T. C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nauphoeta cinera (OLİVİER, 1789) (BLATTODEA, BLABERIDAE) TÜRÜNDE GERÇEK ZAMANLI RT-qPCR İLE KANTİTATİF EKSPRESYON ANALİZİ İÇİN REFERANS GENLERİN TANIMLANMASI VE DOĞRULANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra ÖZCAN
(20199247002)

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK

SİVAS
AĞUSTOS 2022

Kübra ÖZCAN'ın hazırladığı ve **"*Nauphoeta cinera* (OLIVIER, 1789) (BLATTODEA, BLABERIDAE) TÜRÜNDE GERÇEK ZAMANLI RT-qPCR İLE KANTİTATİF EKSPRESYON ANALİZİ İÇİN REFERANS GENLERİN TANIMLANMASI VE DOĞRULANMASI"** adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı	**Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK** Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	……
Jüri Üyesi	**Doç. Dr. Necati ÖZPINAR** Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi	……..……
Jüri Üyesi	**Doç. Dr. Savaş KAYA** Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	……..……..

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nevcihan GÜRSOY
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

Bütün hakları saklıdır.
Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Kübra ÖZCAN, 2022

Çalışma sırasında bana destek olan aileme ve tüm arkadaşlarıma...

ETİK

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

19.08.2022

Kübra ÖZCAN

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi ŞEYDA BERK'e çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Öğr. Gör. Ayşe Nur PEKTAŞ'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi anlamda desteğini eksik etmeyen sevgili annem Fatma ÖZCAN'a, sevgili babam Engin ÖZCAN'a ve canım kardeşim Ebru ÖZCAN'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda olan ve desteğini eksik etmeyen sevgilim Emin Ufuk KARAKAŞ'a teşekkür ederim.

ÖZET

Nauphoeta cinera (OLİVİER, 1789) (BLATTODEA, BLABERIDAE) TÜRÜNDE GERÇEK ZAMANLI RT-qPCR İLE KANTİTATİF EKSPRESYON ANALİZİ İÇİN REFERANS GENLERİN TANIMLANMASI VE DOĞRULANMASI

Kübra ÖZCAN

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK

2022, 46+xv sayfa

Gen ekspresyon çalışmalarında farklı deneysel veya klinik koşullar altında genlerin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması için kullanılan en yaygın teknik Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)'dur. RT-qPCR'da güvenilir sonuçlar elde etmek için verilerin housekeeping genler (HKG) (referans genler) ile normalizasyonunun yapılması gerekmektedir. Delta-delta Ct yöntemi gibi gen ekspresyonunun hesaplanması için, PCR primer verimliliğinin ilgili gen ve housekeeping geni için karşılaştırılabilir olduğu varsayılmaktadır. Farklı PCR primer verimlilikleri (E) sonucu etkileyebilir. Bu nedenle, veri normalizasyonu için uygun bir referans genin tanımlanması, qPCR deneylerinin geliştirilmesinde önemli bir adımdır. Bununla birlikte; çalışma tasarımına uygun en stabil HKG'in kullanılması, çalışma sonuçlarının güvenilirliğini artırmaktadır. Güvenilir veri elde etmek için çalışma tasarımına uygun stabil HKG'in seçimi ve validasyonu önemli bir adımdır ki bu ekspresyon bazlı çalışmalarda bütünleyici bir adım olmuştur. HKG seçimi için farklı yazılım programları geliştirilmiştir. Normalizasyon için seçilecek en stabil HKG'in seçilmeden önce deneysel çalışmalar ile dikkatli bir şekilde değerlendirmesinin yapılması gerekmektedir. *N. cinerea* lobster hamam böceği cinsel seçilim, bakteriyel enfeksiyonlar, toksiloji çalışmaları ve metabolik hız ile uyum çalışmaları arasındaki korelasyonlar için model olarak kullanılan türdür. Bu çalışmada altı aday referans gen *ACTB* (Beta-aktin), *RPS18* (40S Ribozomal protein S18), *EF1α* (Uzama faktörü 1-alfa), *α-Tub* (α-Tubulin), *ArgK* (Arginine kinaz) ve *GADPH* (Gliseraldehit-3-fosfat) RT-qPCR analizi için aday olarak seçilmiştir. Bu adayların ifade profillerinin kararlılığı geNorm, NormFinder, BestKeeper,

ΔCt ve RefFinder yöntemi ile analiz edilmiştir. Sonuçlarımız, *α-Tub* geninin *N. cinerea* erişkinlerinde gen ekspresyon seviyelerinin doğru normalizasyonu için en satabil gen olduğunu göstermiştir. Ayrıca, *GADPH*'ın ikinci en stabil referans gen olduğu saptanmıştır. *Nauphoeta cinera* türünde RT-qPCR analizi için referans gen tanımlanması, doğrulanması ve ekpresyon gen stabilitesinin saptanması ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, sonuçlar hamamböceklerinde q-RT-PCR çalışmalarında biyotik ve abiyotik koşullar altında referans genlerin doğrulanması ihtiyacını vurgulamaktadır.

Anahtar kelimeler: Gen ekspresyonu, Housekeeping gen, Referans gen, Kantitatif RT-PCR, *Nauphoeta cinera*, Validasyon, Normalizasyon

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND VERIFICATION OF REFERENCE GENES FOR QUANTITATIVE EXPRESSION ANALYSIS BY REAL-TIME RT-qPCR IN Nauphoeta cinera (OLIVİER, 1789) (BLATTODEA, BLABERIDAE)

Kübra ÖZCAN

Master of Science Thesis

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK

2022 46+xv pages

The most common technique used in gene expression studies to compare the expression levels of genes under different experimental or clinical conditions is Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). In order to obtain reliable results in RT-qPCR, the data should be normalized with housekeeping genes (HKG). For the calculation of gene expression, such as the delta-delta Ct method, different PCR primer efficiencies (E) may affect the result, as PCR primer yields are assumed to be comparable for the gene of interest and housekeeping gene. However, Using the most stable HKG suitable for the study design increases the reliability of the study results. Selection and validation of stable HKG suitable for study design is an important step to obtain reliable data, which has been an integral step in expression-based studies. Different software programs have been developed for HKG selection. Before choosing the most stable HKG to be selected for normalization, it should be carefully evaluated with experimental studies. N. cinerea lobster cockroach is the species used as a model for sexual selection, bacterial infections, toxicology studies, and correlations between metabolic rate and compliance studies. In this study, six candidate reference genes *ACTB* (Beta-actin), *RPS18* (40S Ribosomal protein S18), *EF1α* (Elongation factor 1-alpha), *α-Tub* (α-Tubulin), *ArgK* (Arginine kinase), and *GADPH* (Glyceraldehyde-3 -phosphate) was selected as a candidate for RT-qPCR analysis. The stability of the expression profiles of these candidates was analyzed by the geNorm, NormFinder, BestKeeper, ΔCt and RefFinder methods. Our results showed that the α-Tub gene is the most stable gene for accurate normalization of gene expression levels in *N. cinerea* adults. In addition, *GADPH* was found to be the second most stable reference gene. There are no studies on reference gene identification, validation and determination of expression gene stability

for RT-qPCR analysis in *Nauphoeta cinera*. Therefore, the results highlight the need for validation of reference genes under biotic and abiotic conditions in q-RT-PCR studies in cockroaches.

Key Words: Gene expression, Housekeeping gene, Reference gene, RT-qPCR, validation, normalization, *Nauphoeta cinera* .

İÇİNDEKİLER

ETİK ..... **vi**
KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR ..... **vii**
ÖZET ..... **viii**
ABSTRACT ..... **x**
İÇİNDEKİLER ..... **xii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xiii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xiv**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xv**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Hamam Böceklerinin Tarihi (Brunner Von Wattenwyl, 1882) 1
1.1.1 Habitat 1
1.1.2 Şekil, boyut ve renk 2
1.1.3 Beslenme ve ekoloji 2
1.1.4 Sağlık 3
1.1.5 Üreme ve çiftleşme 3
1.2. *Nauphoeta cinera* (Olivier 1789)- Lobster, Benekli veya Sinirli Hamam Böceği 8
1.2.1. *Nauphoeta cinera'*da (Olivier 1789) yapılan çalışmalar 12
1.3. RT-qPCR 15
1.3.1. RT-qPCR ve normalizasyon 20
1.3.2. Böceklerde RT-qPCR Verilerinin Normalizasyonu için Referans Genlerin Seçimi 21
1.3.3. Normalizasyon için kullanılan programların karşılaştırılması 22
1.4. Çalışmanın Amacı 24
2. MATERYAL VE METOD **25**
2.1. Örnek Bildirimi 25
2.2. Total RNA İzolasyonu 25
2.2.1. RNA izolasyonu protokolünün aşamaları sırasıyla aşağıdaki gibidir: 25
2.3. cDNA Sentezi ve Real- Time PCR 26
2.3.1. cDNA sentezi 26
2.3.2 cDNA dilüsyonlarının hazırlanması 27
2.3.3. RT-qPCR analizi 27
2.4. Veri Analizi ve İstatistiksel Yöntem 28
3. BULGULAR **30**
3.1. Total RNA'nın kalitesi 30
3.2. Primer özgüllüğü ve etkinliği 30
3.3. Aday referans genlerin ekspresyon profili 31
3.4. Seçilen referans genlerin ekspresyon stabilitesi 32
4. TARTIŞMA ve SONUÇ **36**
KAYNAKLAR **39**
ÖZGEÇMİŞ **46**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Morfolojik ve yaşam öyküsü karakterinin kladistik analizine dayanan hamamböceği filogenisi 7

Şekil 2. Sekiz (ML-TP) kullanılarak kırpılmış veri setinin Maksimum Olabilirlik analizinden elde edilen ağaç. Siyah renkli aile ve alt aile adları burada tanıtılan taksonomik değişiklikleri yansıtır (çift tırnak içindeki adlar monofiletik olmayan grupları belirtir); 'eski' isimler gri ve parantez içinde verilmiştir (çift tırnak ile işaretlenmemiş monofiletik olmayan gruplar ... 8

Şekil 3. Blattodea'nın mitokondriyal filogenomikleri ve maksimum olasılıkta bir süper matris yaklaşımı kullanan dış gruplar..... 9

Şekil 4. *N. cinerea* (A) Nimf. (B) Yetişkin 10

Şekil 5. Amplifikasyon planı. PCR döngüsü sayısına karşı taban çizgisi çıkarılmış floresan..... 16

Şekil 6. İnterkalatör boya ve hidrolize dayalı prob tespitinin karşılaştırılması. ... 18

Şekil 7. Altı aday referans genin standart eğri grafiği (R^2) 31

Şekil 8. Aday housekeeping genlerinin amplifikasyon profilleri. *Nauphoeta cinera*'daki housekeeping genleri için qPCR eşik döngüsü değerlerinin (Cq) kutu grafiği..... 32

Şekil 9. Genorm (A), Normfinder (B), Bestkeeper (C), ΔCt metod (D), RefFinder (E) tarafından değerlendirilen altı housekeeping geninin ekspresyon stabilitesi ve sıralaması. 35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1. Hamamböceklerinde vücut uzunluğuna göre sperm uzunluğu. Jamieson (1987) ve Vidlicka Huckova'dan (1993) sperm verileri. 4
Tablo 2. Hamamböceği üreme modları 5
Tablo 3. Nauphoeta cinera (Olivier, 1789) lobster hamam böceğinin taksonomik sınıflandırması 11
Tablo 4. cDNA sentez bileşenleri 26
Tablo 5. cDNA inkübasyon süreleri 27
Tablo 6. RT-qPCR Bileşenleri 28
Tablo 7. RT-qPCR Koşulları 28
Tablo 8. RT-qPCR analizinde değerlendirilen altı aday housekeeping genine ait bilgiler 29
Tablo 9. Nauphoeta cinera erişkin bireylerinde aday referans genlerin ifade kararlılığı 32

KISALTMALAR DİZİNİ

ACTB	B-aktin
ArgK	Arjinin kinaz
α- TUB	Alfa-tubulin
cDNA	Komplementer DNA
Ct	Döngü Eşiği
Cq	Niceleme döngüsü
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EF1α	Uzama faktörü 1-α
FRET	Floresan Rezonans Enerji Transferi
GADPH	Gliseraldehit-3-fosfat
HGK	Housekeeping gen
mRNA	Mesajcı RNA
N. cinerea	*Nauphoeta cinera*
RNA	Ribonükleik asid
RPS18	Ribozomal protein
RT-qPCR	Revers Transkriptaz -Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR	Polimeraz zincir reakiyonu
SDHA	Süksinit Dehidrojenaz Kompleksi

1. GİRİŞ

1.1. Hamam Böceklerinin Tarihi (Brunner Von Wattenwyl, 1882)

Hamam böcekleri (Dictyoptera kladı) dünya çapında yayılış gösteren ve yaklaşık 4.000 tür içeren ilkel kanatlı böceklerdir (Bell, 2007). Hamam böcekleri, böceklerin en eski ve en ilkellerindendir. Hamamböcekleri yaklaşık 350 milyon yıl önce (Myö) Silüriyen Döneminde evrimleşmişler ve Karbonifer döneminde doğmuştur. Aynı zamanda termitlere yol açan atalara ait bir soydan gelen peygamber develeriyle birlikte ayrıldıkları sonucunu elde etmişlerdir (Brenner, 2002). Daha yakın zamanlarda, araştırmacılar Dictyoptera'nın filogenisini (800 takson, 10.000 moleküler karakter, kontrollü fosil kanıtlarıyla birleştirildi) incelediler ve hamamböceği ve termitlerin en yakın ortak atalarının Permiyen dönemine, yaklaşık 275 Myö'ye kadar uzandığını belirlemişlerdir (Brenner, 2002).

Hamam böcekleri Blattodea takımına aittirler. Hamam böceklerinin takım adı bazen Blattaria olarakta verilir. Hamam böcekleri (Blattodea), kanatlı böceklerin eski ve çeşitli bir soyunu temsil etmektedir (Bell, 2007). Modern hamamböceklerinin yaklaşık 100 milyon yıl önce Kretase'de ortaya çıktığına inanılmaktadır (Grimaldi, 2005). Systema Natura'nin 10. baskısında, 15 Blattodae türü adlandırılmıştır. Bu türlerin %30'u insan ile ilişkilidir ve %1'den azının insan sağlığı sorunları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Fakoorziba vd., 2010).

1.1.1 Habitat

Hamam böceği türlerinin çoğu tropikal ve subtropikal bölgelerde yaşamaktadır (Roth, 2003). Hamam böceklerinin çoğu ekstrem koşullarda hayatta kalmak için çeşitli morfolojik, fizyolojik ve davranışsal adaptasyonlar gösterir (Bohn vd., 2010). Bu paurometabolik böcekler tipik olarak kayaların, ağaç kabuğunun, bitki çöplerinin, çöp yığınlarının, ölü odunların altında ve fundalık, bozkır, tuz bataklıkları, kıyı toplulukları, çöller ve mağaralarda yaşarlar (Bell, 2007)

Ayrıca ölü yapraklarda, çürüyen kütüklerde, akarsu ve akarsu kenarlarında, epifitlerde, arboreal su havuzlarında, sosyal böceklerin, kemirgenlerin, sürüngenlerin ve kuşların yuvalarında ve konutlar, gemiler ve uçaklar gibi insan yapımı yapılarda bulunurlar (Roth, 2003; Rodrigues vd., 2014) (Roth ve Willis, 1960). Bazı türler de insan binalarında

yaşamaktadır (Velez vd., 2006). Hamamböcekleri neredeyse tüm habitatlarda bulunur (Bell, 2007).

1.1.2 Şekil, boyut ve renk

Standart hamamböceği gövdesi basık ve geniş ölçüde ovaldir, başı kaplayan kalkan benzeri büyük bir pronotum, ventral olarak yerleştirilmiş, çiğneyen ağız parçaları, uzun ve oldukça segmentli antenleri vardır. Ön kanatlar (tegmina) tipik olarak köseledir ve arka kanatlar daha narin ve hiyalin yapısındadır. Koksa, femuru barındırmak için düzleştirilir ve modifiye edilir, böylece bacaklar vücuda yakın tutulduğunda iki segmentin birleşik kalınlığı azalır (Roth, 2003). Bu özeliği sayesinde çok iyi bir koşucudur ve dar olan yerlerden oldukça rahatlıkla geçebilir. Tehlike anında uçmak yerine kendince daha avantajlı olan koşmayı tercih eder ve yarık ve çatlaklara girerek saklanır. Başın büyük bir bölümü ve thorax üstten pronotum (exoskeleton) ile kaplamış ve koruyucu bir yapıya bürünmüştür (Aydın, 2016). Hamamböceklerinde vücut büyüklüğü 2,5 mm ile 78 mm arasında değişir ve hem en büyük hem de en küçük türlerden bazıları Blaberoidea'ya aittir (Djernaes vd., 2020).

1.1.3 Beslenme ve ekoloji

Hamamböcekleri tipik olarak omnivorlar, çöpçüler veya "klasik genelciler" olarak tanımlanır, karşılaştıkları herşeyle beslenebilen böceklerdir (Bell, 2007) . Haşere hamamböceklerinin insan yaşam alanlarındaki başarısı, sabun, yapıştırıcı gibi evrimleri sırasında doğal ortamlarında yaşarken karşılaşmadıkları diğer malzemelerle beslenebilmelerine bağlı olabilir. Hamam böcekleri, kanalizasyon, lağım çukurları, tuvaletler, septik tanklar, çöp kutuları, hayvan kafesleri ve biyolojik atık ürünlerinin olduğu her yer ile ilişkilidir. İnsan ve hayvan dışkılarına, çürüyen yiyeceklere, cesetlerden salgılara, balgam, irin ve benzerlerine olan ilgileri, onların halk arasında “iğrenme faktörü” olmalarına neden olmaktadır (Bell, 2007). Sokup ısıramamasına karşın vücutları üzerinde hastalık taşıyabildikleri için sevilmezler. Ekosistemin önemli bir parçası olan bu böcekler, bağırsaklarındaki protozoa ve bakteriler sayesinde hemcinsleri de dahil olmak üzere birçok şeyi yiyebilirler. Bu sebeple de ormanlardaki çöp ve diğer hayvan artıklarının yeniden doğaya kazandırılmasını hızlandırırlar (Aydın, 2016).

1.1.4 Sağlık

Hamamböcekleri dizanteri, gıda zehirlenmeleri, verem, gastroenteritis, antrax, pnomoni, hepatit, mantar hastalıkları, astım, allerjik reaksiyon gibi çeşitli hastalık mikroplarını taşır ve bulaştırırlar (Aydın, 2016). Hamamböcekleri, çeşitli mikroorganizmaların mekanik vektörleridir. Hem insan gıdası hem de insan dışkısı ile beslenme alışkanlıkları, insan için bir sağlık tehlikesi potansiyelini göstermektedir (Cochran, 1999). Hamamböceklerinin yüzeylerle rastgele teması, bakterilerin yayılmasını teşvik etmek için yeterlidir. Hamamböceklerinin omurgalılar için patojen olan yaklaşık 40 farklı bakteri türü ile doğal olarak kontamine olduğu bulunmuştur ve patojen olan diğer birçok tür deneysel olarak hamamböceklerine dahil edilmiştir (Cochran, 1999). Çürümüş ölü hamamböceği kalıntıları hava ile taşınarak solunum yoluyla alınırlar ve hassas insanlarda alerjiye neden olabilirler. Hamamböcekleri böcek toksikolojisi ve fizyolojisi alanlarında oldukça sık kullanıldıklarından bu alanlar için oldukça yararlıdırlar (Bell, 2007). Hamam böcekleri genellikle insanlara yakın yaşadıklarından, insan patojenleri için önemli bir rezervuar oluşturmaktadırlar. Bu nedenle bakteri ve diğer patojenleri yayma potansiyelleri nedeniyle tıbbi öneme sahiptirler (Fakoorziba vd., 2010; Atiokeng Tatang vd., 2017). *N. cinerea* cinsel seçilim (Bouchebti vd., 2016) ve metabolik hız ile uyum çalışmaları arasındaki korelasyonlar (Schimpf vd., 2012) için model olarak kullanılmaktadır. Omurgasızlar, memeli canlı kullanımını değiştirme, azaltma ve iyileştirmenin yanı sıra böceklerde bağışıklık tepkisinin temel ilkelerini anlamak için bulaşıcı hastalıklarla ilgili mekanizmaları anlamada etkili olmaktadır (Rossato vd., 2019).

1.1.5 Üreme ve çiftleşme

Hamam böcekleri vahşi doğada yaşayan taksonomik sınıflandırma açısından çok az bilgiye sahip ancak ayrıntılı olarak incelenen tek türdür. Bu nedenle yaşam öyküsü, beslenme alışkanlıkları ve davranış biyolojisi birçok hamam böceği türü için bilinmemektedir. McKittrick (McKittrick, 1964), çok çeşitli türlerde dış genital bölgeyi ve yumurtlama davranışını incelemiştir. Hamamböcekleri, termitler ve diğer böcek takımlarından şu özellikleriyle ayrılır: kanat boyutu ve damarlanma, ısıran-çiğneyen ağız parçaları ve belirgin cerci ile ilişkili morfolojik karakterler (Brenner, 2002).

Erkek hamamböceklerinin cinsel organları, böcek üreme yapılarındaki karmaşıklığın bir örneği olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Yetmiş yıl önce Snodgrass (1937), hamamböceklerinin "genital organlarının birbiriyle ilişkili işlevleri hakkında kesin bir

bilgimiz olmadığını" ve o zamandan bu yana durumun çok az iyileştiğini belirtmiştir (Snodgrass, 1937). Feromonal iletişim, üreme fizyolojisi, erkek rekabeti ve hamamböceklerinde kur yapmanın davranışsal yönleri hakkında geniş bir literatür varken, çiftleşme performansının "devasaları" ve özellikle erkek ve dişi cinsel organlarının nasıl etkilendiği hakkında şaşırtıcı derecede az şey bilinmektedir (Bell, 2007).

Üreme ile ilgili olarak, hamamböceklerinde üç temel çiftleşme modeli bilinmektedir (genellikle ilk kurdan sonra): A) Erkek (eğer varsa) kanatlarını kaldırır, dişi erkeğe biner ve erkek dişinin altındayken cinsel organları tutar, gerekirse geriye doğru hareket eder; hayvanlar daha sonra çiftleşmenin tamamlandığı uçtan uca bir pozisyon alırlar. B) Erkek dişiye biner ve uçtan uca pozisyonu almadan önce bu pozisyonda cinsel organı kavrar. C) Birleşme yapılmaz; erkek ve dişi cinsel organlarla doğrudan uç uca bağlanır ve bu pozisyonda kalır. Her üç model de Blaberoidea'da ailesinde gözlemlenmektedir (Djernaes vd., 2020).

Tablo 1. Hamamböceklerinde vücut uzunluğuna göre sperm uzunluğu. Jamieson (1987) ve Vidlicka Huckova'dan (1993) sperm verileri (Bell, 2007).

Türler	Yaklaşık gövde uzunluğu (mm)	Sperm uzunluğu (μ)	Gövde uzunluğu:sperm uzunluğu oranı
Blattella germanica	12.0	450	27:1
Pycnoscelus indicus	~ 21.0[2]	250	84:1
Nauphoeta cinera	27.0	300	90:1
Periplaneta americana	37.5	85	441:1
Blaberus craniifer	55.0	180	306:1

Hamamböcekleri yumurta bıraktıklarında dişiler yumurtalarının etrafına özel bir kapsülle "üreme sistemi sıvısı" salgılarlar. "Ooteca" olarak bilinen bu yapı özel bir adaptasyon sonucu oluşmuştur ve yalnızca hamamböcekleri ve peygamberdevelerinde (Mantidae) bulmaktadır (Aydın, 2016). Bu kese şeklindeki kapsüller tipik olarak 5 ila 40 embriyo içerir ve renkleri sklerotizasyon derecesine bağlı olarak açık kahverengiden kestane kahverengiye kadar değişmektedir. Ootekanın ön boyunu geçen bir omurga, gelişen embriyolara su ve havanın taşınmasına izin vermektedir (Bell, 2007). Her embriyo, dışarıdan belli olabilen veya görünmeyen ayrı bir bölmede bulunur. Hamamböceklerinin çoğunda üreme, bir yumurtalık oluşumu ile karakterize edilir: yumurtalar yumurtalıklardan salınır, yumurta kanallarından aşağı doğru hareket eder, yumurtlama valfleri tarafından iki sıraya yönlendirilir, ardından koruyucu bir örtü ile çevrelenir (Bell,

2007). Üç genel üreme kategorisi tanınır, bunlardan ikisi alt kategorilere ayrılır (Tablo 2). Oviparite tipi A'da dişiler, oluşumdan kısa bir süre sonra yumurta kesesini düşürür. Oviparite tip B'de dişiler, embriyonik gebelik boyunca ootheca'yı harici olarak taşırlar, daha sonra yumurtadan çıkmadan hemen önce bırakırlar; ooteka anneye bağlıyken yumurtalar da yumurtadan çıkabilir (Bell, 2007). Ovovivipar dişiler, yumurtaları dahili olarak hamile bırakır, ancak embriyolar, gelişimi desteklemek ve beslemek için öncelikle yolk besinlerine güvenir. Kategori A yumurtlayan dişilerde, yumurtacı taksonlarda olduğu gibi, ootheca önce ekstrüde edilir, ancak yapışık kalır ve kısa bir süre sonra bir kuluçka kesesine geri çekilir (Bell, 2007). Nimfler yumurtadan çıkmaya hazır olduğunda, ooteka tamamen ekstrüde edilir ve yenidoğanlar embriyonik zarlarından çıkar. Yumurtalar, ovoviviparous tip B türlerinde doğrudan yumurta kanallarından kuluçka kesesine bırakılır; ootekal durum yoktur. Viviparite formlarda, yumurtlama, ovoviparite tip A hamamböceklerine benzer, ancak embriyolar anne tarafından salgılanan proteinli bir sıvı üzerinde kuluçka kesesi içinde beslenir (Bell, 2007).

Tablo 2. Hamamböceği üreme modları (Roth, 2003)

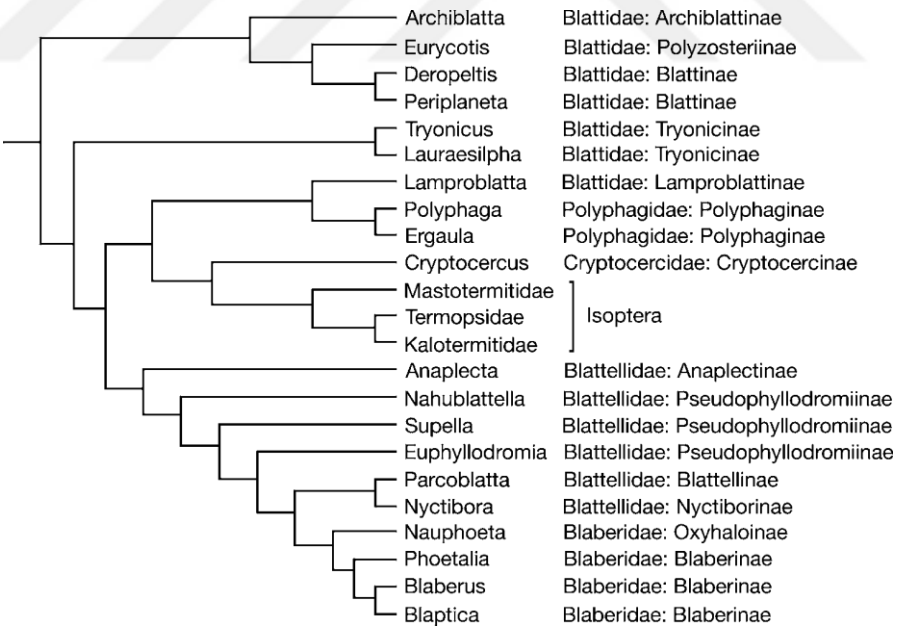
Karakter	Oviparite A	Oviparite B	Ovoviparite A[1]	Ovoviparite B[2]	Viviparite[3]
ootheca'nın işlenmesi	Oluşumdan kısa bir süre sonra düştü	Gebelik boyunca dışarıdan taşınır	Oluştuktan sonra kuluçka kesesine geri çekilir.	Muhtemelen suda çözünür malzeme	Oluştuktan sonra kuluçka kesesine geri çekilir.
Yumurta kabuğunun fiziksel özellikleri	Sert ve karanlık, tamamen çevreleyen yumurtalar	Proksimal uç geçirgendir	Çoğunda, değişken olarak azaltılmış ve eksik	—	Eksik membran
Su taşıma	Yumurtalarda yeterli su veya substrattan emilen ek su	Embriyogenez sırasında dişiden su alır	Dişi embriyogenez sırasında dişiden su alır.	Dişi embriyogenez sırasında dişiden su alır.	Embriyogenez sırasında dişiden su alır
Anneden yolk besini olmayanlar?	Yok	Suda çözünür materyal	Muhtemelen suda çözünür materyal	Muhtemelen suda çözünür materyal	Kuluçka kesesinin duvarlarından proteinli salgı
Takson	Blaberidae ve bazı Blattellidae hariç hepsi	Birkaç Blattellidae	Birkaç Blattellidae, çoğu Blaberidae	Bir Blaberidae kabilesi (Geoscapheini)	Bilinen bir Blaberilidae türü
Örnekler	*Periplaneta, Eurycotis*	*Blattella, Lophoblatta*	*Blaberus, Nauphoeta*	*Macropanesthia, Geoscapheus*	*Diploptera punctata*

[1] 'Yanlış' ovoviviparite önceki çalışmaların

[2] 'Gerçek' ovoviviparite

[3] 'Yanlış' viviparite.

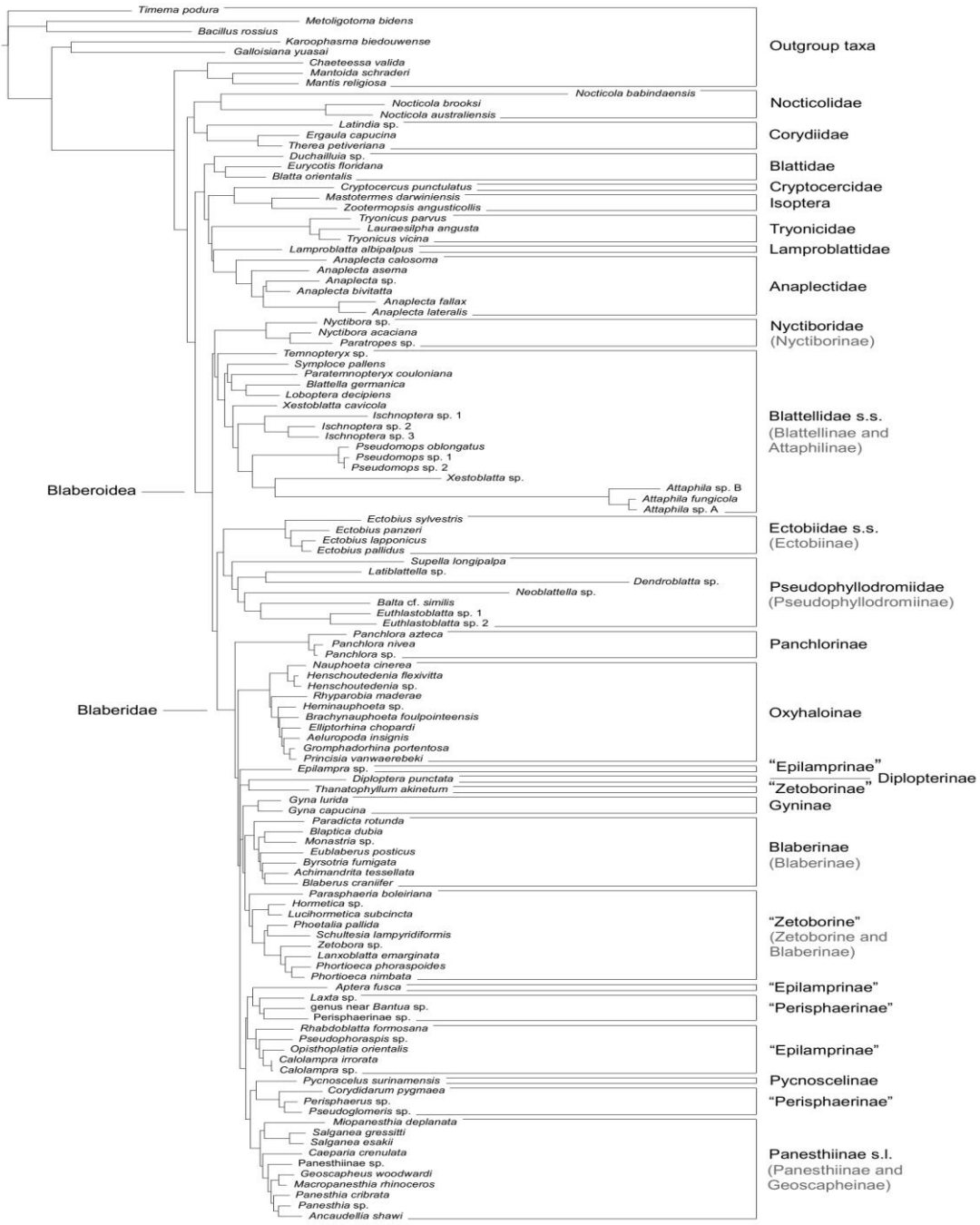
Hamam böceği evriminin biri Blattoidea süper ailesine (Cryptocercidae ve Blattidae aileleri), diğeri ise üst aileye Blaberoidea'ya (Polyphagidae, Blattellidae ve Blaberidae aileleri) giden iki satırda ilerlediği öne sürülür (Wu, 2013). McKittrick'in (McKittrick, 1964) çalışmasına dayanarak, Roth (Roth, 2003) altı hamam böceği ailesini tanımıştır: Polyphagidae, Cryptocercidae, Nocticolidae, Blattidae, Blattellidae ve Blaberidae; Hamam böceklerinin çoğu son üç ailede bulunmaktadır. Ancak bazıları hamam böceklerini beş aileye ayırmıştır ve tek tip Cryptocercidae familyasının diğer hamam böcekleriyle monofiletik olup olmadığı konusunda bazı tartışmalar bulunmaktadır (Inward vd., 2007). Blaberidae familyası (1020 tür), en son evrimleşmiş hamamböceği ailesidir ve en kapsamlı adaptif radyasyona maruz kalmıştır. Grup öncelikle tropikaldir ve en büyük hamam böceği türlerini içermektedir. Üyeleri genellikle kütüklerin altında, humusta vb. yerlerde bulunmaktadır, ancak bazı türlerinin ise arboreal olduğu bilinmektedir (Wu, 2013). Hamam böceği sınıflandırması (Djernaes vd., 2012) üzerinde evrensel bir anlaşma olmamasına rağmen Blaberidae çeşitli biyolojisi, yaşam öyküsü ve dağılımı olan hamam böcekleri (Bell, 2007), (Djernaes vd., 2012) arasından türetilmiş bir aile olarak kabul edilmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Morfolojik ve yaşam öyküsü karakterinin kladistik analizine dayanan hamamböceği filogenisi (Bell, 2007).

Hamam böcekleri vahşi doğada yaşayan taksonomik sınıflandırma açısından çok az bilgiye sahip ancak ayrıntılı olarak incelenen tek türdür (Şekil 2). Bu nedenle yaşam

öyküsü, beslenme alışkanlıkları ve davranış biyolojisi birçok hamam böceği türü için bilinmemektedir (Bell, 2007).



Şekil 2. Sekiz (ML-TP) kullanılarak kırpılmış veri setinin Maksimum Olabilirlik analizinden elde edilen ağaç. Siyah renkli aile ve alt aile adları burada tanıtılan taksonomik değişiklikleri yansıtır (çift tırnak içindeki adlar monofiletik olmayan grupları belirtir); 'eski' isimler gri ve parantez içinde verilmiştir (çift tırnak ile işaretlenmemiş monofiletik olmayan gruplar (Djernaes vd., 2020).

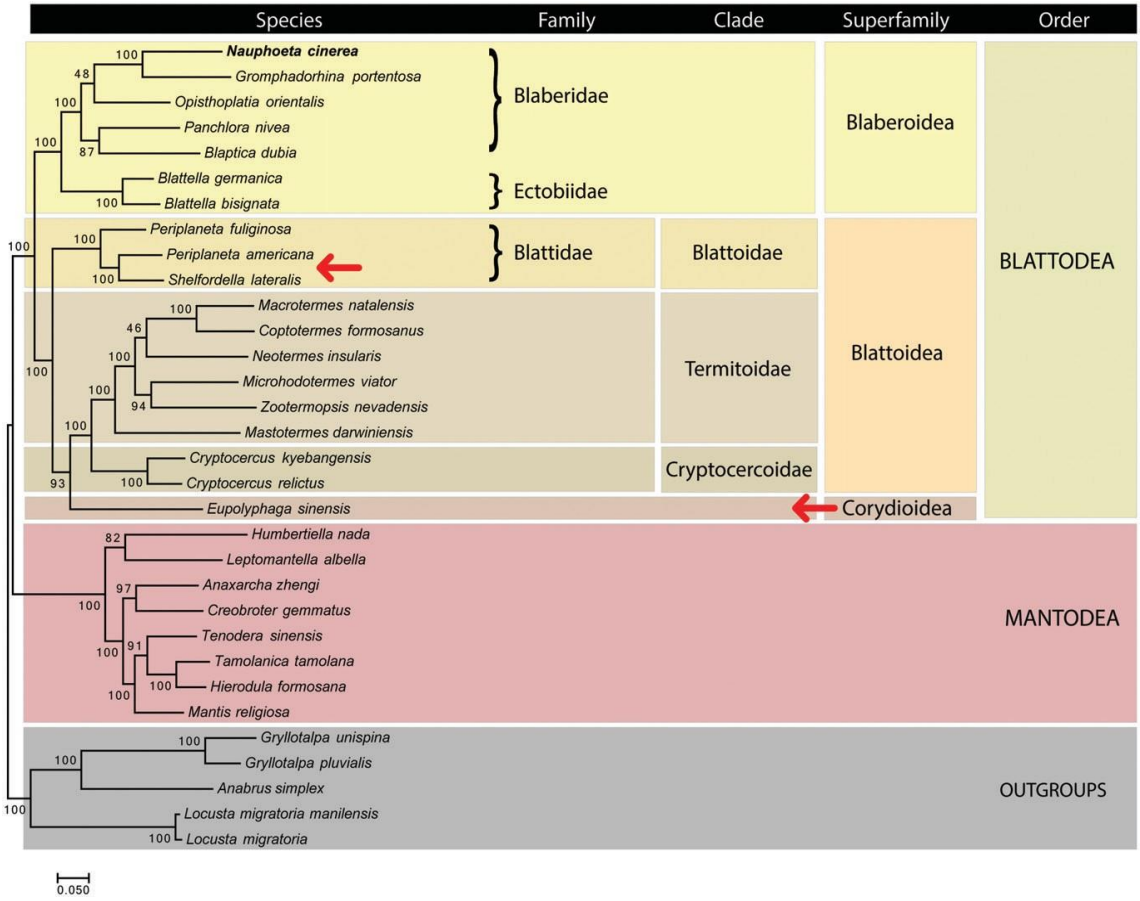
Erkeklerin ürettiği feromonlar ve erkek ve dişi davranışları, eş seçim sürecine aracılık etmektedir. İlk ootheca çiftleşmeden yaklaşık bir hafta sonra ortaya çıkar. Diğer blabaridlerde olduğu gibi, yumurta kesesi uzatılır, döndürülür ve ardından dişinin kuluçka odasına geri çekilir. Kuluçka süresi yaklaşık 35 gündür. Bir dişi 20'ye kadar oothecae üretebilir ancak genellikle sayı çok daha azdır. Ardışık nimf yavrularının ortaya çıkması arasında yaklaşık 40-45 gün geçer ve dişi yaşlandıkça bu süre uzar. Oothecae'nın her biri ortalama 26-40 yumurta arasında değişmektedir. Nimfler 30-36°C'de 87-94 gün boyunca 7-8 kez tüy dökmektedir. Yumurtadan yeni çıkan nimfler dişinin üstünde ve altında sürünme davranışı gösterirler (Cochran, 1999).

Tropikal bir böcek olarak *N. cinerea*, görünüşe göre, bitki materyalleriyle beslenen bir dış mekan türüdür. İnsanlarla olan ilişkisine bakacak olursak limanlara sık sık girmektedir. Evlerden ziyade binaların çevresinde bulunur, ancak evlerde görüldüğüne dair raporlar vardır. Özellikle balık yağları içereren, hayvansal gıdalara karşı bir düşkünlüğü vardır. Öğütme tesisleri, gıda depolama barakaları vs. sık sık istilasına uğrar. Bu gibi durumlarda lokal olarak çok yaygın hale gelebilir. Avustralya'daki bir hastaneden bildirilmiştir ve Sudan'daki yerli kulübelerde düzenli olarak ikamet etmektedir. Seraların ılıman bölgelerinin onun için ideal bir konut türü olması beklenebilir. Ayrıca en az bir başka hamamböceği türüyle beslendiği için yırtıcı olduğu da rapor edilmiştir (Cornwell 1968).

1.2. *Nauphoeta cinera* (Olivier 1789)- Lobster, Benekli veya Sinirli Hamam Böceği

Blaberidae 12 alt aileye ayrılır: Blaberinae (23 cins), Diplopterinae (1), Epilamprinae (47), Geoscapheinae (4), Gyninae (5), Oxyhaloinae (17), Panchlorinae (5), Panesthiinae (7), Paranauphoetinae 1), Perisphaerinae (19), Pycnoscelinae (3) ve Zetoborinae (14) (Djernaes vd., 2020). *Nauphoeta cinera* (Olivier, 1789) lobster hamam böceğinin taksonomik sınıflandırması tablo 3'de ayrıntılı olarak verilmiştir (Schoch vd., 2020). Blaberidae familyasına ait, halk arasında benekli veya lobster hamamböceği olarak bilinen *Nauphoeta cinera* 'nın Doğu Afrika'ya özgü olduğu (Laurent Salazar vd., 2018) ve cinsinin tek temsilcisi olduğu bilinmektedir. Bu tür ilk olarak 1789'da Fransız entomolog Guillaume-Antoine Olivier tarafından *Blatta cinerea* olarak tanımlanmıştır. 1838'de Hermann Burmeister, bu tür için yeni bir cins olan Nauphoeta'yı bulmuştur ve ona mevcut iki terimli *Nauphoeta cinera* adını vermiştir. Mevcut dağılımı dünyanın tropikal bölgelerini kapsamaktadır. Gece, higrofilik ve termofilik böceklerdir (Katoh vd.,

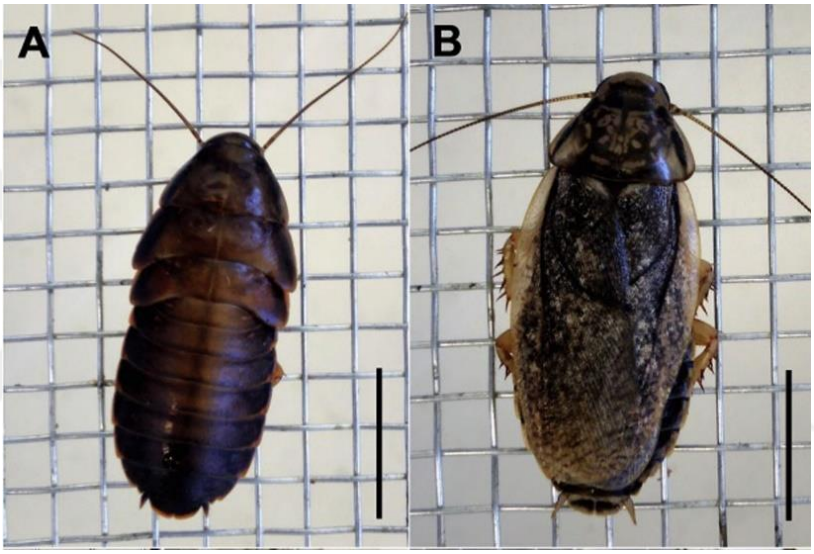
2017). Sinantropik bir tür olmalarına rağmen, araştırmalar insan için hastalık vektörleri olmadıklarını kanıtlamıştır (Katoh vd., 2017).



Şekil 3. Blattodea'nın mitokondriyal filogenomikleri ve maksimum olasılıkta bir süper matris yaklaşımı kullanan dış gruplar (Dumans vd., 2017)

Blaberoidea üst familyasından hamam böcekleri için mevcut olan 6 tam mitokondriyal genomun tamamı indirilmiş ve *N. cinerea*'nın mitogenomuyla karşılaştırılmıştır. Ayrıca, Termitoidae'nin 6 mitokondriyal genomu, Cryptocercoidae'nin 2 mitogenomu ve Blattoidae'den 3 mitogenom dahil olmak üzere, Blattoidea süper ailesinden tam mitokondriyal genomları da indirilmiştir. Tüm mitokondriyal genlerin birleştirilmiş hizalamasını sunan bir süper matris veri seti (Şekil 3) maksimum olabilirlik filogenisi için girdi olarak kullanılmıştır (Dumans vd., 2017). Bu tür bazen cinereous hamamböceği olarak da adlandırılır. Ekvatorun altındaki Doğu Afrika'da ortaya çıktığına inanılmaktadır (Rehn, 1945). Bu nedenle, mevcut dağılımının dünya çapında olduğu ancak daha çok tropik ve subtropiklerle (sirkumtropik) görülmektedir (Cochran, 1999). Muhtemelen başlangıçta Doğu Afrika'dan Madagaskar Cumhuriyeti'ne (Madagaskar), Mauritius, Endonezya, Singapur, Filipinler ve Uzak Doğu'nun diğer bölgelerine nakliye yoluyla

yayıldı (Rehn, 1945). Şu anda Avustralya, Tayland, Ryukyus Adaları dahil olmak üzere dünyanın pek çok yerinde görülmektedir, ancak Japonya görünmemektedir. Afrika kıtasının doğu bölgesinin çoğuna ve Mısır'a kadar kuzeye yayılmıştır. Yeni Dünya'da Afrika'dan Brezilya'ya ve Filipinler'den Meksika'ya taşınmıştır. Batı Hint Adaları'nın bazı bölgelerine yayılmıştır, Florida'da ve güney ve güneybatı ABD'nin diğer eyaletlerinde bulunmaktadır. Ilıman bölgelerde ve korunan ortamlarda yaşadığı İngiltere ve Almanya'dan bildirilmiştir (Cochran, 1999). Ekvador (Meksika, Küba, Galapagos Adaları), Avrupa (Danimarka) ve Güney Amerika (Brezilya ve Amerika Birleşik Devletleri) dahil olmak üzere diğer kıtaları gemilerle kolonileştirmeyi başarmışlardır.



Şekil 4. N. cinerea (A) Nimf. (B) Yetişkin (Rossato vd., 2019)

Bu tür bahçe gibi kentsel alanlarda yaşamaktadır, ancak aynı zamanda ormanlardaki çöplerin altında da bulunabilmektedir (Alias ve Retnani, 2018). *N. cinerea'*nın bitkisel ürünlerle beslenen bir dış mekan türü olduğu bilinmektedir (Cochran, 1999). Lobster hamamböceği adını pronotumundaki tasarımdan almıştır. Yetişkinlerin 25-29 mm uzunluğunda orta büyüklükte, grimsi bir renge ve benekli kanatlara sahip olduğu bildirilmiştir (Şekil 4). Kanatları oldukça kısa olduğu ve karnını kaplamadığı bilinmektedir. Benekli bir görünüm gösterirler (Silva ve Pelli, 2020). Bu dönemde ortalama 8 ekdizis ile yaklaşık 1 yıllık yaşam ömrüne sahiptirler. Hareketsiz evre (pupa) olmadan yumurta, nimf ve yetişkin aşamalarından geçen eksik metamorfoz göstermektedirler (Dos Santos vd., 2019). Nimfler ayrıca pronotal tasarımı taşır ve

abdominal tergitlerin antero-lateral kenarlarında işaretler bulunur. *Nauphoeta cinera'*nın bir ovovivipar hamam böceği olduğu bilinmektedir (Bouchebti vd., 2016). Oothecae 15-18 mm uzunluğundadır ve yumurtaların konumunu gösteren net girintilere sahiptir. Diğer hamamböceklerinde olduğu gibi içeride tutulurlar, açık renklidirler ve genellikle kavisli veya hilal şeklindedirler. Bu türün erginleri laboratuvar koşullarında yaklaşık bir yıl yaşar. Çiftleşme, yaklaşık altı günlük yetişkinlikten sonra gerçekleşir. Dişiler, sosyal hakimiyet elde etmiş erkekleri tercih ederek eş seçimi sergilerler. (Cochran, 1999).

Yapılan bir çalışma, *Nauphoeta cinera* bireylerinin karanlık dönemde daha fazla aktivite gösterdiğini ve hamamböceklerinin gece alışkanlığı olduğunu yeniden doğrulanmıştır (Silva ve Pelli, 2020).

Tablo 3. Nauphoeta cinera (Olivier, 1789) lobster hamam böceğinin taksonomik sınıflandırması (Schoch vd., 2020)

TİP	**Canlılık** (Biota)
ALAN	Ökarya
ALEM	Metazoa Linnaeus,1758- **Hayvan**
KLAD	Opisthokonta
KLAD	Eumetazoa Bütschli,1910
KLAD	Bilateria Haeckel,1874
KLAD	Protostomia Grobben,1908
KLAD	Ecdysozoa Aguinaldo, Turbeville, Linford, Rivera, Garey, Raff and Lake, 1997
KLAD	Panarthropoda Nielsen,1995
ŞUBE	Arthropoda Latreille,1829-**Eklem Bacaklılar**
KLAD	Mandibulata
KLAD	Pancrustacea Zrzavy and Stys,1997
ALT ŞUBE	Hexapoda Blainville,1816-**Altı ayaklılar**
SINIF	Insecta Linnaeus,1758- Böcek
KLAD	Dicondylia Henning,1953
ALT SINIF	Pterygota Brauner,1885- **Kanatlı böcekler**
İNFRA SINIF	Neoptera Martynov,1923- **Modern, kanat katlayan böcekler**
KOHORT	Polyneoptera
ÜST TAKIM	Dictyoptera
TAKIM	Blattodea Brunner von Wattenwyl,1882 -**Hamam böcekleri, termitler**
ÜST AİLE	Blaberoidea
AİLE	Blaberidae Brunner von Wattenwyl,1865
ALT AİLE	Oxyhaloinae Roth,1971- **Dev hamam böcekleri**
CİNS	Nauphoeta Burmeister, 1838
TÜR	*Nauphoeta cinera* (Olivier, 1789) – **lobster hamam böceği, sinirli hamam böceği veya benekli hamam böceği**

1.2.1. *Nauphoeta cinera*'da (Olivier 1789) yapılan çalışmalar

Hamam böcekleri genellikle insanlara yakın yaşadıklarından, insan patojenleri için önemli bir rezervuar oluşturmaktadırlar. Bu nedenle bakteri ve diğer patojenleri yayma potansiyelleri nedeniyle tıbbi öneme sahiptirler (Fakoorziba vd., 2010; Atiokeng Tatang vd., 2017). *N. cinerea* cinsel seçilim (Bouchebti vd., 2016) ve metabolik hız ile uyum çalışmaları arasındaki korelasyonlar için model olarak kullanılmaktadır (Schimpf vd., 2012) . Omurgasızlar, memelilerin kullanımını değiştirme, azaltma ve iyileştirmenin yanı sıra böceklerde bağışıklık tepkisinin temel ilkelerini anlamak için bulaşıcı hastalıklarla ilgili mekanizmaları anlamada etkili olmuştur. *N. cinerea*, bakteriyel enfeksiyonlarla ilgili çalışmalar için uygun ve umut verici bir model olduğunu kanıtlamaktadır (Rossato vd., 2019). Ayrıca *N. cinerea* laboratuvar ortamlarında birçok davranışsal ve cinsel seçilim çalışmasının konusu olmuştur (Kambhampati vd., 2013)

Akustik iletişim, böcek türlerinde davranış ve soyoluş çalışmaları hakkında bilgi vermektedir. Tanımlanmış 4600 hamamböceği türü olmasına rağmen, az sayıda çalışma akustik olarak iletişim kurma yeteneklerine odaklanmıştır (Beccaloni, 2014). Eklembacaklılarda akustik iletişim üzerine yapılan araştırmaların çoğu Orthoptera, Hemiptera ve Lepidoptera takımlarına odaklanırken Blattodea'da ses üretimi üzerine nispeten az araştırma yapılmıştır (Hartman ve Roth, 1967). Hamamböceklerinin çeşitli şekillerde ses çıkardıkları bulunmuştur. Gromphadorhini kabilesindeki türler, genellikle tıslama olarak adlandırılan değiştirilmiş spiracles yoluyla ses üretmektedir (Hunsinger vd., 2017).

Drosophila model organizma olarak iyi bilinmektedir ve kullanılmaktadır ancak model organizma olarak hamamböceği kullanımı en başta toksikoloji araştırmalarında kullanılmaktadır (Segatto vd., 2018). *Nauphoeta cinera* üzerinde çalışılan türlerden biridir ve avantajları arasında kolay laboratuvar bakımı bulunmaktadır. Bu türün yetişkinleri, laboratuvar koşullarında yaklaşık bir yıl yaşamaktadır. Çiftleşme, yaklaşık altı günlük yetişkinlik döneminden sonra gerçekleşmektedir (Cochran, 1999). Bununla birlikte, *N. cinerea* hakkında az miktarda genetik veri mevcuttur, bu da gen tanımlamasını, ifade analizlerini, genetik çalışmalarını ve fonksiyonel biyolojisinin daha derin bir şekilde anlaşılmasını engellemektedir (Segatto vd., 2018). Lobster hamam böceği *Nauphoeta cinerae* (Olivier), toksikoloji için deneysel bir model olarak

kullanılmıştır ve temel toksikolojik çalışmalar için geçerli bir alternatif olduğu gösterilmiştir (Rodrigues vd., 2013; Adedara vd., 2015; Adedara vd., 2016) .

Lobster hamam böceği *N. cinerea* MeHg toksisitesini araştırmak için umut verici bir model olmuştur (Adedara vd., 2015; Adedara vd., 2016; Afolabi vd., 2018). Yapılan bu çalışmada, nörotoksik maddeler olarak bilinen MeHg ve MSG içeren bir diyete maruz kalan *N. cinerea* nimflerindeki çeşitli antioksidan genlerin transkripsiyonel seviyelerindeki olası değişiklikleri ilk kez araştırılmışır. Bu toksik maddelere maruz kalma, insanların balık ve baharatlı gıda tüketimine yansımaktadır (Ekino vd., 2007; Nogara vd., 2019). Omurgasız hayvan modelleri sinirbilim araştırmalarında kullanım kolaylığı nedeniyle önemli ölçüde desteklenmektedir (Balogun vd., 2018). Sonuçlar, *N. cinerea*'nın beyninde Hg'nin yaklaşık üç kat arttığını göstermiştir; bu yüksek MeHg seviyelerine maruz kalan farelerde bildirilenden daha düşüktür. Yapılan bu çalışma ayrıca temel toksikolojik ve moleküler çalışmalar için alternatif ve tamamlayıcı model olan *N. cinerea* kullanımını desteklemektedir. *N. cinerea* ayrıca pestisitler, insektisitler ve eser veya ağır metaller gibi biyolojik olarak birikmiş çevresel kirleticilerin biyobelirteçleri olarak da kullanılabilir (Afolabi vd., 2018).

Bilimsel çalışmalarda kullanılan diğer hamamböceği türleri ile karşılaştırıldığında, *N. cinerea'nın* bakımı kolaydır ve uçmaz. Bu durum laboratuvarda bakımını kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte, şimdiye kadar bu tür için çok az genetik dizilim mevcuttur ve kantitatif gerçek zamanlı PCR gibi moleküler biyoloji tekniklerini kullanan çalışmaların uygulanması zahmetli olmuştur (Segatto vd., 2018). *N. cinerae* hamamböceklerinin genetik ve transkriptomik bilgisi azdır. Transkriptom dizilimi, model olmayan organizmalar için uygun maliyetli bir araçtır ve yüksek verimli dizileme teknolojileri bir türün genomik karakterizasyonu ve gen keşfi için etkili bir yöntemdir. Yapılan bir çalışmada *Nauphoeta cinera*'nın 5.15'lik bir C değerine (pg) ve yaklaşık 5.000 Mb'lik bir genom boyutuna sahip olduğu bulunmuştur (Koshikawa vd., 2008). Yapılan bir başka çalışmada, *N. cinerea*'da gen tanımlanması ve ekspresyon analizi için halka açık bir veri tabanı oluşturan toplam 24.980.364 okuma ve 57.928 gen elde edilmiştir. Burada sunulan veriler, nükleik asit dizilerine dayalı olarak *N. cinerea*'nın yağ vücut metabolizmasını anlamak için bir başlangıç noktasıdır (Segatto vd., 2018).

Bir başka çalışmada üreme döngüleri olan hamam böceği *Nauphoeta cinera*'nın dişilerinde yumurtalık apoptozunun düzenlenmesindeki niceliksel genetik varyasyonu tahmin edilmiştir. Daha önce üremeyi geciktirmenin doğurganlık kaybına neden

olduğunu bulunmuştur. Burada dişilerin aşırı veya sınırlı gıda koşulları altında üremeleri geciktirilmeye zorlanmıştır ve her iki koşulda da apoptoz incelenmiştir. Ancak dişilerin yiyeceğe sınırsız erişimi olduğunda apaptoz görülmemiştir. Dişiler cinsel olgunlaşma sırasında sınırlı bir açlık periyodu yaşadığında apoptoz seviyelerinde önemli aditif genetik varyasyon saptanmıştır. Bu nedenle seleksiyon bazı çevresel koşullar altında yaşla birlikte doğurganlık kaybı oranını değiştirmek için yumurtalık apoptozunun düzenlenmesi üzerinde etkili olabilir. Sonuçlar, doğurganlık kaybının nasıl geliştiğinin anlaşılmasının, apoptozun düzenlenmesinde yer alan genler ile diyet gibi çevresel faktörler arasındaki etkileşimin anlaşılmasını gerektirdiğini göstermektedir (Edvardsson vd., 2009).

Hamam böcekleri ve gregarinleri elde etmek kolay ve uygun maliyetlidir, kültürde kolayca muhafaza edilmektedir. Deneysel çalışmalara yatkındır ve etkili konak-parazit deneysel modelleri sağlamaktadır (Clopton ve Smith, 2002; Smith ve Clopton, 2003). Deneysel modellerin daha geniş kullanımlarının ve geliştirilmelerinin önünde önemli engeller bulunmaktadır: Hamam böceklerindeki gregarin biyoçeşitliliği büyük ölçüde bilinmemektedir. Hamam böceği-gregarin taksonomisinin yeterli ölçüde bilinmemesi parazitlerin kolayca tanımlanmasını engellemektedir (Clopton ve Smith, 2002; Clopton ve Hays, 2006).

Yapılan bir diğer çalışmada *Nauphoeta cinera'*nın protein değeri yüksek bulunmuştur. Bu özelliğinden dolayı besin olarak kullanıldığı akademik çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların amacı, buğday ekmeğinin protein açısından zenginleştirilmesi için lobster hamam (*Nauphoeta cinera)* böceğinden un üretmektir (de Oliveira vd., 2017). Hayvanlar ve böcekler ana protein kaynakları olarak gösterilmiştir. Böceklerin kayda değer besin değeri bulunmaktadır. Yenilebilir böceklerin çoğu yüksek düzeyde protein, esansiyel amino asitler, lipidler (çoğunlukla doymamış yağ asitleri), lif (kitin), bazı mikro besinler (demir, bakır ve çinko gibi) ve vitaminleri (ör. tiamin, riboflavin ve niasin) içermektedir (Belluco vd., 2013; Van Huis, 2013; Schlüter vd., 2017). Bu genellikle geleneksel et ve balık ürünleriyle karşılaştırılabilir (tür, miktar ve biyoyararlanım açısından) ve hatta böceklerin besin bileşenleri daha yüksek bulunmuştur (Van Huis, 2013; Schlüter vd., 2017).

Bilimsel çalışmalarda kullanılan diğer hamam böceği türleri ile karşılaştırıldığında *N. cinerea'*nın kullanımı kolaydır ve uçmaz. Bu durum laboratuvarda bakımını kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte şimdiye kadar bu tür için çok az sayıda genetik dizi

mevcuttur ve gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) gibi moleküler biyoloji tekniklerini kullanan çalışmaların uygulanması zahmetli olmuştur (Segatto vd., 2018). Burada *N. cinerea'nın* referans genlerini belirleyerek özellikle RT-qPCR ile relatif gen ekspresyon analizlerinin gerçekleştirileceği moleküler çalışmalara referans olacak bir çalışma olması hedeflenmektedir.

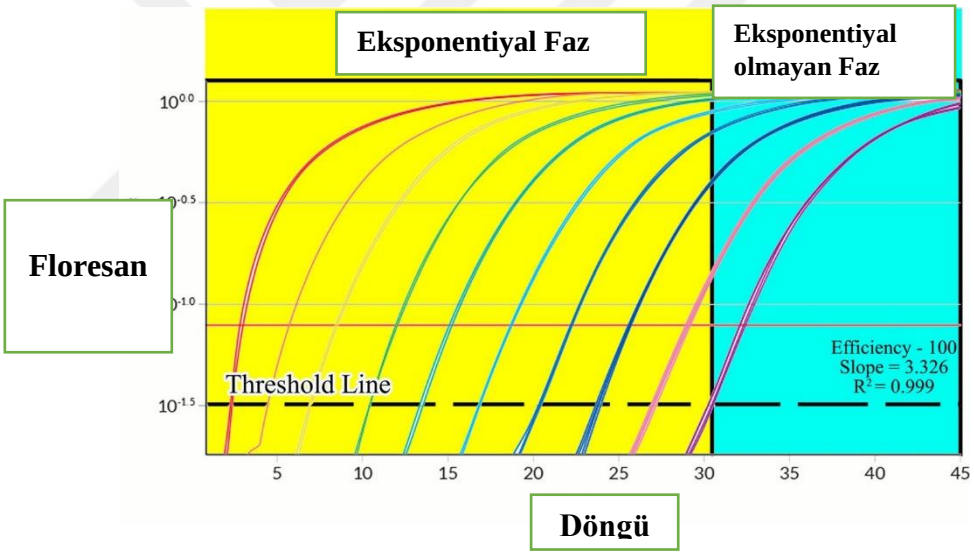
1.3. RT-qPCR

Kantitatif gen ekspresyon analizlerinde kullanılan bu analiz yöntemleri arasında bir gene ait hedeflenen mRNA'nın yüksek duyarlılıkta belirlenebilmesi, hedef bölge çoğaltımı ve kantitatif belirleme aşamasının tek bir cihaz ile yapılabilmesi yönünden en yaygın olarak kullanılan yöntem ters transkriptaz-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonudur (RT-qPCR) ve gen ekspresyon analizlerinde kullanılan doğru, hızlı ve hassas bir tekniktir (Jarczak vd., 2014; Tilli vd., 2016). RT-qPCR normalizasyonu için uygun referans genlerin seçimi, gen ekspresyon seviyelerinin güvenilir ölçümleri için temel bir ön koşuldur (Lü vd., 2018). Bunun yanında; gen ekspresyonundaki nispi değişikliklerin eş zamanlı izlenmesini sağlayan ve mRNA ekspresyonu ile ilişkili "altın standart" olarak kabul edilen güçlü bir teknik olmuştur (VanGuilder vd., 2008). RT-qPCR önde gelen bir moleküler biyoloji aracıdır ve gerçek zamanlı olarak gen ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi için güçlü bir yöntemdir (Vandesompele vd., 2002). RT-qPCR'de, floresan boyaların PCR ürünü ile bağlanmasıyla tetiklenen floresandaki artış ölçülerek, reaksiyon sırasında amplifikasyon ürünlerinin birikimi sürekli olarak belirlenir (Rodríguez vd., 2015). Floresan sinyali, PCR ürün birikimi ile orantılı olarak artmaktadır. Daha sonra döngü sayısına karşı floresan grafiğini çizen standart bir eğri oluşturulur. Eşik döngüsü (Ct) olarak da adlandırılan niceleme döngüsü (Cq), reaksiyonun floresan sinyalinin eşiği geçmesi için gereken döngü sayısıdır (Rodríguez vd., 2015). Her bir döngüde açığa çıkan floresan miktarı kaydedilir ve PCR ürünündeki ilk anlamlı artışın gözlendiği eksponensiyal faz görüntülenir (Şekil 5). PCR ürününün eksponensiyel artış gösterdiği ilk döngü baslangıç materyalinin miktarı ile doğru orantılıdır. Başlangıçtaki hedef DNA miktarı ne kadar fazla ise ilk anlamlı artış o kadar erken olacaktır. PCR ürünleri eksponensiyal faza o kadar erken girecektir. Ct değeri, sistemin floresan miktarındaki artışı farketmeye başladığı ve PCR ürününün log-lineer fazda eksponensiyal olarak artmaya başladığı zamandır. 40 döngünün üzerindeki bir Ct değeri çoğalma olarak adlandırılamaz ve hesaplara katılamaz. Ct değerleri, numunedeki nükleik asit miktarı ile ters orantılıdır (Rodríguez vd., 2015).

Düşük Ct değerleri yüksek miktarda hedeflenen nükleik asidi gösterirken, yüksek Ct değerleri hedef nükleik asidin daha düşük (ve hatta çok az) miktarlarını ifade eder. Tipik olarak, 29 döngünün altındaki Ct değerleri bol nükleik asit gösterirken 38 döngünün üzerindeki Ct değerleri minimum miktarları göstermektedir. Bir primer seti ya da prob seti için bütün PCR ürünlerinin aynı erime sıcaklığına sahip olması beklenir (Şekil 6C). Kontaminasyon, spesifik olmayan bir çoğalma ve primer dimer oluşumu gibi kalıntılar farklı erime sıcaklığına sahiptirler. Eş zamanlı PCR ile ürünleri agaroz jelde yürütmeden önce erime sıcaklığı grafiklerinden faydalanarak spesifik olmayan bağlanmaları ve primer dimerleri saptamak mümkündür. (Rodríguez vd., 2015).

PCR'ın temel fazları 3'e ayrılır:

1. Eksponentiyal Faz
2. Linear Faz (yüksek farklılık)
3. Plato Fazı (Rodríguez vd., 2015)



Şekil 5. Amplifikasyon planı. PCR döngüsü sayısına karşı taban çizgisi çıkarılmış floresan (Shakeel vd., 2018).

RT- qPCR'da Önemli hususlar:

1. Primer Tasarımı
2. Çoğalma verimi (SYBR Green veya TaqMan probu gibi)
3. Referans Gen Seçimi (GAPDH, ACTB gibi)

Real Time PCR'da floresan raportörler:

1. Interkalatör Boya Metodu (SYBR Green)
2. Hidroliz Prob Metodu (TaqMan probu, Scorpion ve moleküler boncuklar)

3. Hibridizasyon Prob Metodu (LightCycler, FRET: Floresan Rezonans Enerji Transferi) (Wong ve Medrano, 2005).

- Genel olarak DNA çoğalmasını görüntüleyebilmek için iki ana floresan sistemi kullanılır:

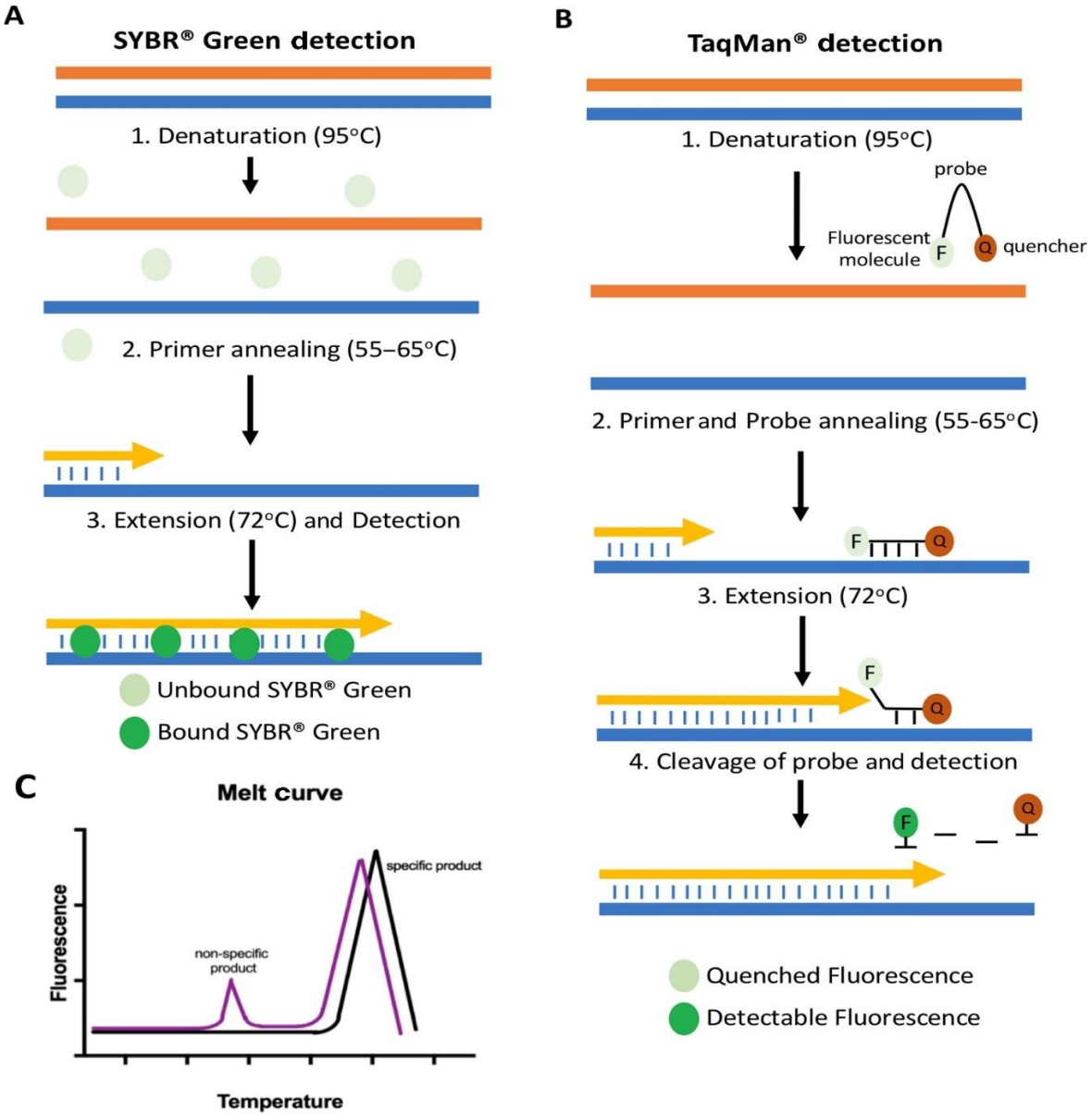
1. DNA'ya bağlanan ajanlar (SYBR green) ve
2. Taqman probları (VanGuilder vd., 2008).

qPCR sırasında floresan izleme, SYBR Green veya Eva Green gibi spesifik olmayan boyalar veya hidroliz probları, floresan rezonans enerji transferi (FRET) probları, moleküler işaretçiler ve Scorpion primerleri dahil olmak üzere floresan boyalarla etiketlenmiş diziye özgü primerler veya problar kullanılmaktadır (Rodríguez-Lázaro ve Hernández, 2013).

SYBR Green Floresan Boya: SYBR Green en fazla kullanılan boya çeşitidir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluğuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası aktivitesinin yalnızca %6'sını kaybeder. Amlifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir. Eş zamanlı PCR reaksiyonlarında ucuzluğu ve hassasiyeti sebebi ile çok tercih edilen bir boyadır. Cift sarmal DNA'ya bağlandığı zaman floresan ışıma yapmaya başlar. Ancak SYBR green herhangi bir çift sarmallı DNA'ya bağlanabilir dolayısıyla spesifik değildir ancak hasssatır. Bu nedenle, kullanılan primerlerin dimer oluşumunu en aza indirecek şekilde tasarlanmaları gerekmektedir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizlerinin ("melting curve", "dissociation") yapılması gerekmektedir (Cao vd., 2020) (Şekil 6A) .

Taqman probu: Taqman probları bir gene-özgü komplementer ve tek zincirli nükleik asit probudur. TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Prob'un 5' ucunda raportör florokrom (6- karboksifloresin=6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6- karboksitetrametil-rodamin=TAMRA) bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz

aktivitesini kullanarak probu 5’ uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. TaqMan metodunun avantajı farklı renkteki raportörleri içeren problarla multiplex deneylerde kullanılabilmesidir. Ancak, prob dizaynı ve sentezi bakımından SYBR’a kıyasla daha pahalıdır. Bununla birlikte, sonuçları SYBR temelli qPCR çalışmasına kıyasla daha güvenilirdir. TaqMan spesifiktir ama hassas değildir (Thellin vd., 2009) (Şekil 6B).



Şekil 6. İnterkalatör boya ve hidrolize dayalı prob tespitinin karşılaştırılması.

(A) SYBR Green tespiti: Şekilde cDNA denatürasyonu, primerler bağlanması ve uzama gerçekleşir. Uzama sırasında, SYBR Green çift sarmallı DNA'ya bağlanır.(dsDNA), floresan sinyali qPCR cihazı tarafından tespit edilir. B) TaqMan prob tespiti: TaqMan probları primerlerin akış aşağısında tek sarmallı cDNA'ya bağlanır. Uzama sırasında, polimeraz probu parçalayarak susturucu parçasına yakınlığın kaybı nedeniyle floresan sinyali saptanır. (C) Primer için erime eğrisi grafiği özgüllük: Bir erime eğrisi, yüksek

sıcaklıklarda dsDNA'nın ayrışmasını ölçer. Tek bir DNA türü (bir spesifik primer çifti) tek bir pik (siyah çizgi) ile sonuçlanır ve çoklu DNA türleri veya primer dimerleri iki veya daha fazla pik (mor) ve spesifik olmayan primerleri gösterir (Adams, 2020).

Özet olarak spesifik olmayan SYBR Green boyası çift sarmallı DNA'ya bağlanır (Kubista ve ark. 2006), oysa TaqMan deneylerinde etiketli prob spesifik olarak tamamlayıcı hedef dizisine bağlanır. SYBR Green'in amplikona spesifik bağlanması, amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin son PCR döngüsünden sonra elde edilen bir erime eğrisinin analizi ile doğrulanmalıdır. SYBR Green yöntemi TaqMan yönteminden daha basittir çünkü prob gerekli değildir. Bu durum rutin deneylerdeki maliyetleri azaltabilir (Rodríguez vd., 2011; Shakeel vd., 2018). RT-qPCR ile gen ekspresyonunun analiz edilmesindeki başarı, kullanılacak primerlerin ve probların uygunluğuna bağlıdır. Tekniğin özgüllüğü, primerlerin tamamlayıcı hedeflerine bağlanmasıyla yakından ilişkilidir. Bunun için uygun hedef nükleik asit dizilerinin seçimi, RT-qPCR için primerlerin ve probların tasarlanmasında önemli bir adımdır (Sobhy ve Colson, 2012). Primerlerin/probların RT-qPCR'de kullanılmadan önce karşılaması gereken diğer kriterler arasında amplikon uzunluğu (tercihen < 80 bp), erime sıcaklığı (optimum değerler: 55–60 °C), primer ve prob uzunluğu (tercihen 20 bp) ve GC (%30-80) içeriği yer alır. Ek olarak, self komplementer diziler primer-dimer ve firkete oluşumu en aza indirilmelidir bu durum istenen bir durum değildir (Rodríguez vd., 2015)

RT-qPCR, gen ekspresyonunu ölçmek için en verimli, güvenilir ve tekrarlanabilir tekniklerden biri olmasına rağmen, RNA örneklerinin kalitesi ve bütünlüğü, cDNA sentezinin verimliliği ve PCR verimliliği dahil olmak üzere birçok faktör, sinyal normalizasyonunu önemli ölçüde etkileyebilir (Lü vd., 2018). Referans gen transkript seviyelerinin ideal olarak bir dizi farklı koşulda stabil olması gerekse de yapılan çalışmalar, yaygın olarak kullanılan birçok referans genin ekspresyonu farklı koşullar altında önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Birçok referans genin ekspresyon seviyesinin duruma özgü olduğu ve tüm çalışmalar için kullanılabilecek evrensel bir genin bulunmadığı açıktır ve bu da RT-qPCR analizleri için özel referans gen seçiminin yapılması gerekliliğini kuvvetle gösterir. Son 10 yılda RT-qPCR'da böcek türlerinde genom/transkriptom ekspresyon çalışmalarında giderek daha fazla kullanılmaktadır. Ayrıca birçok böcek türünde çeşitli biyotik ve abiyotik deney koşullarında uygun referans genlerin tanımlanması ve doğrulanması için önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. RT-qPCR deneylerinde, SYBR Green ve TaqMan probları en

sık kullanılan iki metodoloji olmuştur ancak SYBR Green yöntemi çok daha sık kullanılmaktadır (Lü vd., 2018).

1.3.1. RT-qPCR ve normalizasyon

RT-qPCR verileri, başlangıç materyalinin kalitesi ve miktarı, RNA ekstraksiyonu, cDNA sentezi ve diğer laboratuvar prosedürlerini içeren birçok faktörden etkilenir. Pipetleme hataları ve ters transkripsiyon verimliliği bile Ct değerlerini önemli ölçüde etkileyebilir (Yeung vd., 2004; Bustin vd., 2005). Bu nedenle, hedef gen ekspresyonunu housekeeping genleri (HKG'ler) ile karşılaştırarak değişkenliği sınırladığı için normalizasyon gen ekspresyonu çalışmalarında bir ön koşuldur. Normalizasyon, HKG'lerin ifadesinin çeşitli biyotik ve abiyotik stres altında ve deney boyunca stabil olduğu varsayımına dayanır. Son araştırmalar, gen ekspresyonunun doğru ölçümleri için duruma özel bir referans genin tanımlanması gerektiğini göstermektedir (Ponton vd., 2011). Ekspresyon çalışmalarının çoğunda aktin evrensel bir HKG olarak kullanılır (Li vd., 2010). Normalizasyonda en uygun HKG'leri seçmek için farklı yazılım programları geliştirilmiştir (Pfaffl vd., 2004). Bu nedenle, belirli bir organizmanın aday genlerinden oluşan bir panelden normalizasyon için en uygun genleri seçmek gerekir. RT-qPCR, böceklerde gen ekspresyonunun saptanması için yaygın olarak kullanılmaktadır (Singh vd., 2018). Referans gen seçimi: MIQE kılavuzunda vazgeçilmez bir adımdır (Korkmaz Ağaoğlu ve Sidekli, 2020).

Normalizasyon; güvenilir bir qPCR analizinin temel bileşenidir ki bu işlem izolasyon, ters transkripsiyon ve amplifikasyonun verimliliğindeki değişiklikleri ortaya koymaktadır. Böylece farklı örnekler arasında mRNA konsantrasyonlarının karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Referans genler veya bir diğer adı ile Housekeeping genler (HKGs); hücrelerin fonksiyonel rollerinden bağımsız olarak, bir hücrenin varlığı için gerekli olan genlerdir (Eisenberg ve Levanon, 2003). Genel olarak tüm hücrelerde evrensel olarak ifade edilen ve ürünleri *Actin, Tubulin, EF1-α ve GAPDH* gibi hücre mimarisi veya metabolizması için gerekli olan (Bustin, 2002; Xu vd., 2011) temel genlerdir. Bu nedenle; bir organizmanın tüm hücrelerinde doku tipine, gelişim evresine, hücre döngüsüne veya dış sinyallerine bakılmaksızın normal koşullar altında da eksprese olmaktadırlar (Sikand vd., 2012). HKG'ler bu avantajlı özelliklerinden dolayı çeşitli deneysel ve sayısal veri araştırmalarında yaygın olarak kullanım alanı bulmuştur (Sikand

vd., 2012; Tilli vd., 2016). Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile birlikte housekeeping genlerin ekspresyon seviyelerinin; gen, hücre tipi ve deneysel koşullara bağlı olarak değişebildiği göstermektedir. Bununla birlikte bu genel referans genler, farklı durumlarda her zaman kararlı bir şekilde ifade edilmemektedir (Glare vd., 2002; Everaert vd., 2011; Migocka ve Papierniak, 2011). Bu nedenle, belirli durumlarda sabit seviyedeki ifadeye karşılık gelen referans genlerin seçilmesi gerekmektedir (Xiao vd., 2014). RNA örneklerinin kalitesi, ters transkripsiyon ve PCR verimliliğindeki varyasyonların neden olduğu örnekler arası değişimleri kontrol etmek için uygun bir normalizasyon yönteminin kullanılması gerekmektedir(Hamalainen vd., 2001; Chen vd., 2011). Örneğin; en sık kullanılan housekeeping genlerden biri olan *GAPDH*'ın doku tipine (Sullivan-Gunn vd., 2011), metabolik sürece (Gong vd., 2016) veya belirli çalışma koşullarına (Mahoney ve ark., 2004) bağlı olarak stabil olmadığı ortaya çıkmıştır. Bu nedenle; çalışma tasarımında ilgili hücrelerde normalizasyon için kullanılacak genin stabilitesinin belirlenmesi herhangi bir hedef genin ekspresyonunun doğru analizi için ön koşul oluşturmaktadır (Panina vd., 2018). Normalizasyon; hedeflenen genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin referans genlere oranlanması ile ortaya konan verileri içermektedir. Referans genlerin mRNA'ları stabil bir şekilde eksprese olmalı ve oranları, numunelerde bulunan toplam mRNA miktarlarıyla pozitif bir korelasyon göstermelidir. Referans gen seçimi MIQE kılavuzunda vazgeçilmez bir adım olmuştur. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) transkripsiyon düzeyinde haberci RNA'nın (mRNA) saptanması ve miktarının belirlenmesi için açık ara kullanılan en yaygın ve en güvenilir yöntem olmuştur (Zhou vd., 2008; Li vd., 2010; Wang vd., 2012). Yeni nesil dizileme teknolojilerinin ortaya çıkışı, entomolojik araştırmaları Genomik Çağa itmiştir. Sonuç olarak, RT-qPCR analizinden önce uygun referans genleri seçme konusunda artan bir farkındalık oluşmaktadır (Li vd., 2020).

1.3.2. Böceklerde RT-qPCR Verilerinin Normalizasyonu için Referans Genlerin Seçimi

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz, aktin ve ribozomal protein genleri gibi referans genlerin kullanımı, normalizasyon gen ekspresyonu için genel seçim yöntemidir (Shakeel vd., 2018). *Actin, RPL, Tubulin, GAPDH, RPS, 18S, EF1A, TATA, HSP* ve *SDHA* dahil olmak üzere en sık kullanılan ilk 10 referans gendir. Büyük bir yapısal proteini kodlayan *aktin*, birçok hücre tipinde çeşitli seviyelerde eksprese edilir. RT-qPCR analizi için ideal referans gen olarak kabul edilir. Örneğin, önceki çalışmalar *Aktin* ekspresyonunu dahil

olmak üzere birçok böceğin farklı gelişim aşamalarında diğer referans genler arasında en kararlı olduğunu göstermiştir (Lü vd., 2018). Ribozomların temel bir bileşeni olan ribozomal protein (RP), tüm yaşam formlarında en yüksek düzeyde korunmuş proteinler arasındadır. *RPL* ve *RPS* familyası genlerinin ekspresyon seviyesinin referans olarak kullanıldığı çalışmaların oranı %18,55'tir. Birlikte bu genler son 10 yılda böceklerde ekspresyon çalışmaları için en çok seçilen referans genlerdir. Hücre iskeleti yapı proteinlerini kodlayan *tubulin* (*α-tubulin, β-tubulin ve γ-tubulin*), en çok araştırılan üçüncü *referans* gen *olarak* kullanlır. *GAPDH,* dördüncü referans gen olarak yaygın kullanılan bir başka referans gendir. Bazen, *GAPDH* ekspresyonunun stabilitesi, aynı tür içinde farklı çalışmalarda değişkenlik göstermiştir. Ribozomal RNA'nın bir parçası olan *18S* ribozomal RNA, en yaygın olarak araştırılan altıncı referans gen olarak sıralanmıştır. İfade seviyesini referans olarak kullanan çoğu çalışmada biyotik ve abiyotik koşulların büyük çoğunluğunda stabil bir şekilde ifade edilmektedir. Toplamda, *EF1A, TATA, HSP* ve *SDHA* genlerinin ekspresyon seviyesi, deneylerin %11,42'sinde referans olarak kullanılmıştır. Bu dört gen, farklı böcek türlerinde farklı deneyler altında geçici olarak değişken ekspresyon sergilemiştir (Lü vd., 2018).

1.3.3. Normalizasyon için kullanılan programların karşılaştırılması

Gen ekspresyonunun stabilitesi, analiz edilen numunelerin ardışık stabilite seviyelerindeki en küçük varyasyon olarak tanımlanır. Bu nedenle, bu kararlı genlerin çoğunluğunu tanımlamak için programlar geliştirilmiştir (Galiveti vd., 2010). Bu programlar arasında GeNorm (Vandesompele vd., 2002), BestKeeper (Pfaffl vd., 2004), NormFinder (Andersen vd., 2004), ΔC_t (Silver vd., 2006) ve RefFinder (Shakeel vd., 2018).

GeNorm

GeNorm algoritması, her bir aday referans geninin diğer test edilmiş aday referans genleri ile ortalama ikili varyasyonu olan gen ekspresyon stabilitesini (M) belirlemektedir. Daha sonra, daha düşük M değerine sahip (daha kararlı) referans gen korunurken, daha yüksek M değerine (daha az kararlı) sahip olan gen kümeden çıkarılmaktadır. Kalan referans genlerin ekspresyon stabilitesi değerlerinin hesaplanması, en stabil iki referans gen kalana kadar tekrarlanmaktadır (Vandesompele vd., 2002).

NormFinder

NormFinder, aday referans genlerindeki değişiklikleri ve analiz edilen referans genlerin grup içi ve gruplar arası ekspresyon varyasyonunu tahmin etmek için model tabanlı bir yöntem kullanılmaktadır. GeNorm gibi, NormFinder da her referans gene bir kararlılık değeri verir. Düşük stabilite değerlerine sahip referans genler, en az grup içi varyasyona sahiptir ve bu nedenle NormFinder tarafından daha yüksek sıralarda yer almaktadır (Andersen vd., 2004)

BestKeeper

BestKeeper, referans genleri, Cq veya ham geçiş noktası (CP) değerlerine dayalı ikili korelasyonlar kullanarak değerlendirilmektedir BestKeeper, kararlı bir şekilde kopyalanan genlerin birbirleriyle yüksek oranda ilişkili olması gerektiğini varsaymaktadır. Ayrıca tüm aday genlerin tekrarlanan ikili korelasyon analizlerini gerçekleştirmektedir. Son olarak, birbirleriyle yüksek ve anlamlı korelasyonlar gösteren aday referans genlerin Ct değerlerinin geometrik ortalamaları bir indeks olarak hesaplanmaktadır. Daha düşük indeks puanlarına sahip aday referans genlerin oldukça stabil olduğu ve referans genler olarak kullanılmaya uygun olduğu varsayılmaktadır (Pfaffl vd., 2004).

Delta Ct

ΔC_t yöntemi uygun housekeepimg genlerini belirlemek için her numune içindeki gen çiftlerinin nispi ekspresyonunun bir karşılaştırmasını vermektedir. ΔC_t değerindeki bir varyasyon bir veya her iki genin eksprese edildiğini göstermektedir. Karşılaştırma sırasında üçüncü, dördüncü veya beşinci genin eklenmesi, test edilen numuneler arasında hangi çiftlerin daha az değişken veya kararlı olduğunu gösterir (Silver vd., 2006)

RefFinder

Kapsamlı bir web tabanlı algoritma olan RefFinder, mevcut dört ana algoritmadan oluşur ve karşılaştırmadan sonra analiz edilen referans genlere farklı sıralar atar. Tüm algoritmalardan sıralamalar elde edildikten sonra, her bir gene uygun bir ağırlık atanır ve kapsamlı bir nihai sıralama için gen ağırlıklarının geometrik ortalamaları hesaplanır. Daha düşük ortalama ağırlıklara sahip aday genler stabil genler olarak kabul edilir ve ideal referans genler olarak kullanılabilir (http://www.leonxie.com/referencegene.php).

1.4. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada lobster hamam böceği *N. cinerea'nın* RT-qPCR için uygun referans genlerinin araştırılması hedeflenmiştir. Literatüre baktığımızda ıstakoz hamam böceği *N. cinerea'nın* RT-qPCR için uygun referans genlerinin araştırılmadığı görülmüştür. Bu amaç kapsamında ilk olarak referansları araştırmak için altı normalizasyon geni (*ACTB, RPS18, EF1α, Tub, ArgK ve GADPH*) RT-qPCR analizi için aday olarak seçilmiştir. Bu adayların ifade profillerinin kararlılığı geNorm, NormFinder, BestKeeper, ΔCt ve RefFinder yöntemi ile analiz edilmiştir. RT-qPCR pahalı, zahmetli ve zaman alan bir yöntemdir. Bu durum göz önüne alındığında normalizasyon işlemi ile *N. Cinerea*'nın en uygun referans geni bulunduğunda malzeme ve zaman kullanımı açısından hem ekonomik hemde *N. cinerea* veya Blattodea ailesiyle çalışacak olan bilim insanlarına çalışmalarında bir basamak eksilterek büyük kolaylık sağlaması hedefelenmektedir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Örnek Bildirimi

Nauphoeta cinera (Olivier, 1789)- (Blattodea, Blaberidae) Antalya/Türkiye'deki (Antalya Çekirge, https://www.antalyacekirge.net/) ticari bir satıcıdan satın alındı (n=10). *Nauphoeta cinera* ergin bireyleri, RNA stabilizasyon reaktifinde muhafaza edildikten sonra laboratuvara aktarılmıştır. RNAlater® (Qiagen, Kat. No: 76106) ve deneysel analizler için -20 ° C'de saklanmıştır.

2.2. Total RNA İzolasyonu

Toplam RNA, hızlı ve yüksek kalitede ürün eldesi açısından üreticinin talimatlarına göre GeneAll® Hybrid-R ™ kiti (Kat. No: 315-150) (GeneAll Biotechnology, Seul, Kore) kullanılarak izole edilmiştir. RNA bütünlüğü, nanodrop kullanılarak 260/280 nm'lik absorbans oranının ölçümü ile doğrulanmıştır.

2.2.1. RNA izolasyonu protokolünün aşamaları sırasıyla aşağıdaki gibidir:

1. Ergin bireylerden 100 mg doku örneği 1 ml RiboExTM içinde homojenleştirici kullanarak homojenize edilmiştir.
2. Homojenat oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
3. Ardından 4 ° C'de 10 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüjlenmiştir ve süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır.
4. 1 ml RiboExTM için 0,2 ml kloroform eklenmiştir.
5. 15 saniye kuvvetlice çalkalanıp ve 2 dakika oda sıcaklığında bırakılmıştır.
6. Ardından 4 ° C'de 15 dakika 12.000 x g'de santrifüjlenip ve sulu faz yeni bir tüpe aktarılmıştır. Numuneye 1 hacim tampon RB1 eklenmiştir ve ters çevirerek iyice karıştırılmıştır. Bu aşamada santrifüj edilmemiştir.
7. 750 µl'ye kadar karışım bir mini döndürme kolonuna aktarılmıştır.
8. Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca ≥ 10.000 x g'de santrifüjlenmiştir.
9. Mini döndürme kolonuna 500 µl tampon SW1 eklenmiştir.
10. Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca ≥ 10.000 x g'de santrifüjlenmiştir.

11. Mini döndürme kolonuna 500 µl tampon RNW eklenmiştir.
12. Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca ≥ 10.000 x g'de santrifüjlenmiştir.

2.3. cDNA Sentezi ve Real- Time PCR

2.3.1. cDNA sentezi

1500 ng/µL RNA ile cDNA ürünü elde etmek için GeneAll® HyperScript ™ ilk sarmal sentez kiti (Kat. No: 605-005) (GeneAll Biotechnology, Seul, Kore) kullanılmıştır.

İzole edilmiş RNA'nın kalitesi ve miktarı belirlendikten sonra, cDNA sentez kullanılarak, böceklerden izole edilen 1500 ng/µl toplam RNA üreticinin önerdiği protokole göre aşağıdaki adımlar kullanılarak sentezlenmiştir.

İlk iplik sentez kitine göre 20 µl reaksiyon karışımı için 1 µl RNA kalıbı, 1 µl oligo, 2 µl dNTPs ve 10 µl nükleaz içermeyen su ependorf tüpüne aktarılmıştır ve 65º C'de 5 dakika inkübe edilmiştir ardından 1 dakikada buz üzerinde bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından 2 µl 10^X RTase buffer, 2 µl (0.1M) DDT, 1 µl RNase inhibitör ve son olarak 1 µl RTase eklenmişti (Tablo 4). 55º C'de bir saat inkübasyona bırakılmıştır ardından 85 º C'de 5 dk buzda bekletilmiştir (Tablo 5).

Tablo 4. cDNA sentez bileşenleri

Bileşenler		**Miktar**
RNA kalıbı		1 µl
Primer	Oligo dt	1 µl
dNTPs		2 µl
Nükleaz içermeyen su		10 µl
65 ° C'de 5 dakika inkübe edilmiştir, ardından en az 1 dakika buz üzerine koyulmuşur.		
İnkübasyonun ardından aşağıdaki bileşenler karışıma eklenmiştir.		
Bileşenler		**Miktar**
10^X RTase buffer		2 µl
0.1 M DTT		2 µl
HyperScriptTM Reverse Transcriptase		1 µl

RNase İnhibitör	1 µl

- Aşağıdaki gibi inkübe edilmiştir.

Tablo 5. cDNA inkübasyon süreleri

Primerler	**Reaksiyon Sıcaklığı**	**İnkübasyon Süresi**
Oligo dT veya gen-spesifik primer	42-60 ºC (önerilen 55 ºC)	30-60 dk
	25ºC	5 dk
Random hekzamer	42-60ºC (önerilen 55 ºC)	30-60 dk

85 °C'de 5 dakika inkübe edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Buz üzerinde soğutulmuştur.

2.3.2 cDNA dilüsyonlarının hazırlanması

Standart eğriler (Standard curve analysis), Tablo 8 de bilgileri verilen her primer çifti için 5 kat seyreltilmiş bir cDNA serisi (1, 1/5, 1/25, 1/125 ve 1/625) kullanılarak oluşturulmuştur.

5 kat seyreltilmiş bir cDNA serisi için yapılan seyreltmeler:

- D1 tüpü 1 oranı için seyreltme yapılmadan doğrudan 2 µl cDNA eklenmiştir.
- D2 tüpü için 1/5 oranında seyreltme için 5 µl cDNA üzerine 20 µl dH_2O eklenmiştir.
- D3 tüpü için 1/25 oranında seyreltme için D2 tüpünden 5 µl cDNA alınmıştır üzerine 20 µl dH_2O eklenmiştir.
- D4 tüpü için 1/125 oranında seyreltme için D3 tüpünden 5 µl cDNA alınmıştır üzerine 20 µl dH_2O eklenmiştir.
- D5 tüpü için 1/625 oranında seyreltme için D4 tüpünden 5 µl cDNA alınmıştır üzerine 20 µl dH_2O eklenmiştir.

2.3.3. RT-qPCR analizi

RT-qPCR reaksiyonları, iGreen 2X qPCR Master Mix kullanılarak 96 kuyucuklu reaksiyon plakalarında deneyleri gerçekleştirmek için bir StepOnePlusTM Gerçek

Zamanlı PCR sistemi (Applied Biosystems, ABD) kullanılmıştır (Biomatik, Kanada). Tüm reaksiyonlar, her cDNA kalıbı için son hacim 20 µL'lik iki kopya halinde getirilmiştir. 10 µL 2X iGreen Master Mix, 1 µL her bir spesifik primerden (10 µM), 2 µL seyreltilmiş ilk iplik cDNA kalıbı (1, 1/5, 1/25, 1/125 ve 1/625) ve 6 µL nükleaz içermeyen su kullanılmıştır (Tablo 6). RT-qPCR programı, 95° C'de 3 dakika süreyle başlangıç denatürasyonu, ardından 10 saniye boyunca 95°C'de 40 döngü denatürasyon, 58°C'de 30 saniye bağlanma ve 72° C'de 15 saniye uzatma basamaklarını içermektedir. Erime eğrisi analizi için bir ayrışma adımı döngüsü (1 dakika 58°C ve ardından 0,5°C'den 95°C'ye kadar 10 sn) eklenmiştir (Tablo 7). Her PCR reaksiyonunun sonunda, tek bir piki doğrulamak ve primer-dimer ve spesifik olmayan ürün oluşumu olasılığını ortadan kaldırmak için bir erime eğrisi oluşturulmuştur.

Tablo 6. RT-qPCR Bileşenleri

Bileşenler (20^X)	**Miktar (Tek örnek)**
2X iGreen Master Mix	10 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Nükleaz içermeyen su	6 µl
cDNA	2 µl

Tablo 7. RT-qPCR Koşulları

PCR koşulları			
İlk denatürasyon	95 ºC	3 dk	
Denatürasyon	95 ºC	10 sn	40 döngü
Primer bağlanması (Annealing)	58-60 ºC	30 sn	
Uzama-Sentez (Extension)	72 ºC	15 sn	
Erime Eğrisi			
58 ºC	1 dk		
95 ºC	10 sn		

2.4. Veri Analizi ve İstatistiksel Yöntem

Her aday referans genin kararlılığı geNorm (Vandesompele vd., 2002), NormFinder(Andersen vd., 2004), BestKeeper (Pfaffl vd., 2004) ve ΔCt yöntemi algoritmaları ile değerlendirilmiştir (Silver vd., 2006). Son olarak, test edilen her gen

kapsamlı web tabanlı analiz aracı olan RefFinder'a (https://www.heartcure.com.au/reffinder/?type=reference) göre karşılaştırılmıştır ve sıralanmıştır. Bu araç, her bir gene uygun bir ağırlık atar ve her programdan elde edilen sonuçlar açısından toplam nihai sıralama için ağırlıklarının geometrik ortalamasını hesaplamaktadır.

BestKeeper her housekeeping genin Cq değerlerinin varyans katsayısını (CV) ve standart sapmasını (SD) değerlendirir ve en düşük CV ve SD'ye sahip gen en sabit gen olarak tanımlanır (Pfaffl vd., 2004). GeNorm, ifade kararlılığını göstermek için her adayın (M değeri) ortalama ifade kararlılığı değerini (M2) ortaya çıkarır. En düşük M2 değerine sahip gen, en kararlı gen olarak belirlenir (Vandesompele vd., 2002). NormFinder'da, ifade kararlılığı (M1), aday genlerin RT-qPCR analizi ile elde edilen Cq değerleri ile ortaya çıkar ve sıralanır. M1 değeri en düşük olan gen en kararlı olandır (Andersen vd., 2004). RefFinder, her gene ilgili bir ağırlık atar ve genel bir nihai sıralama yapmak için bu ağırlıkların geometrik ortalamasını değerlendirir (https://www.heartcure.com.au/reffinder/?type=reference).

Çalışmalardan elde edilen veriler Graphad Prism v6 (Graphpad, ABD) istatistiksel programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 8. RT-qPCR analizinde değerlendirilen altı aday housekeeping genine ait bilgiler

Sembol	Gen adı	Tanım	Primer dizisi(5'→3')	GenBank erişim numarası	Amplikon Uzunluğu (bp)	R^2	Referans
ACTB	B-aktin	Hücre iskeleti	F:5'TCCATCATGAAGTGCGATGT-3' R:5'-CCACATCTGTTGGAATGTCG-3'	NM_001172372	228	0.872	(Sang vd., 2015)
RPS18	Ribozomal protein S18	Ribonükleoprotein; Ribozomal protein; RNA bağlanması; rRNA bağlayıcı	F:5'-TACACCTTTGATCGCTGTGAG-3' R:5'-GGCTCTGGTCATTCCAGATAAG-3'	XM_045615265	108	0,914	(Yang vd., 2015)
EF1α	Uzama faktörü 1-a	Translasyon uzama faktörü aktivitesi; GTPase	F:5'-ACCAGATTTGATGGCTTTGG-3' R:5'-CACCCAGAGGAGCTTCAGAC-3'	XM_003705302	194	0,957	(Rodrigues vd., 2014)
ArgK	Arjinine kinaz	Fosfotransferaz aktivitesi	F:5'-CTCGTGTGGTGCAACGAAGA-3' R:5'-GGTGGCTGAACGGGACTCT-3'	NT_037436	130	0,972	(García-Reina vd., 2018)
GADPH	Gliseraldehit-3-fosfat	Glikoliz ve Glukoneogenezde oksidoredüktaz	F:5'-GCCAAGGTGATCCATGACAA-3' R:5'-GTCTTCTGAGTGGCAGTTGTAG-3'	NC_007420	80	0,965	(Pan vd., 2015)
α- TUB	Alpha-tubulin	Mikrotübül yapılarında yer alır	F:5'- TCA AAT GCG ACC CAC GTC AT-3' R:5'- GGC AAT AGC CGC GTT GAC AT-3'	XM_970811	191	0,978	(Altincicek vd., 2008)

3. BULGULAR

3.1. Total RNA'nın kalitesi

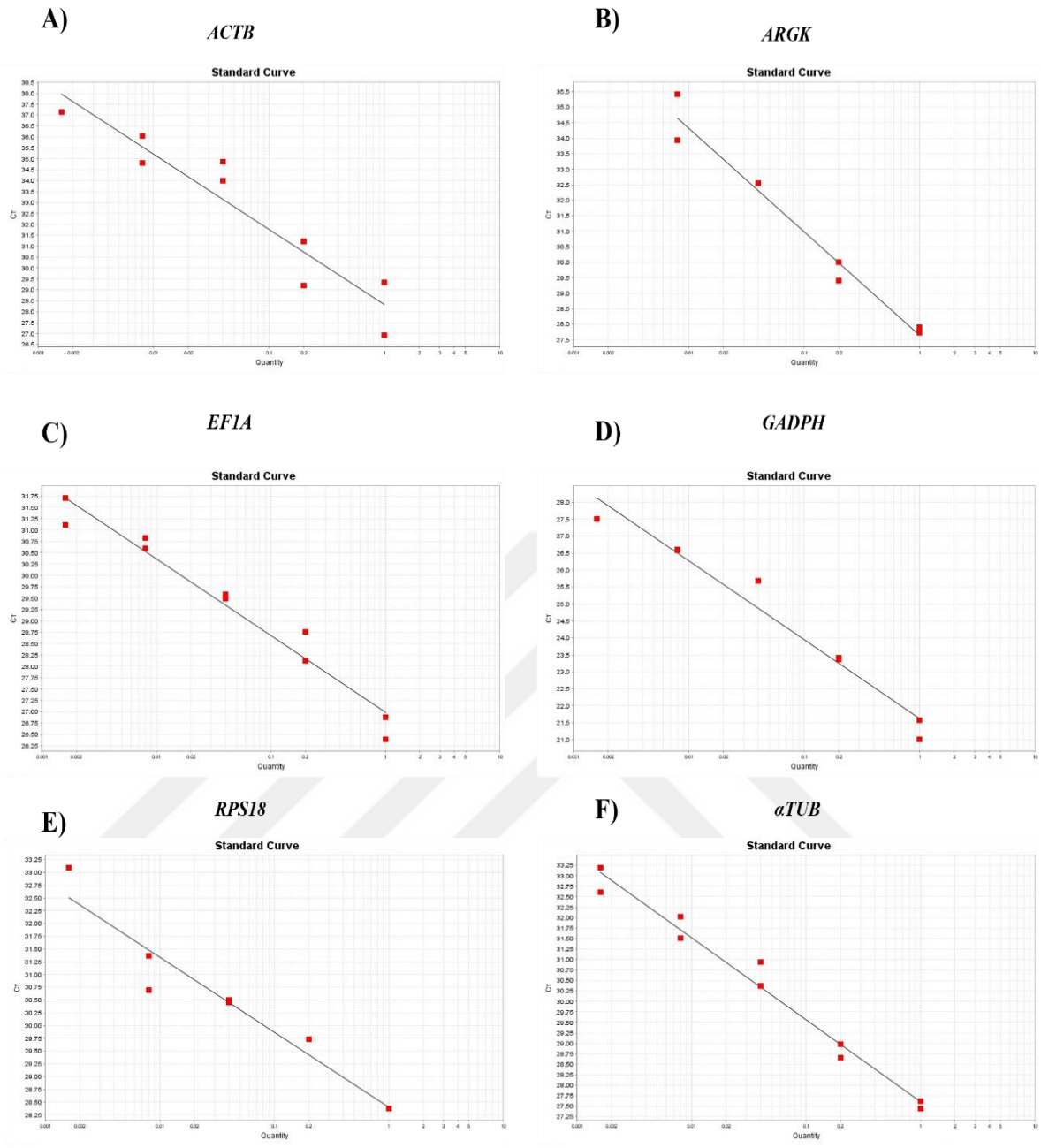
Bu çalışmada, *N. cinerea* erişkin bireylerinden alınan toplam RNA'nın A260/A280 oranı 1,90 ile 2,12 arasında değişirken, A260/A230 oranı 1,90'ın üzerinde bulunmuştur. Bu durum ürünün organik tuz ve protein kontaminasyonu içermediğini gösterir. Toplam RNA konsantrasyonu 1218ng/uL ile 2000ng/uL arasındaydı ve bu değer aralığı cDNA şablonunun ifadesi için uygun kabul edilmiştir.

3.2. Primer özgüllüğü ve etkinliği

Bu çalışmada kullanılan her primerin tüm PCR amplifikasyonu, erime eğrisi analizlerinde tek bir tepe noktasının varlığıyla doğrulanmıştır. Altı potansiyel referans genin ilk taraması, tüm genlerin *N. cinerea* erişkinlerinde eksprese edildiğini göstermiştir. Altı aday genin her biri için primer verimliliği formül (E) kullanılarak bir kalibratör cDNA örneğinin 5 kat cDNA seyreltmelerinde floresan ölçülürken elde edilen eğim kullanılarak hesaplanmıştır.

Formül: E=101/- slope-1

Çalışmadaki tüm primerlerin 0.87 ile 0.98 arasında değişen bir korelasyon katsayısına (R^2) sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 8) ve standart eğri grafikeri Şekil 7'de verilmiştir. Ayrıca %98.6 ile %110.05 arasında bir primer verimlilik değeri elde edilmiştir ve her bir primerin özgüllüğü BLAST programı ile doğrulanmıştır. Negatif kontrol örneklerinde (−RT) floresan sinyal amplifikasyonu tespit edilmedi; bu durum RNA ekstraksiyon yönteminin ve DNase prosedürünün RNA örneklerinden genomik DNA'yı etkili bir şekilde uzaklaştırdığını göstermiştir.

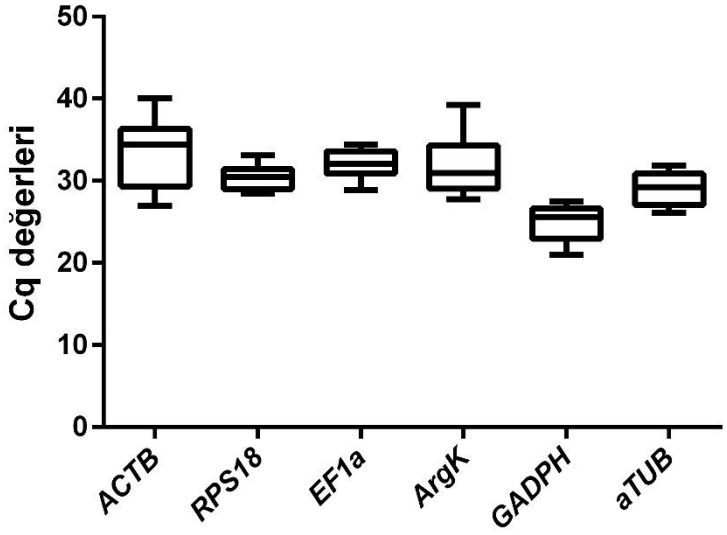


Şekil 7. Altı aday referans genin standart eğri grafiği (R^2)

3.3. Aday referans genlerin ekspresyon profili

Tüm primerler ve RT-qPCR ürünlerinin ekspresyon profilleri Şekil 8'de gösterilmektedir. *N.cinerea* erişkin bireylerinin altı aday housekeeping geni ile elde edilen döngü eşiği (Cq) grafiği çizilmiştir (Şekil 8). *N. cinerea'da* altı genin Cq değerleri 21.29 ile 36,67 arasında bulunmuştur. *GADPH, N. cinerea*'da en düşük Cq değerlerini göstermiştir (24,72±±2,238, ortalama Cq ±std. dev.) *α-TUB, RPS18, ArgK, EF1α* ve *ACTB*'nin

amplifikasyonu sırasıyla 28,96± 2,056, 30,36 ±1,418, 31,78 ±3,633, 31,96 ± 1,418 ve 33,36 ± 4,081 ortalama Cq göstermiştir.



Şekil 8. Aday housekeeping genlerinin amplifikasyon profilleri. *Nauphoeta cinera*'daki housekeeping genleri için qPCR eşik döngüsü değerlerinin (Cq) kutu grafiği

3.4. Seçilen referans genlerin ekspresyon stabilitesi

RT-qPCR normalizasyonu için *N. cinerea*'da optimal referans genleri bulmak amacıyla altı aday genin stabilitesini değerlendirmek için dört istatistiksel analiz programı (geNorm, NormFinder, BestKeeper ve Δ-Ct yöntemi) kullanılmıştır. Ek olarak altı referans gen web tabanlı analiz aracı RefFinder tarafından karşılaştırılmış ve sıralanmıştır (Tablo 9 ve Şekil 9)

Tablo 9. Nauphoeta cinera erişkin bireylerinde aday referans genlerin ifade kararlılığı

Referans gen	Delta Ct		Bestkeeper			Genorm		Normfinder		RefFinder	
	StdDev	Rank	SD	R	Rank	M	Rank	SV	Rank	Stability	Rank
ACTB	2.59	6	3.40	0.973*	6	1.957	6	2.262	6	6.00	6
RPS18	1.73	4	1.12	0.957*	1	0.992	4	1.046	2	2.38	2
EF1α	1.72	3	1.50	0.902*	2	0.841	3	1.123	3	2.71	4
ArgK	2.52	5	2.92	0.903*	5	1.639	5	2.146	5	5.00	5
GADPH	1.70	2	1.76	0.902*	4	0.699	1	1.133	4	2.38	1
α-TUB	1.48	1	1.68	0.977*	3	0.699	1	0.401	1	1.32	3

SD, standart sapma; **SV**, stabilite değeri; **r**, Pearson korelasyon katsayısı; *p≤0,001

geNorm

geNorm algoritması, aday genlerin birlikte düzenlenmediğini varsayar. Test edilen her referans gen için, gen ekspresyon stabilite değeri M o gen için diğer tüm referans genlerle ortalama ikili varyasyon olarak normal hesaplanır. M değeri ne kadar düşükse, referans

genin ifadesi o kadar kararlıdır. Düşük M ile karakterize edilen genler stabil ekspresyona sahipken, en yüksek M değerine sahip gen elimine edilir ve bu süreç en stabil iki gen tanımlanana kadar devam eder. Bu son gen çifti, optimal referans gen çifti olarak önerilir. geNorm'da doğru normalizasyonu sağlamak için en az iki referans gen kullanılması önerilir. *N. cinerea* erişkinlerinde, geNorm aday referans gen setini şu şekilde sıralamıştır: *α-TUB, GADPH >EF1a >RPS18 >ArgK > ACTB. N. Cinerea* erişkin bireylerinde *α-TUB* ve *GADPH*, 0.699 M ekspresyon stabilitesi değerine sahip en stabil genler olarak bulunmuştur. En az kararlı ifadeye sahip gen, M değeri 1.957 olan *ACTB* olarak bulunmuştur. (Tablo 9 ve Şekil 9A).

NormFinder

Normfinder analizi, tüm örnek kümesinde ekspresyonda en az varyasyona sahip genleri tanımlayan bir ANOVA (varyans analizi) modeline dayanmaktadır. Örneklem alt grupları arasındaki sistematik farklılıkları dikkate alarak analiz etmektedir. *N. cinerea* erişkin bireylerinde, Normfinder, altı referans genini şu şekilde gibi sıralamıştır: *α-TUB >RPS18> EF1α> GADPH> ACTB> ArgK > ACTB* stabilite değeri SV sırasıyla 0.401, 1.046, 1.123, 1.133, 2.146, 2.262 şeklindedir. *α-TUB* 0.401 stabilite değeriyle en kararlı ve *ACTB* 2.262 kararlılık değeriyle en az kararlı olarak bulunmuştur (Tablo 9 ve Şekil 9B).

BestKeeper

BestKeeper, aday referans genlerin Cq değerlerinin geometrik ortalaması olan Bestkeeper İndeksi ile korelasyon katsayısına dayalı olarak en stabil (kararlı) şekilde ifade edilen genleri belirlemektedir. Aday genlerin stabilitesi, tüm aday referans genlerin Cq değerlerine dayalı olarak standart sapmayı (SD) hesaplayabilen BestKeeper ile analiz edilmiştir. En düşük standart sapmayı (SD) sergileyen referans genler, en stabil genler olarak alınmıştır. Ayrıca, eşik değerini (SD < 1) aşan değerler tüm örneklerde kararsız olarak kabul edilmektedir.

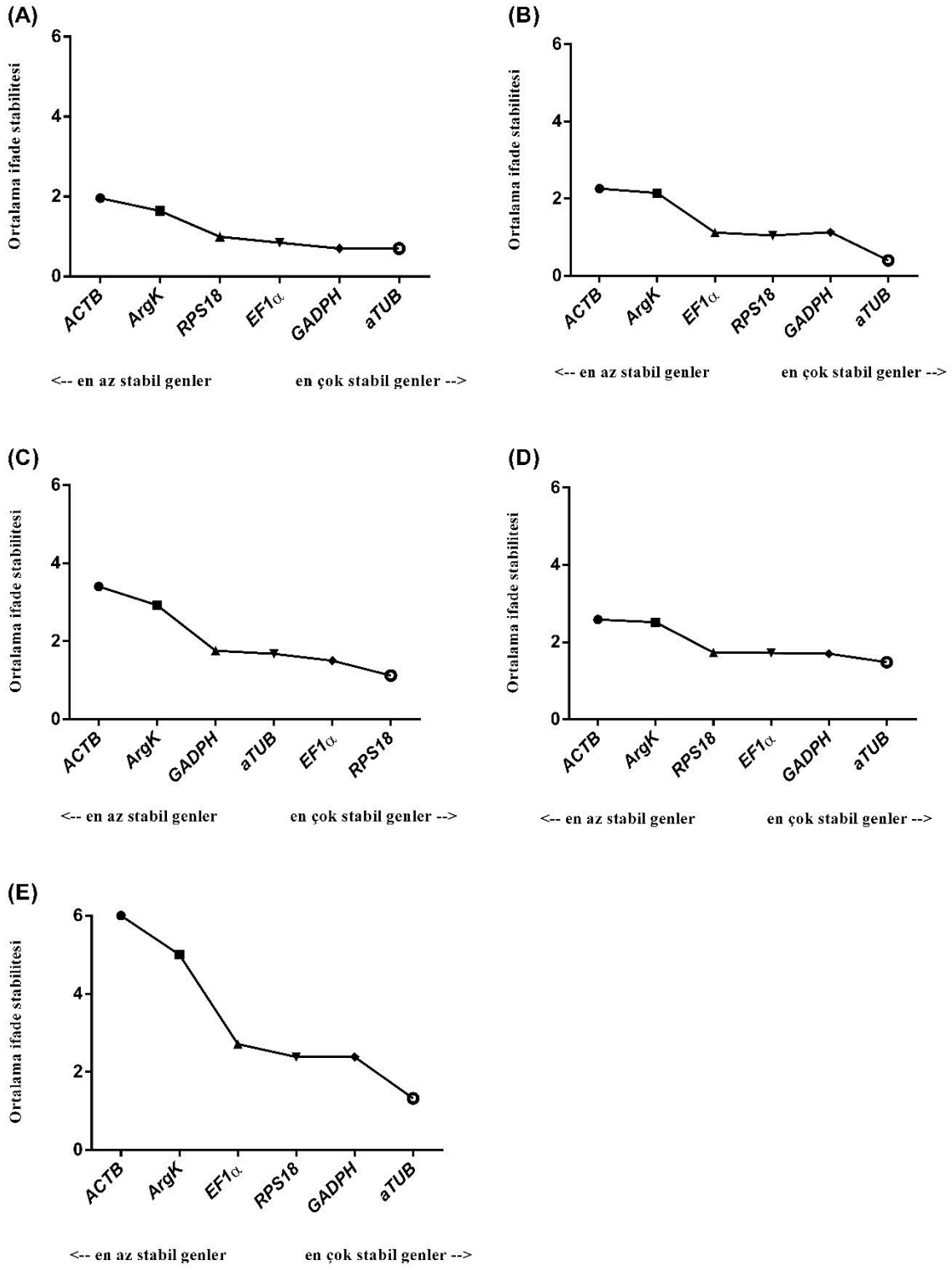
Bu analize göre tüm housekeeping genleri [*RPS18* (SD: 1.12), *EF1α* (SD:1.50), *α-TUB* (SD: 1.68), *GADPH*, (SD: 1.76), *ArgK* (SD: 2.92), *ACTB* (SD: 3.40*)] N. cinerea* erişkin bireylerinde eşiği aşmıştır (Tablo 9 ve Şekil 9C).

ΔC$_T$ method

Göreceli ikili karşılaştırma yöntemine dayalı olarak, ΔCt yöntemi ham Ct değerlerini kullanarak her bir gen kümesinin ortalama SD'sini hesaplar ve bu SD değeri genin ekspresyon stabilitesi ile ters orantılıdır. 1'in altındaki standart sapma, uygun stabiliteyi göstermektedir. Her gen setinin ortalama SD'si 1'in üzerinde olduğu için *N. cinerea* erişkinlerinde aday referans genlerin hiçbiri ΔCT yöntemine göre yeterince stabil bulunmamıştır. Referans genlerin ΔCt yöntemine göre genel sıralaması*: α-TUB, GADPH, EF1a, RPS18, ArgK, ACTB* şekindedir. (Tablo 9 ve Şekil 9D).

RefFinder

RefFinder, aday referans genlerini stabilitesine göre sıralamak için yukarıda bahsedilen tüm yazılım araçlarını (geNorm, NormFinder, BestKeeper ve Δ-Ct yöntemi) birleştiren kapsamlı bir algoritmadır. *N. cinerea*'daki referans genlerin RefFinder'ına dayalı genel sıralaması: GADPH, RPS18, a-TUB, EF1a, ArgK ve ACTB şeklindedir (Tablo 9 ve Şekil 9E).



Şekil 9. Genorm (A), Normfinder (B), Bestkeeper (C), ΔCt metod (D), RefFinder (E) tarafından değerlendirilen altı housekeeping geninin ekspresyon stabilitesi ve sıralaması.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Temel hücresel işlevleri sürdürmek için yapısal olarak eksprese edilen housekeeping genler, standart bir referans için geleneksel yöntemdir (Vandesompele vd., 2002). Yine de, çeşitli deneysel koşullar altında tüm hücre ve doku tipleri için stabil olarak eksprese edilen ve uygulanabilir "evrensel" referans genler yoktur (Yang ve Rannala, 2010; Fu vd., 2013; Li vd., 2013; Zhu vd., 2014; Pan vd., 2015; Yang vd., 2015). Özellikle böceklerde çeşitli biyotik ve abiyotik koşullarda referans genlerin seçimine yönelik çalışmalarda, farklı referans genlerin stabilitesi her koşulda farklılık gösterebilmektedir. Böcek çalışmalarında aktin, *ACTB, RPL, Tubulin, GAPDH, RPS, 18S, EF1A, TATA, HSP* ve *SDHA* dahil olmak üzere en sık kullanılan referans genler olarak tanımlanmıştır (Lü vd., 2018). Büyük bir yapısal proteini kodlayan *ACTB,* birçok hücre tipinde çeşitli seviyelerde eksprese edilir ve RT-qPCR analizi için ideal referans gen olarak kabul edilen ve en sık araştırılan referans gendir. Böceklerde referans genlerin stabilitesini değerlendiren birçok çalışma, ACTB ekspresyonunun *Apis mellifera, Chortoicetes terminifera, Schistocerca gregaria, Plutella xylostella, Drosophila melanogaster, Liriomyza trifolii, Chilo supresalis* ve *Diuraphis noxia* dahil olmak üzere birçok böceğin farklı gelişim aşamalarında diğer referans genler arasında en kararlı olduğunu göstermiştir (Scharlaken vd., 2008; Van Hiel vd., 2009; Chapuis vd., 2011; Ponton vd., 2011; Teng vd., 2012; Sinha ve Smith, 2014; Chang vd., 2017). Öte yandan, bazı böcek türlerinde ACTB ifadesinin daha az stabil olduğu bildirilmiştir (Pan vd., 2015; Yang vd., 2015; Yang vd., 2016). Ribozomların temel bir bileşeni olan ribozomal protein (RP), tüm yaşam formlarında en yüksek korunmuş proteinler arasındadır ve *RPL* ve *RPS* familyası genleri, özellikle böceklerde ekspresyon çalışmaları için en çok tercih edilen referans genler olmuştur (Lü vd., 2018) . *RPS24* ve *RPS18, C. maculate*'in farklı gelişim evreleri ve cinsiyet tedavileri boyunca en kararlı iki referans gen olarak tanımlanmıştır (Yang vd., 2016); *RPS13* ve *RPS23, P. xylostella*'nın farklı gelişim aşamalarında stabil referans genler olarak rapor edilmiştir (Fu vd., 2013); *Aphis craccivora*'nın farklı gelişim aşamalarında ve farklı sıcaklık koşullarında en kararlı üç referans gen *RPL11, RPS8* ve *RPL14* olarak tanımlanmıştır (Yang vd., 2015). En çok çalışılan diğer bir referans gen olan hücre iskeleti yapı proteinlerini kodlayan tubulin (*α-tubulin, β-tubulin ve γ-tubulin*), birçok çalışmada aynı tür için farklı deneyler altında değişken stabiliteye sahip olduğu bulunmuştur. Örneğin, α-tubulin, farklı dokularda ve cinsiyetlerde stabil ekspresyon sergilemiştir. Örneğin, *α-tubulin, C. maculata*'nın farklı doku ve cinsiyetlerinde stabil

ekspresyon sergilerken, ekspresyonunun farklı gelişim aşamaları boyunca ve dsRNA tedavilerini takiben kararsız olduğu bulundu (Pan vd., 2015). Benzer şekilde, aynı tür içinde farklı tedaviler altında *GAPDH* ekspresyonunun stabilitesinin de değişken olduğu bulunmuştur. Örneğin, *GAPDH* ekspresyonu, *H. convergens*'de doku tipi, cinsiyet, fotoperiyot veya dsRNA tedavisinden etkilenmedi, ancak farklı gelişim aşamalarında ve farklı sıcaklıklarda değişiklik gösterdiği bulunmuştur (Pan vd., 2015). Ayrıca, *EF1A* geni, farklı gelişim aşamalarında ve farklı sıcaklıklarda *A. craccivora*'da en az kararlı referans gen olarak seçilmiştir (Yang vd., 2015). Öte yandan, *H. convergens*'deki *EF1A* ekspresyon seviyesi, üç biyolojik faktörden (gelişim evresi, doku tipi ve cinsiyet) ve üç abiyotik koşuldan (sıcaklık, fotoperiyot ve diyet RNAi) etkilenmemiş ve en kararlı gen *EF1A* seçilmiştir(Pan vd., 2015). Özetle, yaygın olarak kullanılan bazı housekeeping genlerinin ifadesi, farklı deney düzenekleri altında değişebilir. Böcek metamorfozu sırasında önemli roller oynayan ve farklı dokuları etkileyen genler, böceği öldüren veya büyümesini geciktiren manipülasyonlar için hedef genler olarak hizmet etmektedir. Bu nedenle, gen ekspresyon profilleri farklı gelişim evrelerinde ve farklı dokularda yaygın olarak değerlendirilmeli ve gen stabilitesi belirlenmelidir (Ponton vd., 2011; Pan vd., 2015; Rodríguez vd., 2015; Yang vd., 2015; An vd., 2016; Chang vd., 2017; García-Reina vd., 2018). Bildiğimiz kadarıyla, hamamböceklerindeki referans genler için sadece bir validasyon çalışması rapor edilmiştir (Marchal vd., 2013). Hamamböceği *Diploptera punctata*'nın ilk gonadotropik döngüsü sırasında bir dizi sekiz housekeeping genini (*β-aktin, EF1a, GAPDH, Arm, RpL32, SDHa, AnnIX ve α-Tub*) tanımlamayı ve doğrulamayı amaçlamıştır. İfadesinin kararlılığını değerlendirmek için iki farklı algoritma (geNorm ve Normfinder) kullanılmıştır. *a-Tub, EF1a* ve *RpL32*'nin birlikte kullanımının, *D. punktata* yumurtalığındaki gen ekspresyon seviyelerinin doğru bir şekilde normalize edildiği sonucuna varılmıştır. *D. punktata*'nın corpora allata veya yumurtalığındaki ilk gonadotropik döngüyü incelerken, *Actin* ve *AnnIX*'in transkript seviyelerini normalizasyonu için kullanılmaması gerektiği bulunmuştur.

Bu çalışmada, hamamböceği türü *N. cinerea* erişkinlerinde referans genlerin ekspresyonunun stabilitesini değerlendirmek (GADPH, RPS18, α-TUB, EF1α, ArgK ve ACTB) için beş farklı algoritma (ΔCt yöntemi, Bestkeeper, geNorm, Normfinder ve RefFinder) seçilerek validasyon çalışması yapılmıştır. Mevcut çalışmamızda kullanılan altı referans gen, diğer böceklerde bildirilen validasyon çalışmalarındaki kullanımlarına ve stabilitelerine göre seçilmiştir. Sonuçlarımız, *α-Tub* kullanımının *N. cinerea*

erişkinlerinde gen ekspresyon seviyelerinin doğru normalizasyonunu sağladığını göstermektedir. Ayrıca *GADPH* geni ikinci en stabil referans gen olarak seçildiğinden transkript analizi için kullanılabileceğini önerebiliriz. Marchal ve ark. (2013) önerdiği gibi, çalışmamız da *N. cinerea* erişkinlerini incelerken transkript düzeylerinin normalizasyonu için *aktin* kullanılmaması gerektiğini gösterilmiştir. Ek olarak, literatürde hamamböceklerinde referans genlerin validasyon çalışmaları çok az (sadece bir) bulunmaktadır. Bu çalışmanın devamında diğer böcek türlerinde olduğu gibi özellikle hamamböceklerinin referans genlerin stabilitesi, gelişim evresi, doku, sıcaklık, pestisit, diyet, popülasyon, virüs, cinsiyet, fotoperiyot ve açlık gibi birçok deneysel faktör koşullarında araştırılması planlanmaktadır. Mevcut çalışmanın ve literatürdeki mevcut çalışmaların sonucu, hamamböceklerinde q-RTPCR çalışmalarında biyotik ve abiyotik koşullar altında referans genlerin doğrulanması ihtiyacını vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

Adams, G. (2020). "A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR." *The Biochemist 42*(3): 48-53.

Adedara, I. A., Rosemberg, D. B., Souza, D. O., Farombi, E. O., Aschner, M. ve Rocha, J. B. T. (2016). "Neuroprotection of luteolin against methylmercury-induced toxicity in lobster cockroach Nauphoeta cinerea." *Environmental Toxicology and Pharmacology 42*: 243-251.

Adedara, I. A., Rosemberg, D. B., Souza, D. O., Kamdem, J. P., Farombi, E. O., Aschner, M. ve Rocha, J. B. T. (2015). "Biochemical and behavioral deficits in the lobster cockroach Nauphoeta cinerea model of methylmercury exposure." *Toxicology Research 4*(2): 442-451.

Afolabi, B. A., Adedara, I. A., Souza, D. O. ve Rocha, J. B. T. (2018). "Dietary co-exposure to methylmercury and monosodium glutamate disrupts cellular and behavioral responses in the lobster cockroach, Nauphoeta cinerea model." *Environmental Toxicology and Pharmacology 64*: 70-77.

Alias, U. K. H. ve Retnani, E. B. (2018). "Diversity and abundance of cockroaches (Insecta: Dictyoptera) in ships at Bau-Bau port." *J Entomol Zool Stud 6*: 29-34.

Altincicek, B., Knorr, E. ve Vilcinskas, A. (2008). "Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect Tribolium castaneum." *Developmental & Comparative Immunology 32*(5): 585-595.

An, X. K., Hou, M. L. ve Liu, Y. D. (2016). "Reference Gene Selection and Evaluation for Gene Expression Studies Using qRT-PCR in the White-Backed Planthopper, Sogatella furcifera (Hemiptera: Delphacidae)." *J Econ Entomol 109*(2): 879-886.

Andersen, C. L., Jensen, J. L. ve Qrntoft, T. F. (2004). "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets." *Cancer Res 64*(15): 5245-5250.

Atiokeng Tatang, R., Tsila, H. ve Wabo Poné, J. (2017). "Medically important parasites carried by cockroaches in Melong Subdivision, Littoral, Cameroon." *J Parasitol Res 2017*: 7967325.

Aydın, G. (2016). "Böceklerin Sınıflandırılması (Takım Düzeyinde)."

Balogun, W. G., Cobham, A. E., Amin, A. ve Seeni, A. (2018). "Using invertebrate model organisms for neuroscience research and training: an opportunity for Africa." *Metabolic Brain Disease 33*(5): 1431-1441.

Beccaloni, G. (2014). Cockroach species file online. Version 5.0/5.0 world wide web electronic publication, Illinois Natural History Survey Champaign (IL).

Bell, W. J. R., L.M; Nalepa, C.A. (2007). "Cockroaches: ecology, behavior, and natural history." *The Johns Hopkins University*: 230.

Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C. C., Paoletti, M. G. ve Ricci, A. (2013). "Edible insects in a food safety and nutritional perspective: a critical review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 12*(3): 296-313.

Bohn, H., Picker, M., Klass, K.-D. ve Colville, J. (2010). "A jumping cockroach from South Africa, Saltoblattella montistabularis, gen. nov., spec. nov.(Blattodea: Blattellidae)." *Arthropod Systematics & Phylogeny 68*(1): 53-69.

Bouchebti, S., Durier, V., Pasquaretta, C., Rivault, C. ve Lihoreau, M. (2016). "Subsocial cockroaches Nauphoeta cinerea mate indiscriminately with kin despite high costs of inbreeding." *PLoS One 11*(9): e0162548.

Brenner, R. J. (2002). Cockroaches (Blattaria). *Medical and Veterinary Entomology*. G. Mullen and L. Durden. San Diego, Academic Press**:** 29-44.

Bustin, S. (2002). "INVITED REVIEW Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *Journal of molecular endocrinology 29*: 23-39.

Bustin, S., Benes, V., Nolan, T. ve Pfaffl, M. (2005). "Quantitative real-time RT-PCR–a perspective." *Journal of Molecular Endocrinology 34*(3): 597-601.

Cao, Y., Yu, M., Dong, G., Chen, B. ve Zhang, B. (2020). "Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation." *Molecules 25*(3).

Chang, Y. W., Chen, J. Y., Lu, M. X., Gao, Y., Tian, Z. H., Gong, W. R., Zhu, W. ve Du, Y. Z. (2017). "Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis under different experimental conditions in the leafminer Liriomyza trifolii (Diptera: Agromyzidae)." *PLoS One 12*(7): e0181862.

Chapuis, M. P., Tohidi-Esfahani, D., Dodgson, T., Blondin, L., Ponton, F., Cullen, D., Simpson, S. J. ve Sword, G. A. (2011). "Assessment and validation of a suite of reverse transcription-quantitative PCR reference genes for analyses of density-dependent behavioural plasticity in the Australian plague locust." *BMC Mol Biol 12*: 7.

Chen, L., Zhong, H. Y., Kuang, J. F., Li, J. G., Lu, W. J. ve Chen, J. Y. (2011). "Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions." *Planta 234*(2): 377-390.

Clopton, R. E. ve Hays, J. J. (2006). "Revision of the Genus Protomagalhaensia and Description of Protomagalhaensia wolfi n. comb. (Apicomplexa: Eugregarinida: Hirmocystidae) and Leidyana haasi n. comb. (Apicomplexa: Eugregarinida: Leidyanidae) Parasitizing the Lobster Cockroach, Nauphoeta cinerea (Dictyoptera: Blaberidae)." *Comparative Parasitology 73*(2): 137-156.

Clopton, R. E. ve Smith, A. (2002). "Efficacy Of Oral Sulfadımethoxıne Agaınst Two Gregarıne Parasıtes, Protomagalhaensıa Granulosae And Gregarına Cubensıs (Apıcomplexa: Eugregarınıda), Infectıng The Death's Head Cockroach, Blaberus Dıscoıdalıs." *Journal of Parasitology 88*(4): 786-789.

Cochran, D. G. (1999). "Cocroaches Their Biology Dıstrubition And Control."

de Oliveira, L. M., da Silva Lucas, A. J., Cadaval, C. L. ve Mellado, M. S. (2017). "Bread enriched with flour from cinereous cockroach (Nauphoeta cinerea)." *Innovative Food Science & Emerging Technologies 44*: 30-35.

Djernaes, M., Klass, K. D., Picker, M. D. ve Damgaard, J. (2012). "Phylogeny of cockroaches (Insecta, Dictyoptera, Blattodea), with placement of aberrant taxa and exploration of out-group sampling." *Systematic Entomology 37*(1): 65-83.

Djernaes, M., Varadinoya, Z. K., Kotyk, M., Eulitz, U. ve Klass, K. U. D. (2020). "Phylogeny and life history evolution of Blaberoidea (Blattodea)." *Arthropod Systematics & Phylogeny 78*(1): 29-67.

Dumans, A. T. N., Grimaldi, D. B., Furtado, C., Machado, E. A. ve Prosdocimi, F. (2017). "The complete mitochondrial genome of the subsocial cockroach Nauphoeta cinerea and phylogenomic analyses of Blattodea mitogenomes suggest reclassification of superfamilies." *Mitochondrial DNA B Resour 2*(1): 76-78.

Edvardsson, M., Hunt, J., Moore, A. J. ve Moore, P. J. (2009). "Quantitative genetic variation in the control of ovarian apoptosis under different environments." *Heredity (Edinb) 103*(3): 217-222.

Ekino, S., Susa, M., Ninomiya, T., Imamura, K. ve Kitamura, T. (2007). "Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning." *J Neurol Sci 262*(1-2): 131-144.

Everaert, B. R., Boulet, G. A., Timmermans, J. P. ve Vrints, C. J. (2011). "Importance of suitable reference gene selection for quantitative real-time PCR: special reference to mouse myocardial infarction studies." *PLoS One 6*(8): e23793.

Fakoorziba, M. R., Eghbal, F., Hassanzadeh, J. ve Moemenbellah-Fard, M. D. (2010). "Cockroaches (Periplaneta americana and Blattella germanica) as potential vectors of the pathogenic bacteria found in nosocomial infections." *Ann Trop Med Parasitol 104*(6): 521-528.

Fu, W., Xie, W., Zhang, Z., Wang, S., Wu, Q., Liu, Y., Zhou, X., Zhou, X. ve Zhang, Y. (2013). "Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in Plutella xylostella (Lepidoptera: Plutellidae)." *International journal of biological sciences 9*(8): 792-802.

Galiveti, C. R., Rozhdestvensky, T. S., Brosius, J., Lehrach, H. ve Konthur, Z. (2010). "Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR." *RNA 16*(2): 450-461.

García-Reina, A., Rodríguez-García, M. J. ve Galián, J. (2018). "Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in tiger beetles across sexes, body parts, sexual maturity and immune challenge." *Scientific Reports 8*(1): 10743.

Glare, E. M., Divjak, M., Bailey, M. ve Walters, E. H. (2002). "β-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels." *Thorax 57*(9): 765-770.

Gong, S., Schmotzer, C. L. ve Zhou, L. (2016). "Evaluation of Quantitative Real-Time PCR as a Hepatitis C Virus Supplementary Test After RIBA Discontinuation." *Journal of Clinical Laboratory Analysis 30*(5): 418-423.

Grimaldi, D. E., M. S. (2005). "Evolution of ınsects." *Cambridge University Press*.

Hamalainen, H. K., Tubman, J. C., Vikman, S., Kyrola, T., Ylikoski, E., Warrington, J. A. ve Lahesmaa, R. (2001). "Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR." *Analytical biochemistry 299*(1): 63-70.

Hartman, H. B. ve Roth, L. M. (1967). "Stridulation by the cockroach Nauphoeta cinerea during courtship behaviour." *J Insect Physiol 13*(4): 579-586.

Hunsinger, E., Root-Gutteridge, H., Cusano, D. A. ve Parks, S. E. (2017). "A description of defensive hiss types in the flat horned hissing cockroach (Aeluropoda insignis)." *Bioacoustics 27*(3): 261-271.

Inward, D., Beccaloni, G. ve Eggleton, P. (2007). "Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches." *Biology letters 3*(3): 331-335.

Jarczak, J., Kaba, J. ve Bagnicka, E. (2014). "The validation of housekeeping genes as a reference in quantitative Real Time PCR analysis: application in the milk somatic cells and frozen whole blood of goats infected with caprine arthritis encephalitis virus." *Gene 549*(2): 280-285.

Kambhampati, S., Alleman, A. ve Park, Y. (2013). "Complete genome sequence of the endosymbiont Blattabacterium from the cockroach Nauphoeta cinerea (Blattodea: Blaberidae)." *Genomics 102*(5-6): 479-483.

Katoh, K., Iwasaki, M., Hosono, S., Yoritsune, A., Ochiai, M., Mizunami, M. ve Nishino, H. (2017). "Group-housed females promote production of asexual ootheca in American cockroaches." *Zoological Letters 3*(1): 3.

Korkmaz Ağaoğlu, Ö. ve Sidekli, Ö. (2020). "Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Çalışmalarında Uygun Housekeeping Genlerin (HKGs) Seçimi ve Validasyonu." *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*.

Koshikawa, S., Miyazaki, S., Cornette, R., Matsumoto, T. ve Miura, T. (2008). "Genome size of termites (Insecta, Dictyoptera, Isoptera) and wood roaches (Insecta, Dictyoptera, Cryptocercidae)." *Naturwissenschaften 95*(9): 859-867.

Laurent Salazar, M.-O., Planas-Sitja, I., Sempo, G. ve Deneubourg, J. L. (2018). "Individual Thigmotactic Preference Affects the Fleeing Behavior of the American Cockroach (Blattodea: Blattidae)." *Journal of Insect Science 18*(1): 9.

Li, R., Xie, W., Wang, S., Wu, Q., Yang, N., Yang, X., Pan, H., Zhou, X., Bai, L., Xu, B., Zhou, X. ve Zhang, Y. (2013). "Reference gene selection for qRT-PCR analysis in the sweetpotato whitefly, Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae)." *PLoS One 8*(1): e53006.

Li, Z., Li, X., Zhang, Q., Yuan, L. ve Zhou, X. (2020). "Reference gene selection for transcriptional profiling in Cryptocercus punctulatus, an evolutionary link between Isoptera and Blattodea." *Sci Rep 10*(1): 22169.

Li, Z., Yang, L., Wang, J., Shi, W., Pawar, R. A., Liu, Y., Xu, C., Cong, W., Hu, Q. ve Lu, T. (2010). "β-Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole Cynoglossus semilaevis challenged with LPS or Vibrio anguillarum." *Fish shellfish immunology 29*(1): 89-93.

Lü, J., Yang, C., Zhang, Y. ve Pan, H. (2018). "Selection of Reference Genes for the Normalization of RT-qPCR Data in Gene Expression Studies in Insects: A Systematic Review." *Front Physiol 9*: 1560.

Marchal, E., Hult, E. F., Huang, J. ve Tobe, S. S. (2013). "Sequencing and validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR during the gonadotrophic cycle of Diploptera punctata." *BMC Research Notes 6*(1): 237.

McKittrick, F. A. (1964). "Evolutıon Studıes of Cocroach." *Cornell Univ. Agr.* : 389. 197 p.

Migocka, M. ve Papierniak, A. (2011). "Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators." *Molecular Breeding 28*(3): 343-357.

Nogara, P. A., Farina, M., Aschner, M. ve Rocha, J. B. (2019). Mercury in our food. Chemical research in toxicology, ACS Publications. 32**:** 1459-1461.

Pan, H., Yang, X., Siegfried, B. D. ve Zhou, X. (2015). "A Comprehensive Selection of Reference Genes for RT-qPCR Analysis in a Predatory Lady Beetle, Hippodamia convergens (Coleoptera: Coccinellidae)." *PLoS One 10*(4): e0125868.

Panina, Y., Germond, A., Masui, S. ve Watanabe, T. M. (2018). "Validation of common housekeeping genes as reference for qPCR gene expression analysis during iPS reprogramming process." *Scientific reports 8*(1): 1-8.

Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. ve Neuvians, T. (2004). "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations." *Biotechnology letters 26*(6): 509-515.

Ponton, F., Chapuis, M. P., Pernice, M., Sword, G. A. ve Simpson, S. J. (2011). "Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in Drosophila melanogaster." *J Insect Physiol 57*(6): 840-850.

Rehn, J. A. (1945). "Man's Uninvited Fellow Traveler--The Cockroach." *The Scientific Monthly*: 265-276.

Rodrigues, N. R., Nunes, M. E. M., Silva, D. G. C., Zemolin, A. P. P., Meinerz, D. F., Cruz, L. C., Pereira, A. B., Rocha, J. B. T., Posser, T. ve Franco, J. L. (2013).

"Is the lobster cockroach Nauphoeta cinerea a valuable model for evaluating mercury induced oxidative stress?" *Chemosphere 92*(9): 1177-1182.

Rodrigues, T. B., Khajuria, C., Wang, H., Matz, N., Cunha Cardoso, D., Valicente, F. H., Zhou, X. ve Siegfried, B. (2014). "Validation of reference housekeeping genes for gene expression studies in western corn rootworm (Diabrotica virgifera virgifera)." *PLoS One 9*(10): e109825.

Rodríguez-Lázaro, D. ve Hernández, M. (2013). "Real-time PCR in food science: introduction." *Current issues in molecular biology 15*(2): 25-38.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J. ve Andrade, M. J. (2015). Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *PCR primer design*, Springer**:** 31-56.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M. I., Justesen, A. F. ve Córdoba, J. (2011). "Quantificati on of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods." *International Journal of Food Microbiolog 149*(3): 226-235.

Rossato, J. M., Moresco, T. R., Uczay, J. ve da Rocha, J. B. T. (2019). "Staphylococcus aureus-induced sepsis in the lobster cockroach Nauphoeta cinerea." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis 66*: 101343.

Roth, L. M. (2003). "Systematics and phylogeny of cockroaches (Dictyoptera: Blattaria)." *Oriental Insects 37*(1): 1-186.

Roth, L. M. ve Willis, E. R. (1960). "The biotic associations of cockroaches (with 37 plates)."

Sang, W., He, L., Wang, X. P., Zhu-Salzman, K. ve Lei, C. L. (2015). "Evaluation of Reference Genes for RT-qPCR in Tribolium castaneum (Coleoptera: Tenebrionidae) Under UVB Stress." *Environ Entomol 44*(2): 418-425.

Scharlaken, B., de Graaf, D. C., Goossens, K., Brunain, M., Peelman, L. J. ve Jacobs, F. (2008). "Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, Apis mellifera, after a bacterial challenge." *Journal of insect Science 8*(1): 33.

Schimpf, N. G., Matthews, P. G. ve White, C. R. (2012). "Standard metabolic rate is associated with gestation duration, but not clutch size, in speckled cockroaches Nauphoeta cinerea." *Biology Open 1*(12): 1185-1191.

Schlüter, O., Rumpold, B., Holzhauser, T., Roth, A., Vogel, R. F., Quasigroch, W., Vogel, S., Heinz, V., Jäger, H. ve Bandick, N. (2017). "Safety aspects of the production of foods and food ingredients from insects." *Molecular nutrition food Research International 61*(6): 1600520.

Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S. ve Karsch-Mizrachi, I. (2020). "NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools." *Database : the journal of biological databases and curation 2020*: baaa062.

Segatto, A. L. A., Diesel, J. F., Loreto, E. L. S. ve da Rocha, J. B. T. (2018). "De novo transcriptome assembly of the lobster cockroach Nauphoeta cinerea (Blaberidae)." *Genetics and Molecular Biology 41*(3): 713-721.

Shakeel, M., Rodriguez, A., Tahir, U. B. ve Jin, F. (2018). "Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: an overview in insects." *Biotechnol Lett 40*(2): 227-236.

Sikand, K., Singh, J., Ebron, J. S. ve Shukla, G. C. (2012). "Housekeeping gene selection advisory: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β-actin are targets of miR-644a." *PLoS One 7*(10): e47510.

Silva, A. C. B. ve Pelli, A. (2020). "Circadian cycle for Nauphoeta cinerea (Olivier, 1789) (Blattodea, Blaberidae) in laboratory conditions." *Brazilian Journal of Development 6*(9): 65437-65444.

Silver, N., Best, S., Jiang, J. ve Thein, S. L. (2006). "Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR." *Molecular biology 7*(1): 1-9.

Singh, S., Gupta, M., Pandher, S., Kaur, G., Rathore, P. ve Palli, S. R. (2018). "Selection of housekeeping genes and demonstration of RNAi in cotton leafhopper, Amrasca biguttula biguttula (Ishida)." *PLoS One 13*(1): e0191116.

Sinha, D. K. ve Smith, C. M. (2014). "Selection of reference genes for expression analysis in Diuraphis noxia (Hemiptera: Aphididae) fed on resistant and susceptible wheat plants." *Sci Rep 4*: 5059.

Smith, A. J. ve Clopton, R. E. (2003). "Efficacy of Oral Metronidazole and Potassium Sorbate Against Two Gregarine Parasites, Protomagalhaensia granulosae and Gregarina cubensis (Apicomplexa: Eugregarinida), Infecting the Death's Head Cockroach, Blaberus discoidalis." *Comparative Parasitology Comparative Parasitology*(2): 196-199, 194.

Snodgrass, R. E. (1937). "The male genitalia of orthopteroid insects." *Smithsonian miscellaneous collections*.

Sobhy, H. ve Colson, P. (2012). "Gemi: PCR primers prediction from multiple alignments." *Comparative functional genomics 2012*.

Sullivan-Gunn, M., Hinch, E., Vaughan, V. ve Lewandowski, P. (2011). "Choosing a stable housekeeping gene and protein is essential in generating valid gene and protein expression results." *British journal of cancer 104*(6): 1055-1055.

Teng, X., Zhang, Z., He, G., Yang, L. ve Li, F. (2012). "Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time rt-PCR in four lepidopteran insects." *J Insect Sci 12*: 60.

Thellin, O., ElMoualij, B., Heinen, E. ve Zorzi, W. (2009). "A decade of improvements in quantification of gene expression and internal standard selection." *Biotechnology Advances 27*(4): 323-333.

Tilli, T. M., da Silva Castro, C., Tuszynski, J. A. ve Carels, N. (2016). "A strategy to identify housekeeping genes suitable for analysis in breast cancer diseases." *BMC genomics 17*(1): 1-11.

Van Hiel, M. B., Van Wielendaele, P., Temmerman, L., Van Soest, S., Vuerinckx, K., Huybrechts, R., Broeck, J. V. ve Simonet, G. (2009). "Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust Schistocerca gregaria under different developmental conditions." *molecular biology 10*(1): 1-10.

Van Huis, A. (2013). "Potential of insects as food and feed in assuring food security." *Annual review of entomology 58*: 563-583.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. ve Speleman, F. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome biology 3*(7): 1-12.

VanGuilder, H. D., Vrana, K. E. ve Freeman, W. M. (2008). "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis." *Biotechniques 44*(5): 619-626.

Velez, A., Wolff, M. ve Gutierrez, E. (2006). "Blattaria of Colombia: List and distribution of genera." *Zootaxa 1210*(1): 39-52.

Wang, G., Li, C., Guo, X., Xing, D., Dong, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Liu, M., Zheng, Z., Zhang, H., Zhu, X., Wu, Z. ve Zhao, T. (2012). "Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding." *PLoS One 7*(10): e47051.

Wong, M. L. ve Medrano, J. F. (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation." *Biotechniques 39*(1): 75-85.

Wu, H. (2013). "Biology of Blaptica dubia (Blattodea: Blaberidae)."

Xiao, X., Ma, J., Wang, J., Wu, X., Li, P. ve Yao, Y. (2014). "Validation of suitable reference genes for gene expression analysis in the halophyte Salicornia europaea by real-time quantitative PCR." *Front Plant Sci 5*: 788.

Xu, M., Zhang, B., Su, X., Zhang, S. ve Huang, M. (2011). "Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in Populus." *Analytical biochemistry 408*(2): 337-339.

Yang, C., Pan, H., Noland, J. E., Zhang, D., Zhang, Z., Liu, Y. ve Zhou, X. (2015). "Selection of reference genes for RT-qPCR analysis in a predatory biological control agent, Coleomegilla maculata (Coleoptera: Coccinellidae)." *Scientific Reports 5*(1): 18201.

Yang, C., Preisser, E. L., Zhang, H., Liu, Y., Dai, L., Pan, H. ve Zhou, X. (2016). "Selection of Reference Genes for RT-qPCR Analysis in Coccinella septempunctata to Assess Un-intended Effects of RNAi Transgenic Plants." *Front Plant Sci 7*: 1672.

Yang, Z. ve Rannala, B. (2010). "Bayesian species delimitation using multilocus sequence data." *Proceedings of the National Academy of Sciences 107*(20): 9264-9269.

Yeung, A. T., Holloway, B. P., Adams, P. S. ve Shipley, G. L. (2004). "Evaluation of dual-labeled fluorescent DNA probe purity versus performance in real-time PCR." *BioTechniques 36*(2): 266-275.

Zhou, X., Wheeler, M. M., Oi, F. M. ve Scharf, M. E. (2008). "RNA interference in the termite Reticulitermes flavipes through ingestion of double-stranded RNA." *Insect biochemistry molecular biology 38*(8): 805-815.

Zhu, X., Yuan, M., Shakeel, M., Zhang, Y., Wang, S., Wang, X., Zhan, S., Kang, T. ve Li, J. (2014). "Selection and evaluation of reference genes for expression analysis using qRT-PCR in the beet armyworm Spodoptera exigua (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)." *PLoS One 9*(1): e84730.