomidae) and their possible bearing of the invasion of cereal crops. *J. Anim. Ecol.* 34, 93-107.
- Bryon, A., Wybouw, N., Dermauw, W., Tirry, L., Van Leeuwen, T., 2013. Genome wide gene-expression analysis of facultative reproductive diapause in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *BMC Genomics* 14, 815.
- Critchley, B.R., 1998. Literature review of sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. (Hemiptera, Scutelleridae). *Crop Prot.* 17, 271-287.
- Denlinger, D.L., 2002. Regulation of diapause. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 93-122.
- DeVries, A.L., 1971. Glycoproteins as biological antifreeze agents in antarctic fishes. *Science* 172, 1152-1155.
- Doucet, D., Tyshenko, M.G., Kuiper, M.J., Graether, S.P., Sykes, B.D., Daugulis, A.J., Davies, P.L., Walker, V.K., 2000. Structure-function relationships in spruce budworm antifreeze protein revealed by isoform diversity. *Eur. J. Biochem.* 267, 6082-6088.
- Duman, J.G., 1977. Variations in macromolecular antifreeze levels in larvae of the darkling beetle, *Melanzantha contracta*. *J. Exp. Zool.* 201, 85-92.
- Duman, J.G., 1980. Factors involved in the overwintering survival of the freeze tolerant beetle, *Dendroides canadensis*. *J. Comp. Physiol. B.* 136, 53-59.
- Duman, J.G., 1984. Thermal hysteresis antifreeze proteins in the midgut fluid of overwintering larvae of the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Exp. Zool.* 230, 355-361.
- Duman, J.G., 2001. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 327-357.
- Duman, J.G., Patterson, J., 1978. The role of ice nucleators in the frost tolerance of overwintering queens of the bald faced hornet, *Vespa maculata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 59A, 69-72.
- Duman, J.G., Seriani, A.S., 2002. The role of endogenous antifreeze protein enhancers in the hemolymph thermal hysteresis activity of the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Insect Physiol.* 48, 103-111.
- Duman, J.G., Parmalee, D., Goetz, F.W., Li, N., Wu, D.W., Benjamin, T., 1998. Molecular characterization and sequencing of antifreeze proteins from larvae of the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Comp. Physiol. B.* 168, 225-232.
- Duman, J.G., Verleye, D., Li, N., 2002. Site-specific forms of antifreeze protein in the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Comp. Physiol. B.* 172, 547-552.
- Duman, J.G., Bennett, V., Sforzo, T., Hochstrasser, R., Barnes, B.M., 2004. Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders. *J. Insect Physiol.* 50, 103-111.
- Duman, J.G., Walters, K.R., Sforzo, T., Carrasco, M., Nickell, P.K., Barnes, B.M., 2010. Antifreeze and ice nucleator proteins. In: Denlinger, D.L., Lee, R.E., Jr. (Eds.), *Low Temperature Biology of Insects*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 65-93.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* 2, 953-971.

- Emerson, K.J., Bradshaw, W.E., Holsapfel, C.M., 2010. Microarrays reveal early transcriptional events during the termination of larval diapause in natural populations of *Wyeomyia smithii*. *PLoS ONE* 5, e9574.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker, J.M. (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 571-607.
- Gill, S.C., von Hippel, P.H., 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- Graether, S.P., Kuiper, M.J., Gagné, S.M., Walker, V.K., Jia, Z., Sykes, B.D., Davies, P.L., 2000. Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature* 406, 325-328.
- Graham, L.A., Liou, Y.C., Walker, V.K., Davies, P.L., 1997. Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature* 388, 727-728.
- Guruprasad, K., Reddy, B.V.P., Pandit, M.W., 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng.* 4, 155-164.
- Han, E.N., Bauce, E., 1993. Physiological changes and cold hardness of spruce budworm larvae, *Choristoneura fumiferana* (Germ.), during pre-diapause and diapause development under laboratory conditions. *Can. Entomologist* 125, 1043-1053.
- Hunter, S., Jones, P., Mitchell, A., Apweiler, R., Attwood, T.K., Bateman, A., Bernard, T., Birns, D., Bork, P., Burge, S., de Castro, E., Gonnelli, P., Corbett, M., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L., Finn, R.D., Fraser, M., Gough, J., Haefliger, D., Hulo, N., Kahn, D., Kelly, E., Letunic, I., Lonsted, D., Lopez, R., Madera, M., Maslen, J., McAnulla, C., McDowell, J., McMenamin, C., Mi, H., Mutowo-Muellenet, P., Mulder, N., Natale, D., Orengo, C., Pesseat, S., Punta, M., Quirion, A.F., Rivoire, C., Sangrador-Vegas, A., Selengut, J.D., Sigrist, C.J.A., Scheremetjew, M., Tate, J., Thimmajanantharan, M., Thomas, P.D., Wu, C.H., Yeats, C., Yong, S., 2011. InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res.* <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr948>.
- Ikei, A.J., 1980. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J. Biochem.* 88, 1895-1898.
- Johannes, L., 2013. Localisation of antifreeze proteins in *Rhagium mordax* by immunofluorescence. 5th International Symposium on the Environmental Physiology of Ectotherms and Plants. August 12-16, London, Ontario, Canada.
- Kaneko, J., Kita, K., Tanno, K., 1991a. INA bacteria isolated from the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. pupae (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 35, 7-11.
- Kaneko, J., Yoshida, T., Owada, T., Kita, K., Tanno, K., 1991b. *Erwinia herbicola*: ice nucleating active bacteria isolated from diamondback moth, *Plutella xylostella* L. pupae. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 35, 247-251.
- Kelley, L.A., Sternberg, M.J.E., 2009. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* 4, 363-371.
- Kristiansen, E., Pedersen, S., Ramløv, H., Zachariassen, K.E., 1999. Antifreeze activity in the cerambycid beetle *Rhagium inquisitor*. *J. Comp. Physiol. B* 169, 55-60.
- Kyte, J., Doolittle, R., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Lee, R.E., Strong-Gunderson, J.M., Lee, M.R., Grove, K.S., Riga, T.J., 1991. Isolation of ice nucleating active bacteria from insects. *J. Exp. Zool.* 257, 124-127.
- Lee, R.E., Mugnano, J.A., Taylor, R.T., 1992a. Endogenous crystalloid spheres regulate the supercooling point of the gall fly, *Eurosta solidaginis*. *Cryobiology* 29, 750-751.
- Lee, M.R., Lee, R.E., Strong-Gunderson, J.M., Minges, S.R., 1992b. Treatment with ice-nucleating active fungi and surfactants decrease insect supercooling capacity. *Cryobiology* 29, 743.
- Lee, R.E., Lee, M.R., Strong-Gunderson, J.M., 1993. Review: insect cold-hardiness and ice nucleating active microorganisms including their potential use for biological control. *J. Insect Physiol.* 39, 1-12.
- Liou, Y.C., Todj, A., Davies, P.L., Jia, Z., 2000. Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a beta-helix antifreeze protein. *Nature* 406, 322-324.
- Ma, J., Wang, J., Mao, X.F., Wang, Y., 2012. Differential expression of two antifreeze proteins in the desert beetle *Anatolica polita* (Coleoptera: Tenebrionidae): seasonal variation and environmental effects. *CryoLetters* 33, 337-348.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., et al., 2011. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* 39, D225-D229.
- Neven, L.G., Duman, J.G., Beals, J.M., Castellino, F.J., 1986. Overwintering adaptations of the stag beetle, *Ceruchus piceus*: removal of ice nucleators in winter to promote supercooling. *J. Comp. Physiol. B* 156, 707-716.
- Nickell, P.K., Sass, S., Verleye, D., Blumenthal, E.M., Duman, J.G., 2013. Antifreeze proteins in the primary urine of larvae of the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Exp. Biol.* 216, 1695-1703.
- Olsen, T.M., Duman, J.G., 1997a. Maintenance of the supercooled state in overwintering pyrochroid beetle larvae *Dendroides canadensis*: role of hemolymph ice nucleators and antifreeze proteins. *J. Comp. Physiol. B* 167, 105-113.
- Olsen, T.M., Duman, J.G., 1997b. Maintenance of the supercooled state in the gut of overwintering pyrochroid beetle larvae, *Dendroides canadensis*: role of gut ice nucleators and antifreeze proteins. *J. Comp. Physiol. B* 167, 114-122.
- Olsen, T.M., Sass, S.J., Li, N., Duman, J.G., 1998. Factors contributing to increases in inoculative freezing resistance in overwintering fire-colored beetle larvae *Dendroides canadensis*. *J. Exp. Biol.* 201, 1585-1594.
- Parker, B.L., Costa, S.D., Skinner, M., Bouhsini, M.E., 2002. Sampling sunn pest (*Eurygaster integriceps* Puton) in overwintering sites in northern Syria. *Turkey J. Agric. Forest* 26, 109-117.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Poelchau, M.P., Reynolds, J.A., Denlinger, D.L., Elsik, C.G., Armbruster, P.A., 2013. Transcriptome sequencing as a platform to elucidate molecular components of the diapause response in the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *Physiol. Entomol.* 38, 173-181.
- Qin, W., Walker, V.K., 2006. *Tenebrio molitor* antifreeze protein gene identification and regulation. *Gene* 15, 142-149.
- Qin, W., Tyshenko, M.G., Doucet, D., Walker, V.K., 2006. Characterization of antifreeze protein gene expression in summer spruce budworm larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 210-218.
- Qin, W., Doucet, D., Tyshenko, M.G., Walker, V.K., 2007. Transcription of antifreeze protein genes in *Choristoneura fumiferana*. *Insect Mol. Biol.* 16, 423-434.
- Ragland, G.J., Denlinger, D.L., Hahn, D.A., 2010. Mechanisms of suspended animation are revealed by transcript profiling of diapause in the flesh fly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 14809-14814.
- Ragland, G.J., Egan, S.P., Feder, J.L., Berlocher, S.H., Hahn, D.A., 2011. Developmental trajectories of gene expression reveal candidates for diapause termination: a key life-history transition in the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella*. *J. Exp. Biol.* 214, 3948-3959.
- Ramsay, J.A., 1964. The rectal complex of the mealworm, *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae). *Philos. Trans. R. Soc. B* 248, 279-314.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Sayle, R., Milner-White, E.J., 1995. RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci. (TIBS)* 20, 374.
- Strong-Gunderson, J.M., Lee, R.E., Lee, M.R., Riga, T.J., 1990. Ingestion of ice nucleating active bacteria increases the supercooling point of the lady beetle, *Hippodamia convergens*. *J. Insect Physiol.* 36, 153-157.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Tobias, J.W., Shrader, T.E., Rocap, G., Varshavsky, A., 1991. The N-end rule in bacteria. *Science* 254, 1374-1377.
- Walker, V.K., Kuiper, M.J., Tyshenko, M.G., Doucet, D., Graether, S.P., Liou, Y.-C., Sykes, B.D., Jia, Z., Davies, P.L., Graham, L.A., 2001. Surviving winter with antifreeze proteins: Studies on budworms and beetles. In: Denlinger, D.L., Giehlbultowicz, J.M., Saunders, D.S. (Eds.), *Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 199-212.
- Wharton, D.A., Powb, B., Kristensen, M., Ramløv, H., Marshall, J.C., 2009. Ice-active proteins and cryoprotectants from the New Zealand alpine caddisfly, *Celatoblatta quinqueannulata*. *J. Insect Physiol.* 55, 27-31.
- Wilkens, C., Ramløv, H., 2008. Seasonal variations in antifreeze protein activity and haemolymph osmolality in larvae of the beetle *Rhagium mordax* (Coleoptera: Cerambycidae). *CryoLetters* 29 (4), 293-300.
- Zachariassen, K.E., Hammel, H.T., 1976. Nucleating agents in the haemolymph of insects tolerant to freezing. *Nature* 262, 285-287.
- Zuckerland, E., Pauling, L., 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson, V., Vogel, H.J. (Eds.), *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press, New York, pp. 97-166.

Transcriptional profiling of *transferrin* gene from Egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis**

Nurper GÜZ**, Aslı DAĞERİ, Tuğba ERDOĞAN, Mouzhgan MOUSAVI, Şerife BAYRAM, Mehmet Oktay GÜRKAN
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ankara University, Dışkapı, Ankara, Turkey

Received: 21.03.2013 • Accepted: 05.04.2013 • Published Online: 06.09.2013 • Printed: 04.10.2013

Abstract: Iron is an essential nutrient for almost all organisms, but it is also a potent toxin because it can catalyze oxidative reactions that are destructive to cells. Transferrin is an essential protein involved in iron metabolism, immunity, and vitellogenesis in insects. We have characterized a cDNA encoding a putative iron-binding transferrin (*SpliTrf*) in Egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), an important pest that causes extensive losses in many vegetable, fodder, and fiber crops. The structure of the putative *SpliTrf* showed significant homology to other insect transferrins. Gene expression of *SpliTrf* was examined from different adult tissues including the fat body, midgut, Malpighian tubules, nervous system, hemolymph, and ovaries, as well as from different host developmental stages. Transcripts for *SpliTrf* were detected in all developmental stages, but *SpliTrf* was found to be preferentially expressed in the fat body tissue. Furthermore, we analyzed *SpliTrf* expression in response to *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus, *SpliNPV*, and *Bacillus thuringiensis* infection. Our results show that while *SpliTrf* expression is upregulated upon bacterial infection, it is downregulated upon baculoviral infection. We discuss the role of transferrin in iron metabolism as well as in host immune physiology.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, baculovirus, *SpliNPV*, *Spodoptera littoralis*, *transferrin*

1. Introduction

Insect immune responses involved in virus defense have lately received increasing attention. While the pathways and effector molecules active in defense against bacteria and fungi are well studied (Ferrandon et al., 2007; Levitin et al., 2008), the regulation of the innate immune system against viral infections still remains to be elucidated. The baculoviruses (Baculoviridae) are double-stranded DNA viruses that infect arthropods, mainly insects and in particular Lepidoptera (Cory and Myers, 2003). Baculoviruses are not only biocontrol agents of lepidopteran pests, but also have been developed and used extensively in research, serving as expression vectors for high-level production of recombinant proteins (Bonning and Hammock, 1996; Susurluk et al., 2013). Although baculoviruses have been successfully used to control lepidopteran and hymenopteran insect pests of agriculture and forestry importance worldwide, little is known about the host immune responses towards these viral infections (Federici, 1986; Miller, 1997; Moscardi, 1999).

Transferrin is an iron-binding protein that has a role in iron transport (Nichol et al., 2002), in preventing oxidative stress, and in delivering iron to eggs for development (Yoshiga et al., 1997). In addition, it is known that

transferrin synthesis is increased following exposure to bacteria, fungi, pathogens, and parasites, as well as insect parasitoids (Beernsten et al., 1994; Yoshiga et al., 1997, 1999; Kucharski et al., 2003; Thompson et al., 2003; Ampasala et al., 2004; Valles et al., 2005; Bergin et al., 2006; Lee et al., 2006; Guz et al., 2007, 2012; Magalhaes et al., 2007; Paily et al., 2007; Wang et al., 2007; Mowlds et al., 2008; Yun et al., 2009; Zhou et al., 2009; Kim et al., 2010). Interestingly, although *transferrin* expression was found to be induced by dengue virus infection of the salivary glands in yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Luplertlop et al., 2011), transferrin protein levels were shown to be downregulated (Tchankou et al., 2011). This was also the case for infection of *Aedes* mosquitoes with chikungunya virus (Tchankou et al., 2011). Interestingly, our previous results demonstrated that *transferrin* is significantly reduced in tsetse flies (*Glossina morsitans morsitans*) carrying midgut trypanosome infections (Guz et al., 2007).

Egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval), is a polyphagous pest that damages a wide variety of crops including cotton, tobacco, and corn in countries around the Mediterranean Basin and in Southeast Asia (Balachowsky et al., 1972; Sneh et al., 1981). The current management strategy for *S. littoralis*

* Preliminary data from this study were published as an abstract at the Fourth Plant Protection Congress of Turkey.

** Correspondence: nurperguz@agri.ankara.edu.tr

mainly relies on chemical-based control methods, such as insecticide applications. In addition to their high cost, insecticides pollute the environment and kill nontarget insects. Furthermore, resistance has developed to various types of insecticides in insects including this species, thus reducing the efficacy of these methods (Issa et al., 1984a, 1984b; El-Guindy et al., 1989; Abdallah et al., 1991; Rashwan et al., 1992). New control methods are needed to diminish reliance on insecticides for control of this serious pest. Baculoviruses and their recombinant forms constitute viable alternatives to chemical insecticides for insect control. Baculoviruses are specific to one or a few related insect species (Groner et al., 1986). *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus (*SpliNPV*) is a member of the family Baculoviridae (Volkman et al., 1995) and is classified as a Group II NPV (Zanotto et al., 1993; Bulach et al., 1999).

In this study, we have cloned the *transferrin* cDNA from *S. littoralis* (*SpliTrf*) and analyzed the immune-related expression profile of *SpliTrf* in response to baculoviral and bacterial infection to determine whether transferrin plays a role in the immune response in *S. littoralis*. We also report on a detailed analysis of the temporal expression of *SpliTrf* mRNA, as well as the tissue- and sex-specific nature of its synthesis during development.

2. Materials and methods

2.1. Biological material

The *S. littoralis* colony maintained in the insectary at Ankara University was originally established from larvae collected from cotton fields in the Çukurova region in 2002. Insect cultures were maintained at 25 ± 1 °C with 60% relative humidity and under a constant light:dark regime of 16:8. *S. littoralis* caterpillars were reared on lettuce leaves in plastic cages ($24 \times 33 \times 15$ cm).

2.2. Tissue dissection

A total of 25 adults and larvae from the laboratory colony of *S. littoralis* were dissected using a pair of sterilized tweezers under a microscope in ice-cold phosphate buffer saline (pH 7.4). The dissected tissues included the reproductive tract containing the ovaries and the oocytes, the nervous system containing a brain in the head and ganglia in each body segment behind the head, the Malpighian tubules, the mandibles, the gut, and the fat body. All the tissues from larvae were dissected, whereas only the reproductive tract was dissected from adults.

Hemolymph was collected by bleeding sixth instar larvae and transferring it into an Eppendorf tube containing Tris buffer with 10 µL of phenylthiourea (0.02 mM) added to prevent melanization. After centrifugation at $2000 \times g$ for 5 min, the supernatant was used for RNA isolation.

2.3. Cloning and partial sequencing of *transferrin*

Total RNA was isolated from whole larval bodies from sixth instar larvae using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. An additional DNase digestion was performed using RNase-free DNase (Ambion). First-strand cDNA synthesis was carried out using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. For amplification of a partial *transferrin* sequence, oligonucleotide primers (F: 5' GGG AGC TCT CCC ATT TGG TC 3'; R: 5' GCC GGG GAG CAT GCG ACG TC 3') were designed according to conserved amino acid sequences of other insect transferrins. All products were cloned into a pGem-T Easy Vector System (Promega). Ligation reactions were used for transformation of competent JM 109 cells according to standard protocols. Plasmid DNA was isolated using Wizard Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega). Sequencing reactions were performed with the DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter), cleaned with the Agencourt CleanSeq Kit (Agencourt Bioscience), and analyzed with the CEQ 8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter). The cDNA sequence was deposited in GenBank under accession number JX160066. The partial cDNA and deduced amino acid sequences of *SpliTrf* were compared using the BLAST tool at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and EXPASY. Sequence alignments were performed using the CLUSTAL W software.

The evolutionary relatedness of *SpliTrf* to other insect transferrins was inferred using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed (Felsenstein, 1985). Branches corresponding to partitions reproduced in fewer than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches (Felsenstein, 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the maximum composite likelihood method (Tamura et al., 2004) and are in the units of the number of base substitutions per site. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA5 (Tamura et al., 2011).

2.4. Expression analyses

To analyze the expression of *SpliTrf* during different developmental stages, RNA was prepared from the egg, neonate, 2nd instar larvae, 3rd instar larvae, 4th instar larvae, 5th instar larvae, 6th instar larvae, pupae, female adult, and male adult using TRIzol reagent (Invitrogen).

To detect the immune responsive expression profile of *SpliTrf*, newly molted third instar larvae were challenged

by 10^6 *Bacillus thuringiensis* and challenged by *SpliNPV* with a dose of 3000 occlusion bodies using the droplet feeding method, respectively (Hughes et al., 1986; Toprak and Gürkan, 2004). Bacterial and viral OB stocks were prepared in a 10% sucrose solution containing 0.4% (w/v) Patent Blue V food coloring dye (Sigma-Aldrich). For each infection, 24–36 larvae were allowed to drink individually from the virus or bacteria suspension for 15 min. Control larvae were droplet fed using a virus- or bacteria-free 10% sucrose solution containing 0.4% (w/v) Patent Blue V food coloring dye. Larvae that failed to ingest the entire droplet were discarded. Challenged larvae were collected at 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h after feeding. At each time point, 3 biological replicates were collected from the experimental and control groups and stored at -80 °C until RNA isolation.

Tissue-specific expression was accomplished using fat body, midgut, Malpighian tubules, nervous system, and ovaries dissected from various stages of *S. littoralis*. Hemolymph was collected by bleeding sixth instar larvae, and total RNA was isolated by using TRIzol reagent (Invitrogen).

2.5. qRT-PCR analysis of *SpliTrf* expression

For qRT-PCR analysis, a minimum of 6 infected and age-matched control larvae were collected at 4 different time points post-challenge (12 h, 24 h, 48 h, and 72 h). Three biological replicates were prepared for each sample, and 2 larvae were pooled for each replicate. Three technical replicates were performed for each biological replicate on the qPCR plates. Samples were treated with RNase-free DNase I (Ambion). First-strand cDNA synthesis was performed with 1 µg of total RNA by using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). The reaction mixture was incubated at 55 °C for 30 min. cDNA was amplified by using the LightCycler 480 Probes Master Kit (Roche). Amplification conditions consisted of an initial preincubation at 95 °C for 10 min, followed by amplification of the target DNA for 35 cycles of 95 °C for 10 s, 53 °C for 30 s, 72 °C for 1 s, and 1 cycle of cooling at 40 °C for 10 s with the LightCycler 480. A standard curve was generated for each set of primers and the efficiency of each reaction was determined. qRT-PCR was performed using the primer pair *SpliTrf* F: 5' CGA AGG AAA ATG AGC TGA A 3' and *SpliTrf* R: 5' GTC AGG ATA GTC GCA TTT ATC A 3'. Each sample was analyzed in triplicate and normalized to the internal control, *actin* mRNA. Transcript quantification for *actin* was performed using the primer pair *SpliAct* F: 5' ATC ATG TTC GAG ACC TTC AAC 3' and *SpliAct* R: 5' GCA CGA TTT CTC TCT CGG 3'. Statistical significance was determined by using Student's t-test and Microsoft Excel software. Asterisks denote P-values less of than 0.05, which is considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Cloning of *Spodoptera littoralis transferrin* (*SpliTrf*) cDNA

The molecular phylogeny of insect transferrins was examined using amino acid sequences from a number of insect orders including Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, and Orthoptera (Figure 1). The phylogenetic tree based on the transferrins analyzed reflected the expected relationships of the host species and taxa. Based on the phylogenetic analysis, the partially deduced amino acid sequence of *SpliTrf* was clustered together with all the other Lepidoptera transferrins.

3.2. Developmental-, sex-, and tissue-specific expression profile of *SpliTrf*

We analyzed *SpliTrf* expression using qRT-PCR analysis during different developmental stages: egg, neonate, 2nd instar larvae, 3rd instar larvae, 4th instar larvae, 5th instar larvae, 6th instar larvae, pupae, female adult, and male adult (Figure 2A). Expression of *SpliTrf* was detected in all developmental stages, with the lowest levels observed in the egg and the neonate, increasing through development. On the other hand, *transferrin* is expressed in both sexes but its expression is higher in females than in males.

We evaluated the transcript abundance of *SpliTrf* using qRT-PCR analysis from different larval tissues including the fat body, midgut, Malpighian tubules, nervous system, hemolymph, and adult ovaries. Results shown in Figure 2B indicate that the *SpliTrf* is preferentially expressed in the fat body tissue. Fewer *SpliTrf* transcripts are detectable in the ovaries, nervous system, Malpighian tubules, hemolymph, and midgut, respectively.

3.3. *SpliTrf* expression in response to *B. thuringiensis* and *SpliNPV* infection

To characterize the expression profile of *SpliTrf* in response to bacterial challenge, 3rd instar larvae were infected with *B. thuringiensis* and the transcript levels for *SpliTrf* were analyzed using qRT-PCR analysis (Figure 3A). The results showed that *SpliTrf* was upregulated upon bacterial infection relative to control larvae. The expression of *SpliTrf* was significantly higher in the larvae 48 h after bacterial challenge and remained high at the 72-h time-point. Expression of the *SpliTrf* transcript levels was similarly evaluated in response to infection with *SpliNPV* (Figure 3B). In contrast, *SpliTrf* expression decreased by 3-fold at 12 h and remained significantly lower even at the 24-h time-point after viral challenge relative to uninfected larvae. The expression of *SpliTrf* returned to control levels by 48 h after viral challenge. Thus, it appears that *transferrin* expression is differentially regulated by pathogenic agents, with the levels increasing in response to bacteria and decreasing in response to viral introduction.

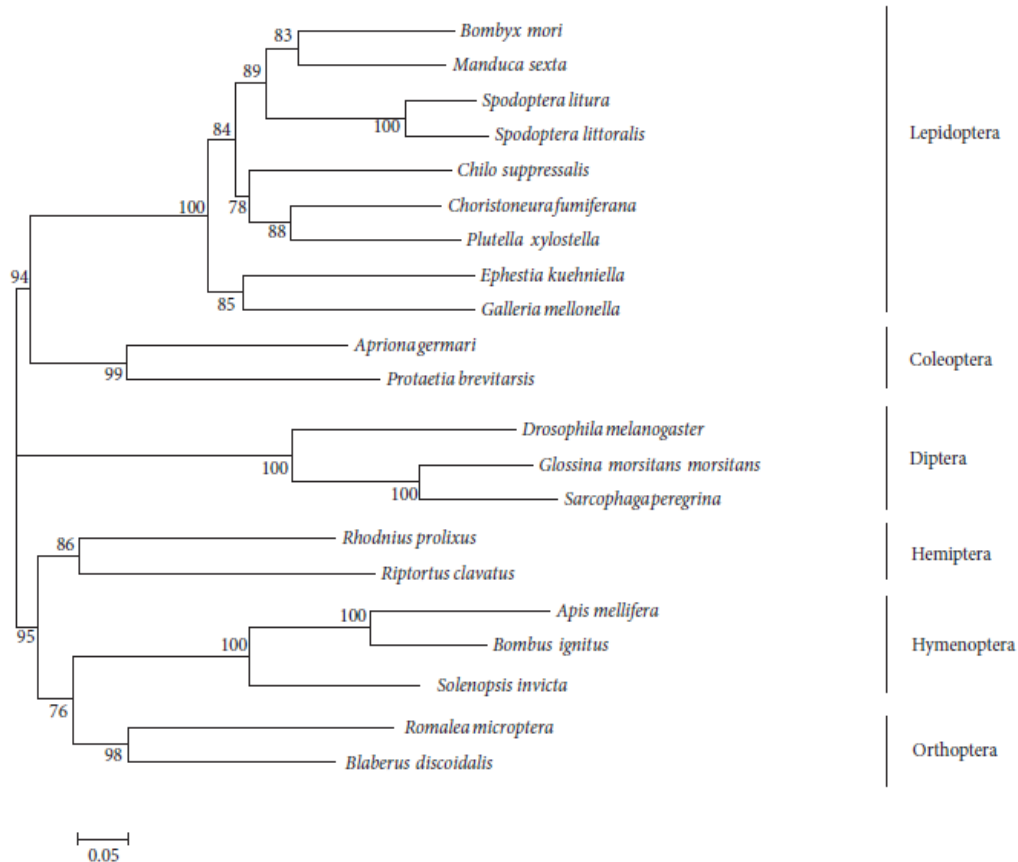


Figure 1. Molecular phylogeny of insect transferrins. Pairwise alignment and tree generation was performed using MEGA5 after 1000 bootstraps with the neighbor-joining algorithm. Bootstrap values above 75% are shown in the nodes. The species and GenBank accession numbers of the transferrin sequences used to construct the phylogenetic tree are as follows: *Bombyx mori*, NP_001037014; *Manduca sexta*, AAA29338; *Spodoptera litura*, ABF21123; *Spodoptera littoralis*, AFP89365; *Chilo suppressalis*, BAD27263; *Choristoneura fumiferana*, AAT08022; *Plutella xylostella*, BAF36818; *Ephestia kuehniella*, ADF35768; *Galleria mellonella*, AAQ63970; *Apriona germari*, AAW70172; *Protaetia brevitarsis*, ABI31834; *Drosophila melanogaster*, AAC67389; *Glossina morsitans morsitans*, AAM46784; *Sarcophaga peregrina*, BAA06067; *Rhodnius prolixus*, ABU96701; *Riptortus clavatus*, AAD02419; *Apis mellifera*, NP_001011572; *Bombus ignitus*, ABV68876; *Solenopsis invicta*, AAY21643; *Romalea microptera*, AAQ62963; *Blaberus discoidalis*, AAA27820.

4. Discussion

We have cloned a putative iron-binding transferrin (*SpliTrf*) from the lepidopteran Egyptian cotton leaf worm, *S. littoralis*. The deduced amino acid sequence of *SpliTrf* showed significant homology with other known lepidopteran transferrins from *Spodoptera litura* (92%), *Danaus plexippus* (79%), *Chilo suppressalis* (78%), *Bombyx mori* (77%), *Galleria mellonella* (75%), and *Ephestia kuehniella* (71%). To investigate the evolutionary relationship of *SpliTrf*, phylogenetic analysis was carried out using the neighbor-joining method based on 21 transferrin sequences from different insects. The dendrogram that was obtained places the *SpliTrf* as a sister taxa to the transferrin from the species *S. litura* in a separate lineage clustering with other lepidopterans.

In insects, the fat body is important for a number of physiological processes, including immunity, reproduction, flight, and energy, as well as iron metabolism (Arrese and Soulages, 2010). Fat body cells not only control the synthesis and utilization of energy reserves, but are also the site where most of the hemolymph proteins and circulating metabolites are synthesized (Kanost, 1990).

In this study, we found that the fat body has the highest level of *SpliTrf* mRNA compared to the other analyzed tissues, which is similar to results from other insects where *transferrin* is expressed primarily in the fat body (Yoshiga et al., 1999; Hirai et al., 2000; Ampasala et al., 2004; Harizanova et al., 2005; Strickler-Dinglasan et al., 2006; Guz et al., 2007, 2012; Kim et al., 2008). Like other storage or lipid transport proteins, transferrin is a protein

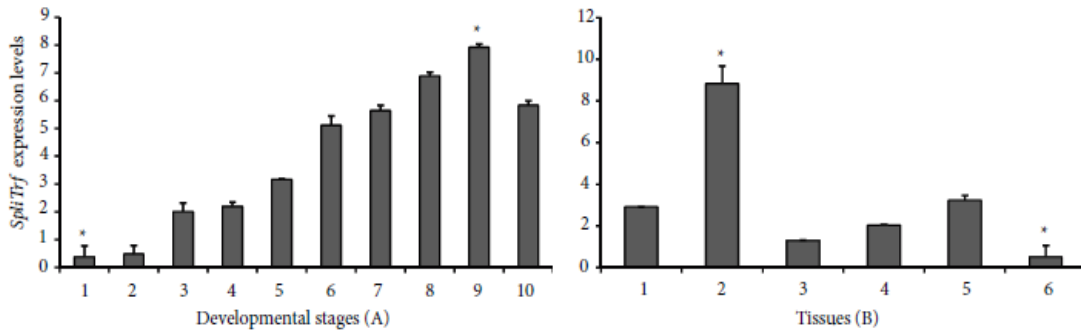


Figure 2. qRT-PCR analysis of developmental-, sex-, and tissue-specific expression profile of *SpliTrf*. A) Lanes: 1: egg, 2: neonate, 3: 2nd instar larvae, 4: 3rd instar larvae, 5: 4th instar larvae, 6: 5th instar larvae, 7: 6th instar larvae, 8: pupae, 9: female adult, 10: male adult. B) Lanes: 1: nervous system, 2: fat body, 3: hemolymph, 4: Malpighian tubules, 5: ovaries, 6: midgut (t-test; *: P < 0.05).

that shuttles iron among various tissues that are involved in iron storage. We detected lower levels of *transferrin* in various host tissues, and the role of *transferrin* in these tissues remains to be studied. It is clear that *transferrin* plays a role in the growth and normal function of the human central nervous system (Monteros et al., 1989). Although it is not known whether a transferrin receptor pathway exists in insects, studies suggest that a transferrin receptor is necessary for development of the mouse nervous system (Arrese and Soulages, 2010). We also detected *transferrin* expression in the nervous system of *Spodoptera*, which might be due to juvenile hormone regulation or a protection mechanism against reactive oxygen intermediates, as has been previously suggested in the honeybee central nervous system (Jamroz et al., 1993; Hirai et al., 2000; Kucharski and Maleszka, 2003; Nascimento et al., 2004). *Transferrin* mRNA is also detected in the ovaries of *Spodoptera*, supporting its classification as a vitellogenic protein (Kurama et al., 1995). Expression of *SpliTrf* has also been detected from

the hemolymph of larvae, suggesting that *transferrin* may also be expressed by hemocytes, unless this has resulted from fat body contamination of the isolated hemolymph. Zinc, iron, and copper were first reported in insects in certain types of storage vacuoles located in the Malpighian tubules of houseflies (Sohal et al., 1976). Iron must be absorbed from the diet into gut cells, shuttled from the apical to the basal membrane of the gut epithelium, and transferred to the hemolymph (Nichol et al., 2002). Since excess iron is destructive to many cells, the *SpliTrf* mRNA found in *Spodoptera* Malpighian tubules and the midgut might function to stabilize the availability of iron between cells.

Expression of *SpliTrf* was detected in all developmental stages, indicating an important role throughout the Egyptian cotton leaf worm life cycle. Although there are differences in insect developmental stages (Kurama et al., 1995; Yoshiga et al., 1999; Strickler-Dinglasan et al., 2006), *transferrin* transcript levels tended to increase through larval development, reaching a maximum in either the last instar or pupal stage (Ampasala et al., 2004; Valles et al., 2005; Guz et al., 2012).

Multiple functions have been attributed to transferrin, such as iron metabolism, immunity, and reproduction (Nichol et al., 2002). Transcription and translation of the transferrin protein are upregulated by bacterial infection in several species of insects, including Lepidoptera (Nichol et al., 2002; Seitz et al., 2003; Ampasala et al., 2004; Yun et al., 2009; Guz et al., 2012). Here we demonstrate that *SpliTrf* is also upregulated in response to challenge with a gram-positive bacterium, *B. thuringiensis*. Although the antimicrobial responses of insects largely involve the Toll pathway for combating gram-positive bacteria and fungi, and IMD pathway functions for gram-negative bacteria (Lemaitre et al., 1997; Hoffmann, 2003), expression of *transferrin* was also reported to be upregulated by both gram-positive and gram-negative bacteria in *Drosophila* and *Choristoneura* (De Gregorio et al., 2001; Ampasala et

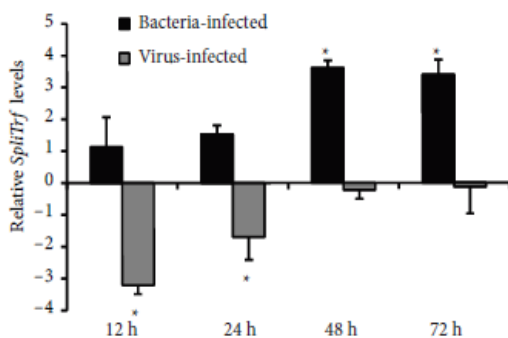


Figure 3. Expression of *SpliTrf* in larvae challenged with A) *Bacillus thuringiensis* and B) *SpliNPV* relative to the unchallenged controls analyzed during the same time periods. Asterisk represents fold difference between the challenged and unchallenged larvae as significant with a t-test score of P < 0.05.

al., 2004). However, the scenario for *transferrin* expression in *SpliNPV*-infected *Spodoptera* larvae differs from the host response to bacterial challenge, as we detected lower levels of *transferrin* following baculovirus challenge relative to uninfected controls. The decrease in host *transferrin* expression mediated by *SpliNPV* infection could be explained by different mechanisms. *SpliNPV* could repress the expression of host *transferrin* due to a shut-off mechanism of host protein synthesis similar to that shown in *Spodoptera frugiperda* (Salem et al., 2011). Baculovirus-infected host protein synthesis is shut down at approximately 10–12 h after infection when the virus starts producing new virions (Carstens et al., 1979; Maruniak et al., 1981). After 24 h post baculovirus infection, the majority of newly synthesized proteins are either virus-encoded or virus-induced. The shut-off mechanism associated with host protein synthesis appears to be correlated with suppression of host gene transcription (Ooi et al., 1988; van Oers et al., 2001, 2003). An alternate mechanism could be the host downregulation of *SpliTrf* to reduce virus survival, replication, and/or transmission. Since iron is an essential nutrient for most pathogens, one effective host immune response is to reduce iron availability to pathogens. Thus, reduced expression of *transferrin* could represent a host immune response for reducing *SpliNPV* infection success. A similar pathogen iron-scavenging mechanism has been documented in protozoan infections (Wilson and Britigan, 1998; Marquis and Gros, 2007). Results obtained for the interaction between *Trypanosoma brucei* (African trypanosomiasis/nagana) and its hosts (humans/animals) show that *T. brucei* obtains iron through receptor-mediated endocytosis of host transferrin (Gerrits et al.,

2002; Taylor and Kelly, 2010). Since all organisms require iron, baculoviruses may similarly have yet uncharacterized iron-acquiring mechanisms.

Iron concentration also regulates microbial symbiotic interactions in insects that acquire iron from host transferrin (Collins, 2003). In the case of the *Wolbachia* endosymbiont and its hosts, varying iron levels have been suggested to play a pivotal role in the interaction (Kremer et al., 2009). Furthermore a reduction in the expression of *transferrin* has been detected in *Wolbachia*-infected flies (Rances et al., 2012). Although potential endosymbionts of *Spodoptera* species remain as yet unknown, it will be interesting to know how iron metabolism occurs in these symbionts.

It is not clear that baculoviruses are capable of actively suppressing the immune responses of their hosts; however, Sim and Dimopoulos (2010) indicated that DENV is capable of inhibiting immune pathway activation in mosquito cell lines. On the other hand, since *Heliothis virescens* (Fabricius) (tobacco budworm) larvae have altered iron tissue distribution and movement following baculoviral infection, it is proposed that larval iron homeostasis may be substantially disrupted by baculoviral infection (Popham et al., 2012). For functional analysis of the effects of the reduced *SpliTrf* transcripts on protein levels and infection outcome between *S. littoralis* and the *SpliNPV* system, future functional studies through application of RNAi may be important.

Acknowledgments

The authors are grateful to Serap Aksoy (Yale University) for a critical reading of the manuscript.

References

- Abdallah B, Hourdry J, Krieg PA, Denis H, Mazabraud A (1991). Germ cell-specific expression of a gene encoding eukaryotic translation elongation factor 1a (eEF-1a) and generation of eEF-1a retroseudogenes in *Xenopus laevis*. P Natl Acad Sci USA 88: 9277–9281.
- Ampasala DR, Zheng SC, Retnakaran A, Krell PJ, Arif BM, Feng QL (2004). Cloning and expression of a putative transferrin cDNA of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. Insect Biochem Molec 34: 493–500.
- Arrese EL, Soulages JL (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. Annu Rev Entomol 55: 207–225.
- Balachowsky AS (1972). Entomologie Appliquée à l'Agriculture, Vol. I Lépidoptères. Paris: Masson, pp. 1131–1133.
- Beernsten BT, Severson DW, Christensen BM (1994). *Aedes aegypti*: characterization of a hemolymph polypeptide expressed during melanotic encapsulation of filarial worms. Exp Parasitol 79: 312–321.
- Bergin D, Murphy L, Keenan J, Clynes M, Kavanagh K (2006). Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. Microbes Infect 8: 2105–2112.
- Bonning BC, Hammock BD (1996). Development of recombinant baculoviruses for insect control. Annu Rev Entomol 41: 191–210.
- Bulach DM, Kumar AA, Zaia A, Liang B, Tribe DE (1999). Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. J Invertebr Pathol 73: 59–73.
- Carstens EB, Tjia ST, Doerfler W (1979). Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus I. Synthesis of intracellular proteins after virus infection. Virology 99: 386–399.
- Collins HL (2003). The role of iron in infections with intracellular bacteria. Immunol Lett 85: 193–195.

- Cory JS, Myers JH (2003). The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annu Rev Ecol Evol S* 34: 239–272.
- De Gregorio E, Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B (2001). Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *P Natl Acad Sci USA* 98: 12590–12595.
- de los Monteros AE, Peña LA, de Vellis J (1989). Does transferrin have a special role in the nervous system? *J Neurosci Res* 24: 125–136.
- El-Guindy MA, Keddis NE, Abd El-Satter MM, Ghonieim YA (1989). Status of resistance to pesticides in the cotton leaf worm *S. littoralis* (Boisd.), under the present Egyptian cotton pest control programme. *Proc 1st Int Conf Ent* 11: 453–462.
- Federici BA (1986). Ultrastructure of baculoviruses. In: Granados RR, Federici BA, editors. *The Biology of Baculoviruses*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, pp. 61–88.
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* 7: 862–874.
- Gerrits H, Musmann R, Bitter W, Kieft R, Borst P (2002). The physiological significance of transferrin receptor variations in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasit* 119: 237–247.
- Groner A (1986). Specificity and safety of baculoviruses. In: Granados RR, Federici BA, editors. *The Biology of Baculoviruses*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, pp. 177–202.
- Guz N, Attardo MG, Wu Y, Aksoy S (2007). Molecular aspects of transferrin expression in the tsetse fly (*Glossina morsitans morsitans*). *J Insect Physiol* 53: 715–723.
- Guz N, Kilincer N, Aksoy S (2012). Molecular characterization of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) transferrin and its response to parasitoid *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Gravenhorst). *Insect Mol Biol* 21: 139–147.
- Harizanova N, Georgieva T, Dunkov BC, Yoshiga T, Law JH (2005). *Aedes aegypti* transferrin. Gene structure, expression pattern, and regulation. *Insect Mol Biol* 14: 79–88.
- Hirai M, Watanabe D, Chinzei Y (2000). A juvenile hormone repressible transferrin-like protein from the bean bug, *Riptortus clavatus*: cDNA sequence analysis and protein identification during diapause and vitellogenesis. *Arch Insect Biochem* 44: 17–26.
- Hoffmann JA (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426: 33–38.
- Hughes PR, van Beek NAM, Wood HA (1986). A modified droplet feeding method for rapid assay of *Bacillus thuringiensis* and baculoviruses in noctuid larvae. *J Invertebr Pathol* 48: 187–192.
- Issa YH, Keddis ME, Abdel-Sattar MA, Ayad FA, El-Guindy MA (1984a). Survey of resistance to organophosphorus insecticides in field strains of the cotton leafworm during 1980–1984 cotton-growing seasons. *Bull Entomol Soc Egypt Econ Ser* 14: 399–404.
- Issa YH, Keddis ME, Abdel-Sattar MA, Ayad FA, El-Guindy MA (1984b). Survey of resistance to pyrethroids in field strains of the cotton leafworm during 1980–1984 cotton-growing seasons. *Bull Entomol Soc Egypt Econ Ser* 14: 405–411.
- Jamroz RC, Gasdaska JR, Bradfield JY, Law JH (1993). Transferrin in a cockroach: molecular cloning, characterization, and suppression by juvenile hormone. *P Natl Acad Sci USA* 90: 1320–1324.
- Kanost MR (1990). Isolation and characterization of four serine proteinase inhibitors (serpins) from hemolymph of *Manduca sexta*. *Insect Biochem* 20: 141–147.
- Kim BY, Lee KS, Choo YM, Kim I, Hwang JS, Sohn HD, Jin BR (2008). Molecular cloning and characterization of a transferrin cDNA from the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis*. *DNA Sequence* 19: 146–150.
- Kim J, Kim YA (2010). Viral histone H4 suppresses expression of a transferrin that plays a role in the immune response of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Mol Biol* 19: 567–574.
- Kremer N, Voronin D, Charif D, Mavingui P, Mollereau B, Vavre F (2009). *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog* 5: e1000630.
- Kucharski R, Maleszka R (2003). Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Insect Sci* 3: 27.
- Kurama T, Kurata S, Natori S (1995). Molecular characterization of an insect transferrin and its selective incorporation into eggs during oogenesis. *Eur J Biochem* 228: 229–235.
- Lee KS, Kim BY, Kim HJ, Seo SJ, Yoon HJ, Choi YS, Kim I, Han YS, Je YH, Lee SM et al. (2006). Transferrin inhibits stress-induced apoptosis in a beetle. *Free Radical Bio Med* 41: 1151–1161.
- Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *P Natl Acad Sci USA* 94: 14614–14619.
- Levitin A, Whiteway M (2008). *Drosophila* innate immunity and response to fungal infections. *Cell Microbiol* 10: 1021–1026.
- Luplertlop N, Surasombatpattana P, Patramool S, Dumas E, Wasinpiyamongkol L, Saune L, Hamel R, Bernard E, Sereno D, Thomas F et al. (2011). Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following infection with dengue virus. *PLoS Pathog* 7: e1001252.
- Magalhaes T, Oliveira IE, Melo-Santos MAV, Oliveira CME, Lima CA, Ayres CFJ (2008). Expression of defensin, cecropin, and transferrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae), and the abnormal development of nematodes in the mosquito. *Exp Parasitol* 120: 364–371.
- Marquis JF, Gros P (2007). Intracellular *Leishmania*: your iron or mine? *Trends Microbiol* 15: 93–95.
- Maruniak JE, Summers MD (1981). *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus phosphoproteins and synthesis of intracellular proteins after virus infection. *Virology* 109: 25–34.
- Miller LK (1997). *The Baculoviruses*. New York: Plenum Press.

- Moscardi F (1990). Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 14: 257–289.
- Mowlds P, Barron A, Kavanagh K (2008). Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Microbes Infect* 10: 628–634.
- Nascimento AM, Cuvillier-Hot V, Barchuk AR, Simoes ZLP, Hartfelder K (2004). Honey bee (*Apis mellifera*) transferrin-gene structure and the role of ecdysteroids in the developmental regulation of its expression. *Insect Biochem Molec* 34: 415–424.
- Nichol H, Law JH, Winzerling JJ (2002). Iron metabolism in insects. *Annu Rev Entomol* 47: 535–559.
- Ooi BG, Miller LK (1988). Regulation of host RNA levels during baculovirus infection. *Virology* 166: 515–523.
- Paily KP, Kumar BA, Balaraman K (2007). Transferrin in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae), up-regulated upon infection and development of the filarial parasite, *Wuchereria bancrofti* (Cobbold) (Spirurida: Onchocercidae). *Parasitol Res* 101: 325–330.
- Popham HJR, Sun R, Shelby KS, Robertson JD (2012). Iron levels change in larval *Heliothis virescens* tissues following baculovirus infection. *Biol Trace Elem Res* 148: 356–362.
- Rances E, Ye YH, Woolfit M, McGraw EA, O'Neill SL (2012). The relative importance of innate immune priming in *Wolbachia*-mediated dengue interference. *PLoS Pathog* 8: e1002548.
- Rashwan MH, Elbaramawy ZA, El-Sheikh AE, Radwan HSA (1992). The onset of organophosphate and carbamate resistance among lower Egypt population of the cotton leafworm *S. littoralis* (Boisd). *Bull Ent Soc Egypt Econ Ser* 19: 211–220.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
- Salem TZ, Zhang F, Xie Y, Thiem SM (2011). Comprehensive analysis of host gene expression in *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Virology* 412: 167–178.
- Seitz V, Clermont A, Wedde M, Hummel M, Vilcinskas A, Schlatterer K, Podsiadlowski L (2003). Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (*Galleria mellonella*) by a subtractive hybridization approach. *Dev Comp Immunol* 27: 207–215.
- Sim S, Dimopoulos G (2010). Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. *PLoS One* 5: e10678.
- Sneh B, Schuster S, Broza M (1981). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* Bois. (Lep.: Noctuidae). *Entomophaga* 26: 179–190.
- Sohal RS, Peters PD, Hall TA (1979). Fine structure and X-ray microanalysis of mineralized concretions in the Malpighian tubules of the housefly, *Musca domestica*. *Tissue Cell* 8: 447–458.
- Strickler-Dinglasan PM, Guz N, Attardo G, Aksoy S (2006). Molecular characterization of iron binding proteins from *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochem Molec* 36: 921–933.
- Susurluk H, Toprak U, Gürkan MO (2013). Concentration of sodium dodecyl sulfate used in occlusion body extraction affects *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus biological activity. *Turk J Biol* 37: 171–175.
- Tamura K, Nei M, Kumar S (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbour-joining method. *P Natl Acad Sci USA* 101: 11030–11035.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.
- Taylor MC, Kelly JM (2010). Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology* 137: 899–917.
- Tchankouo-Nguetcheu S, Khun H, Pincet L, Roux P, Bahut M, Hueree M, Guette C, Choumet V (2010). Differential protein modulation in midguts of *Aedes aegypti* infected with chikungunya and dengue 2 viruses. *PLoS One* 5: e13149.
- Thompson GJ, Crozier YC, Crozier RH (2003). Isolation and characterization of a termite transferrin gene up-regulated on infection. *Insect Mol Biol* 12: 1–7.
- Toprak U, Gürkan MO (2004). First record of a NPV isolated from *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) in Turkey and its molecular identification according to the partial *lef-8* gene. *Turk J Biol* 28: 71–77.
- Valles SM, Pereira RM (2005). *Solenopsis invicta* transferrin: cDNA cloning, gene architecture, and up-regulation in response to *Beauveria bassiana* infection. *Gene* 358: 60–66.
- van Oers MM, Doitsidou M, Thomas AAM, de Maagd RA, Vlak JM (2003). Translation of both 5' TOP and non-TOP host mRNAs continues into the late phase of baculovirus infection. *Insect Mol Biol* 12: 75–84.
- van Oers MM, van der Veken L, Vlak JM, Thomas AAM (2001). Effect of baculovirus infection on the mRNA and protein levels of the *Spodoptera frugiperda* eukaryotic initiation factor 4E. *Insect Mol Biol* 10: 255–264.
- Volkman LE, Blissard GW, Friesen P, Keddie BA, Possee R, Theilmann DA (1995). Family Baculoviridae. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD, editors. *Virus Taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Vienna, New York: Springer-Verlag, pp. 104–113.
- Wang C, Cao Y, Wang Z, Yin Y, Peng G, Li Z, Zhao H, Xia Y (2007). Differentially-expressed glycoproteins in *Locusta migratoria* hemolymph infected with *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 96: 230–236.
- Wilson ME, Britigan BE (1988). Iron acquisition by parasitic protozoa. *Parasitol Today* 14: 348–353.
- Yoshiga T, Hernandez VP, Fallon AM, Law JH (1997). Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. *P Natl Acad Sci USA* 94: 12337–12342.
- Yoshiga T, Georgieva T, Dunkov BC, Harizanova N, Ralchev K, Law JH (1999). *Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization, and up-regulation on bacterial infection. *Eur J Biochem* 260: 414–420.

- Yun EY, Lee JK, Kwon OY, Hwang JS, Kim I, Kang SW, Lee WJ, Ding JL, You KH, Goo TW (2009). *Bombyx mori* transferrin: genomic structure, expression and antimicrobial activity of recombinant protein. *Dev Comp Immunol* 33: 1064–1069.
- Zanotto PMA, Keesing BD, Maruniak JE (1993). Phylogenetic interrelationships among baculoviruses, evolutionary rates, and host associations. *J Invertebr Pathol* 62: 147–164.
- Zhou G, Velasquez LS, Geiser DL, Mayo JJ, Winzerling JJ (2009). Differential regulation of transferrin 1 and 2 in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Molec* 39: 234–244.