

İki çalı çekirgesi üzerinde doğal bağışıklık parametrelerinden fenoloksidaz aktivitesi ile litik aktivitenin ve hemolimfteki protein konsantrasyonunun yöntemsel olarak belirlenmesi*

Hasan SEVGİLİ¹

¹Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ordu

*Bu araştırma Ordu Üniversitesi, BAP birimi tarafından AR-1303 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Alınış tarihi: 23 Ekim 2015, Kabul tarihi: 29 Ocak 2016

Sorumlu yazar: Hasan SEVGİLİ, e-posta: hsevgili@gmail.com

Öz

Omurgasızlarda doğal bağışıklık sistemi patojenlere karşı aktive olan oldukça çeşitli ve özgün tepkiler içeren humoral aktivitelere sahiptir. Böceklerde, bu önemli anahtar immün parametrelerden ikisi fenoloksidaz yolağı ve litik aktivitedir. Lizozimler bakteri hücre duvarındaki peptidoglikanları çözen bir grup enzim olup pek çok böcek grubunda bakteri savunması ile bağlantılıdır. Litik aktivite bakteri hücrelerinin hemolimfteki tahrip yeteneğinin in vitro olarak ölçülmesiyle saptanabilir. Fenoloksidaz omurgasızların immün sisteminde anahtar bir enzim olup, hemolimfte yabancı bir cisim saptandığında salgılanır. Dolayısıyla fenoloksidaz aktivitesi (PO) organizmaların yabancı istilacılara karşı savunmada rol alan immün sistemin yeteneğiyle ilişkilidir. Bu çalışmada ilk kez barbitistin (Orthoptera: Phaneropterinae) çalıçekirgelerinden iki türde (*Isophya speciosa*, *Poecilimon similis*), bu iki anahtar immün parametrenin ölçülmesi yöntemi sınanmıştır. Her iki tür için aynı yaştaki 10 erkek 10 dişiden mikroşırınga ile çekilen farklı miktarlardaki hemolimf konsantrasyonundaki (3, 6, 8, 10 µl) PO ve litik aktivite optik yoğunluk bakımından mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür. Buna ilave olarak her iki tür için hemolimfteki protein konsantrasyonu da belirlenmiştir. Çalışma sonucunda daha önce grillid ve bazı diğer böcek gruplarında uygulanan yöntemlerin, küçük değişikliklerle çalıçekirgeleri için de kullanılabilceğı önerilmiştir. Ancak, hemolimfteki toplam litik aktivitenin ölçümünde daha iyi sonuçlar elde etmek

için daha fazla hemolimf miktarına gerek duyulduğu anlaşılmıştır. Bu çalışma barbitistin çekirge türleri üzerinde ileride yapılacak immün çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

Anahtar kelimeler: Doğal bağışıklık, fenoloksidaz aktivitesi, litik aktivite, protein konsantrasyonu, hemolimf, çalı çekirgesi

Methods for the determination of phenoloxidase and lytic activities of innate immunity parameters and protein concentration of the hemolymph in two bushcricket species

Abstract

The innate immune system in invertebrates is composed of a large variety of specific responses that are activated in response to the pathogens. In insects, two key important immune parameters are the lytic activity and phenoloxidase cascade. Lysosomes are an enzyme group that triggers bacterial cell lysis by hydrolyzing the peptidoglycan and lytic activity is the main defense against bacteria. The activity of lysozyme can be measured in vitro by quantifying the ability of the hemolymph to damage bacterial cells. The enzyme phenoloxidase is a key enzyme of the invertebrate immune system, released when a pathogen is detected in the hemolymph. Hence, phenoloxidase activity (PO) is correlated with an organism's ability to resist foreign bodies. This study is the first to apply measurement methods of these two key immune parameters for

two barbitistine bushcricket species (*Isophya speciosa*, *Poecilimon similis*) (Orthoptera: Phaneropterinae). At the same age (10 males 10 females for both species, 10 days of age), different samples of hemolymph (3, 6, 8, 10 µl) was drawn with a microsyringe and both PO and lytic activity was estimated the total change in optical density in the samples, using a microplate reader. Additionally, the total protein concentration in the hemolymph was determined using the Bradford method for both species. Finally, the results suggest that PO and lytic activities detection methods previously used in both grillid and some other insect species can be used in bushcrickets after simple modifications. However, to get better results for estimation of total lytic activity of hemolymph, it is understood that should be required obtaining more hemolymph. The study can lead to future studies on immune activities in barbitistine bushcrickets.

Key words: Innate immunity, phenoloxidase activity, lytic activity, protein concentration, hemolymph, bushcricket

Giriş

Böcekler dünyadaki mevcut hayvan türlerinin yaklaşık %75'ini oluşturmakta olup, biyoçeşitlilik açısından gösterdikleri uyumsal başarı nedeniyle "bağışıklık" çalışmaları konusunda da ilgi çeken bir gruptur. Böcek immünolojisi çalışmaları temel böcek biyolojisi, bağışıklık mekanizmalarının ortaya çıkarılması, hastalık etiolojisi, uygulamalı entomoloji, biyolojik mücadelede parazitoidlerin başarısında immünolojik faktörlerin etkilerini anlamak açısından kritik öneme sahiptir (Beckage, 2008). Böcekler tarafından bitki ve hayvanlara geçirilen viral hastalıklar ele alındığında ve tarımsal zararlılarla mücadelede kritik rol oynaması bakımından böcek immünolojisi çalışmaları insan sağlığı ve ekonomik anlamda büyük bir role sahiptir.

Omurgalı türler yabancı hücre ve patojenleri tanımak ve yok etmek için hem doğal hem de adaptif bağışıklık (edinsel bağışıklık) mekanizmalarına sahipken, omurgasızlar enfeksiyonlarla savaşmak için sadece doğal bağışıklığa (innate immunity) sahiptir (Hoffmann ve Reichart, 2002; Janeway ve Medzhitov, 2002; Cooper ve Alder, 2006). Karşılaştırmalı hücresel, moleküler ve biyokimyasal araştırmalar doğal bağışıklığın savunma mekanizmalarının yaygın hücre-sinyal yollarını, transkripsiyonel elementleri ve sitotoksik efektör tepkilerini kapsadığını göstermiştir (Nappi ve

Christensen, 2005). Adaptif bağışıklık sistemi ise kıkırdaklı balıkların atalarında ortaya çıkmış olup doğal bağışıklık sisteminin aksine çok çeşitli mikrobiyal antijenleri tanımaya yarayan yeniden düzenlenen genler tarafından kodlanan geniş bir reseptör (immunoglobulinleri ve T hücre reseptörleri) repertuarını kullanır (Hoffmann ve Reichart, 2002).

Genel olarak böceklerdeki doğal bağışıklık sistemleri olan humoral ve hücresel bağışıklık sistemi oldukça kompleks biçimlerde işlev göstermektedir (detaylar için bkz. Cerenius ve Söderhall, 2004; Tunaz, 2004; Iwanaga ve Lee, 2005; Beckage, 2008; Tsakas ve Marmaras, 2010). Böceklerde sıklıkla iki anahtar immün parametre üzerinde çalışılmaktadır: Fenoloksidaz (Phenoloxidase, PO) yolağı ve Litik aktivite (LY). İlgili literatüre bakıldığında, immün sistemin en önemli parametrelerinden profenoloksidaz aktivitesi ile ilgili çalışmalar özellikle model organizmalar üzerinden yürütülmektedir. Örneğin, *Bombyx mori* (Kawabata ve ark., 1995, Asano ve Ashida, 2001), *Drosophila melanogaster* (Fujimoto ve ark., 1995; Asada ve ark., 2003), *Tenebrio molitor* (Lee ve ark., 2002) ve *Manduca sexta* (Jiang ve ark., 1997, 2003) türleri yaygın bir şekilde kullanılan türlerdir. Melanizasyon ile ilgili olan pro-fenoloksidaz (pro-PO) aktivasyonu pek çok omurgasız hayvan grubunda patojenlere karşı oluşturulan önemli bir immün cevaptır. Melanizasyon yolağı (profenoloksidaz aktivasyon sistemi) patojenlere karşı daha yavaş tepkiler olan hücresel savunma ve antimikrobiyal peptidlerin sentezi şeklindeki cevaplardan çok daha hızlı bir tepkidir (Cerenius ve ark., 2008). Melanizasyon reaksiyonu çok az yoğunlukta bile olsa yüksek patojenik organizmalara ve en azından bazı durumlarda konakçı antimikrobiyal peptidlere karşı oldukça etkilidir. Ancak, *Drosophila* ve *Anopheles gambiae*'de PO aktivitesinin pek çok bakteri ve fungal patojenlerin tasfiyesinde öncelikli olarak ihtiyaç olmadığı da rapor edilmiştir (Schnitger ve ark., 2007). Diğer taraftan mutant ve yabancı tip *Drosophila*'da yapılan pro-PO aktivitesi çalışmalarında PO aktivitesinin gram pozitif bakteri ve funguslara karşı savunmada rol alan Toll yolağı ve gram negatif bakterilere karşı savunmada etkili olan IMD yollarının varlığında direnci arttırdığı bildirilmektedir (Tang ve ark., 2006). Böceklerdeki Toll ve IMD savunma yolları memelilerdeki Toll-benzeri reseptörlere homolog olup böcekler ve memeliler arasındaki doğal bağışıklığın evrimsel

korunumuna işaret eder (Hoffmann, 2003). *M. sexta* ile yapılan bir çalışmada PO aktivasyonunun işgalci mikroorganizmaları bloke eden ve öldüren çok sayıda enzim içeren (proteinaz, oksidaz gibi) böcek savunma sisteminin tamamlayıcı bir ögesi olduğuna işaret edilmiştir (Zhao ve ark., 2007).

Lizozim aktivitesinin doğal bağışıklıktaki rolü çok açıktır. Farklı türlerdeki lizozim aktivitesinin ölçülmesi doğal bağışıklığın evrimsel süreci konusunda ilginç sorular ortaya koyar (bkz. *Gryllus bimaculatus*, Schneider, 1985 ve Rantala ve Roff 2005; *Gryllus texensis*, Adamo, 2004). Böcek hemolimfindeki lizozim aktivitesi bir bireyin hemolimfindeki bakterial karışımın açıklık oranı (optik yoğunluğu) ile kolayca belirlenebilmektedir (Rantala ve Kortet, 2003). Lizozim aktivitesi aynı zamanda genel olarak doğal bağışıklık sisteminde vücuda giren daha büyük organizmaların yok edilmesinde rol olan enkapsülasyon yeteneği ile de pozitif ilişki gösterdiği bilinmektedir. Ancak, oransal olarak düşük lizozim aktivitesi bu iki bağışıklık parametresi arasında uzlaşma varsa gerçekleşir (Rantala ve Roff, 2005). Diğer taraftan, Cotter ve ark. (2004) Mısır-Pamuk Yaprakurdu'nda (*Spodoptera littoralis*) enkapsülasyon oranı ve antibakteriyal aktivite (lizozim-benzeri aktivite) arasındaki genetik uzlaşma işaret eden PO aktivitesi ve antibakteriyal aktivite arasında negatif genetik bir korelasyon bulmuşlardır.

Omurgasızlarda yaralanma ve enfeksiyonlara karşı Toll-benzeri reseptörle düzenlenen antimikrobiyal peptid üretimi görülmektedir (Lemaitre ve ark., 1996; Imler ve Hoffmann, 2000). Örneğin, *Tachypleus tridentatus* (Japon Atnalı Yengeci) tamamen doğal bağışıklık sistemi ile patojenlere karşı etkili bir savunma sistemine sahiptir. Çeşitli omurgasız türlerinde bağışıklık sisteminde iş gören protein ve peptidler Iwanaga ve Lee (2005) tarafından listelenmiştir. Bu savunma molekülleri fenoloksidaz, pıhtılaşma faktörleri, tamamlayıcı faktörler, proteaz inhibitörler, antimikrobiyal peptidler, Toll reseptörleri ve diğer temel olarak hemolimf ve hemositlerde bulunan humoral faktörlerlerdir (Ganz, 2003; Iwanaga ve Lee, 2005). Bütün bu elemanlar birlikte bir düzen içerisinde iş görerek işgalci bakteri, mantar ve viral patojenlere karşı savunmada görev yaparlar.

Orthoptera takımından (Çekirgeler) Ensifera (uzunantenneliler) grubuna ait bazı türlerde pro-fenoloksidaz aktivitesi ve lizozim aktivitesini de içine alan immün sistem parametreleri ile ilgili bazı

çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda pro-PO, litik aktivite, melanizasyon, enapsülasyon gibi parametrelere ilişkin fizyolojik, davranışsal ve ekolojik perspektifli hipotezler sorgulanmış olup, *Acheta domesticus* (Silva, 2002; Silva ve ark., 2000), *Gryllus bimaculatus* (Rantala ve Kortet, 2003), *Gryllus texensis* (Adamo ve ark., 2001; Adamo ve Lovett, 2011; Adamo, 2004), *Gryllus assimilis* (Park ve ark., 2011), *Gryllus vocalis* (Gershman, 2008), *Gryllus firmus* (Rantala ve Roff, 2006), *Gryllus campestris* (Jacot ve ark., 2005), *Allonemobius socius* (Fedorka ve ark., 2004; Fedorka ve Mousseau, 2007), *Teleogryllus commodus* ve *T. oecanicus* (Zuk et. al., 2004; Tregenza ve ark., 2006), *Gryllodes sigillatus* (Gershman ve ark., 2010), *Anabrus simplex* (Srygley, 2012; Srygley et. al., 2009, 2011; Bailey, 2011); *Metrioptera roeseli* (Berggren, 2010) türleri üzerinde yapılmış çalışmalar doğal bağışıklıkla ilişkilendirilmiş önemli eko-immünolojik ve ekofizyolojik araştırmalardır.

Diğer taraftan hemolimfteki protein konsantrasyonu ile bazı immün aktiviteler arasında ilişki olduğunu belgeleyen araştırmalara göre, örneğin litik aktivite ile protein konsantrasyonu arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır (Fedorka ve ark., 2013). Bilindiği gibi böcekler açık dolaşım sistemine sahiptir ve besinler, oksijen, hormonlar ve diğer hücreler hemolimf içerisinde dağılırlar. Antimikrobiyal peptidler ve proteinler ökaryotlarda savunmada, yaraların onarılmasında ve savunma sisteminin düzenlenmesinde rol oynayan önemli elemanlardır (Fredrick ve Ravichandran, 2012). Genel olarak hemolimfte sirküle olan protein yoğunluğunun fazla olması daha güçlü bir bağışıklığa işaret etmektedir.

Araştırmada Ordu ili civarından toplanan iki çalıçekirgesi (*Isophya speciosa* ve *Poecilimon similis* (Orthoptera: Phaneropterinae)) türünde temel iki immün sistem parametresinin (toplam fenoloksidaz (PO) aktivitesi, Lizozim aktivitesi (LY)) ve immün sistemle ilişkili hemolimfteki protein konsantrasyonunun ölçüm yönteminin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çünkü diğer gruplara uygulanmış mevcut yöntemler bu türlere ve akraba gruplarına ilişkin halihazırda uygulanmamıştır. Bu çalışmada sınıanacak yöntem, çalışılması planlanan cinslerin özellikle ülkemizde çok sayıda tür içermesi ve bunların önemli bir kısmının endemik olması nedeniyle bu gruplar üzerinde yapılacak çalışmalar için temel bir zemin oluşturacaktır (Sevgili, 2004). Hoffmann ve ark. (1996) tarafından Orthoptera türlerinde bakterilere karşı spesifik bir savunma

göstermediklerini bildirmişlerse de, lizozimler ve lizozim benzeri enzimlerin bakterilere karşı etkin olduğu yapılan bir çok çalışmada bildirilmiştir (örn. Adamo, 2004; Fedorka ve Sevgili, 2014). Bu çalışma sonucunda, ileride planlanacak immün sistem ve diğer ekolojik ve davranışsal parametrelerin, tarımsal açıdan zararlı olabilecek türler üzerinde yapılacak çalışmalarda da kullanılabilir bir yöntemsel yaklaşımın oluşturulması amaçlanmıştır. Barbitistini tribüsüne ait Dünya'da yayılış gösteren 100 kadar *Isophya* ve 150 kadar da *Poecilimon* türü tespit edilmiştir (Eades ve ark., 2015). Bunların önemli bir kısmı dar bir yayılış alanına sahip olup, belli coğrafik bölgelerde endemik popülasyonlar halinde sıkışık kalmışlardır. Yapılacak immün sistem çalışmalarının bu türlerin ileride doğabilecek tarımsal zarar durumlarındaki mücadelede veya olası koruma biyolojisi çalışmalarında, immün sistem nedenleriyle ilgili yararlanılabilecek kritik veriler içereceği düşünülmüştür.

Amaç, daha önce immün sistem ile ilgili çalışmalarda kullanılmış olan *Teleogryllus*, *Gryllus*, *Allonemobius*, *Gryllodes*, *Anabrus* gibi çekirgeler için önerilen protokollerin Barbitistini grubu türlerdeki metodolojisini geliştirmektir. Bu çalışmada Balkanlardan, Orta Karadeniz Bölgesine kadar kıyı seridinde yayılış gösteren uzun antenli yeşil çekirgelerden *Isophya speciosa* ve *Poecilimon similis* türleri model organizma olarak kullanılmış ve patojenlere karşı oluşturulan immün cevaplardaki parametrelerin eldesinde temel olan hemolimfteki PO, Lizozim (Litik) toplam aktivitesi ve protein miktarlarının belirlenmesi yöntemleri sınanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışılan türler

Planlanan çalışmada birbirlerine yakın akraba olan Orthoptera takımının Tettigoniidae familyasına ait *Isophya speciosa* ve *Poecilimon similis* türleridir. *I. speciosa* türünün genel yayılışı Anadolu'nun Orta ve Batı Karadeniz sahilleri ile Batı Karadeniz'in nispeten iç bölgeleri ve Karadeniz Marmarası'dır. Türün yayılışı batıda Trakya ve Balkanlara uzanmaktadır (Sevgili, 2004). Tür Orta Karadeniz Bölgesinde Ordu, Samsun ve Sinop illerinde tespit edilmiş olup, erginlerine kıyı kesimlerde Mayıs ayından itibaren rastlanmaktadır. Kıyı bölgeleri çeşitli nedenlerle doğal halini kaybetmiş olsa da, bu türü bahçe kenarları ve ilaçlanmayan fındık bahçeleri, dere kenarlarındaki uygun alanlardaki yeşil otlar içerisinde toplamak mümkündür. *P. similis* ise *I. speciosa*'ya göre daha küçük bir vücuda

sahiptir. Bu tür tüm Karadeniz sahili boyunca yayılış gösterir. Ancak, *I. speciosa* türünden yaklaşık 20-30 gün sonra erginleşir ve *I. speciosa*'nın boşalttığı nişleri kıyı bölgelerde yaz ortasına kadar işgal eden oldukça yaygın bir türdür. Planlanan çalışma için, daha önce türlerin gözlemlendiği alanlara Mayıs-Haziran aylarında ziyaretler yapılarak örnekler toplanmıştır. Örnek toplama klasik yöntemlerle (atrap vs.) gerçekleştirilmiştir. *P. similis* örnekleri Ordu ili, Fatsa yolu, Neneli köyü'nden (70 m) 01.06.2013 tarihinde 25 erkek 30 dişi olarak toplanmıştır. *I. speciosa*'dan yine aynı lokaliteden 13.05.2013 tarihinde 25 erkek, 22 dişi toplanmıştır. Ancak, bireylerin yaşlarını tespit etmek açısından bir kısım örnek nimf olarak toplanmıştır. Toplanan örnekler böcek yetiştirme kafesleri ile laboratuvara taşınmış ve örneklerin üzerinden toplandığı bitkiler çekirgelerin beslenmeleri amacıyla kafese konulmuştur. Erkek ve dişiler çiftleşme olmaması için ayrı ayrı kafeslerde ve kafesler oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Çünkü çiftleşme ile bireylerde immün sistem parametreleri değişebilmektedir (Gershman, 2008). Son devre nimf olarak getirilen örnekler kafeslerde beslenmiş, erginleşme tarihleri not edilmiş ve yaşları kontrol altına alınmıştır. Deneyde aynı yaştaki bireyler kullanılmıştır (son deri değişiminden sonra 10 günlük). Toplanan örnekler son devre nimf oldukları için bir kaç gün içerisinde erginleşmişlerdir. Deneyde kullanılmayan örnekler aynı kafeslere alınmış (türler ayrı) ve kendi doğal süreçlerinde ölene kadar beslenmişlerdir.

Hemolimf örnekleme

Çalışma için her iki türden ergin 10 erkek ve 10 dişi birey kullanılmıştır. Erkek ve dişilerden aynı gün içerisinde hemolimf alınmıştır. Hemolimf canlı bireyden alındığı için örnekler önce CO₂ gazı kullanılarak bayıltılmıştır. Hemolimf çekimi için laboratuvarında mevcut olan Mikro Şırınga (10µL Hamilton Co. Reno, NV) kullanılmıştır. Bayıltılan örnek mikroskop (Stereo Zoom) altında yatırılmış ve şırınga yardımıyla ikinci ve üçüncü abdominal sternitler arasından girilerek 5 ve 10 µl hemolimf çekilmiştir. Çekilen hemolimfler daha önce hazırlanan Eppendorf tüplere (sırasıyla 17µl, 12µl PBS içeren) boşaltılmış ve analizlerde kullanılmak üzere -18°C'ye konulmuştur.

Hemolimfteki Fenoloksidaz (PO) konsantrasyonunun belirlenmesi

Bu amaçla 7 erkek ve dişiden 10 µL hemolimf 12 µL PBS içeren (Phosphate Buffered Saline) mikrosantrifüj tüplere (1.7 mL) eklenerek çalışma

örneği oluşturulmuştur. Bu çalışma örneğinden *Isohya speciosa* için 3, 6 ve 12 µL şeklinde alınan örneklere farklı miktarlarda PBS (Phosphate Buffered Saline) eklenmiştir (bu miktarlar 5-12 µL arasındaki değerler için denenmiştir). *P. similis* türünden ise 5 µL hemolimf çekilmiş ve 17 µL PBS içerisinde saklanmıştır. Bu örnekler çalışılmak üzere -18°C'de tutulmuştur. Daha sonra Rantala ve Kortet (2003, 2004), Rantala ve Roff (2005), Fedorka ve Mousseau (2007), Fedorka ve Sevgili (2014) tarafından kullanılan yöntemlerden yararlanılmıştır. Yöntemde 14 µL bovine pancreas alfa-chymotrypsin hazırlanan örneğe 96 kuyucuklu plakada eklenmiş, daha sonra 90 µL L-DOPA ilave edilmiştir. Fenoloksidaz aktiviteleri Mikroplate Okuyucuda (Multiscan FC, Thermo Scientific) ölçülmüştür (490 nm).

Litik aktivitenin belirlenmesi

Lizozimler bakteri hücre duvarındaki peptidoglikanları çözen bir grup enzim olup pek çok böcek grubunda bakteriyel direnç ile bağlantılıdır (Moret ve Schmid-Hempel, 2001). *P. similis* için 13 µL örnek (hemolimf+PBS karışımı) kullanılmıştır. Rantala ve Kortet (2003, 2004), Rantala ve Roff (2005), Fedorka ve Mousseau (2007), Fedorka ve Sevgili (2014) tarafından kullanılan yöntemlerle litik aktivite belirlenmiştir. Yöntemde çalışma örneklerine (96 kuyucuklu plakadaki) 90 µL *Micrococcus luteus* solüsyonu ilave edilmiştir. Hemolimfteki litik aktiviteyi belirlemek için PO konstantrasyonundaki oranlar çerçevesinde 7 erkek ve dişi birey için Mikroplate okuyucuda aktivite ölçümü yapılmıştır (450 nm).

Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Fenoloksidaz ve Lizozim konsantrasyonları gibi çalışılacaklarındaki protein miktarı da bilinmemektedir. Bunu belirlemek için; A, B, C şeklinde etiketlenmiş, 10 µL PBS içeren mikrosantrifüj tüplerde farklı miktarlarda hemolimf içeren örnekler sırayla seyreltilmiştir (10 erkek ve 10 dişi). Bradford Yöntemi (Bradford, 1976) kullanılarak (100ug-2000ug), mevcut çalışma örneklerinden alınan 1 µL örnek kuyucuklara koyulmuş ve 99 µL Bradford ile seyreltilmiştir. Daha sonra Mikroplate okuyucu (590 nm) ile hemolimfteki protein konsantrasyonu ölçülmüştür.

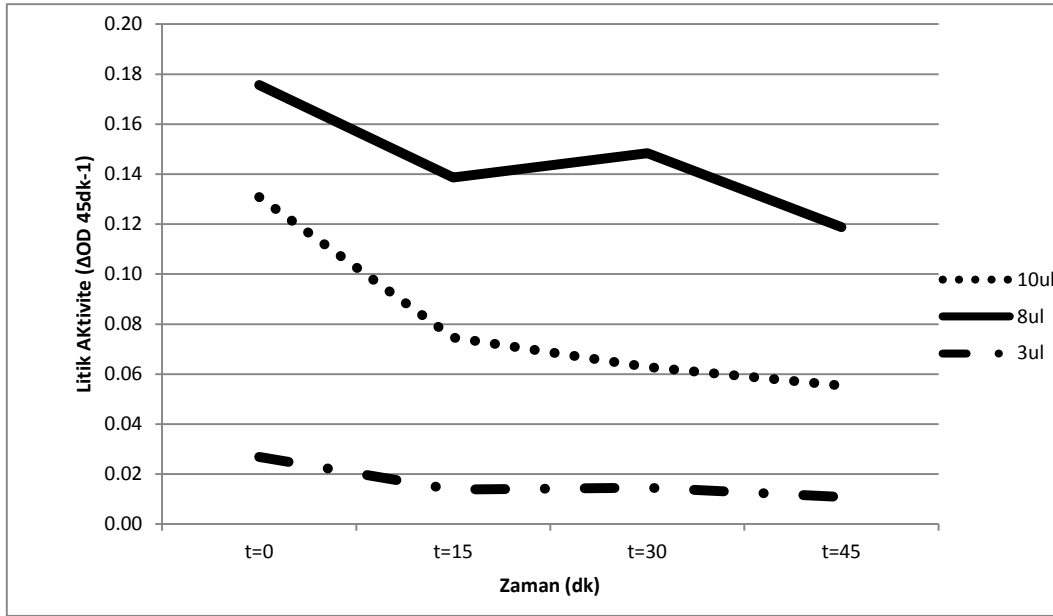
Bulgular

I. speciosa için farklı miktarlarda çekilen hemolimfteki PO ve LY belirlenirken, *P. similis* için aynı miktarda çekilen hemolimflerin farklı bireylerdeki durumu da araştırılmıştır. *I. speciosa* türünde hemolimf miktarı arttıkça PO aktivitesi de artmaktadır (Şekil 1). Zaman bağı olarak PO aktivitesi linear bir şekilde artış göstermektedir. LY aktivitesi ise PO'dan farklılık göstermektedir. Zamana bağı olarak lizozim aktivitesi linear bir artış göstermez, aksine giderek azalma eğilimi göstermektedir (Şekil 2). Ancak, çalışmada bazı örneklerde düzensiz bir seyir izlediği de tespit edilmiştir. Aktivitedeki zaman bağı azalma farklı oranlar arasında önemsiz görünmektedir. Lizozim aktivitesinin son okuma değeri ile ilk değer arasındaki fark tüm örneklerde negatiftir. Lizozim aktivitesi hemolimf miktarının artmasıyla artış göstermektedir.

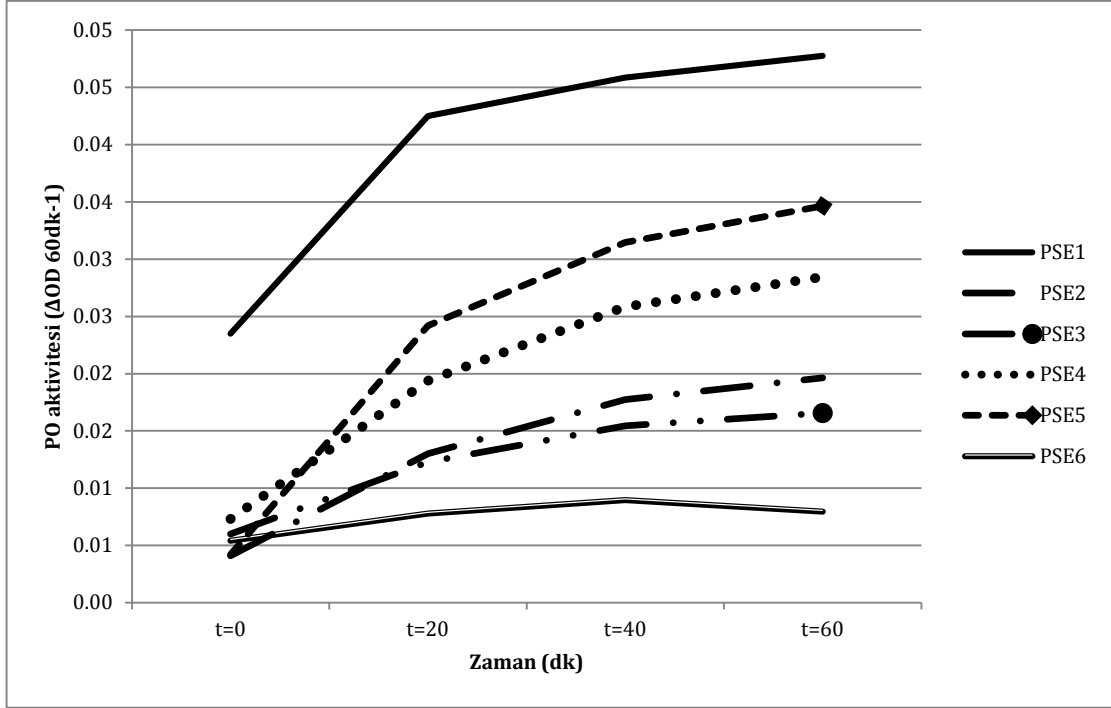
P. similis türünde aynı miktarda kullanılan hemolimf örnekleme oranlarının bireyler arasında farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Zamana bağı olarak fenoloksidaz aktivitesinin seyri genel olarak lineardır (Şekil 3). LY aktivite tüm örneklerde ilk 20 dk içerisinde artış gösterirken daha sonra örneklerin bir kısmında giderek azaldığı görülmüştür (Şekil 4, ilk 20 dk'daki artış grafikte gösterilmemiştir). Ancak bazı örneklerde düzensiz bir durum izlemiştir. Tüm bireyler için aynı miktarda örnek kullanılmasına rağmen LY aktivitesi bakımından varyasyonel bir durum olduğu görülmüştür. Lizozim aktivitesinin son okuma değeri ile ilk değer arasındaki fark tüm örneklerde negatiftir. Ancak bir bireyde pozitif değer bulunmuştur. Hemolimfteki protein konsantrasyonu klasik Bradford yöntemi (Bradford, 1976) kullanılarak yapılmış olup türler arasında farklılık göstereceğine ilişkin ön bulgular elde edilmiştir (Şekil 5, 6). Bazı grillid türleri üzerinde yapılan çalışmalarda da kullanılan yöntem daha çok hemolimfteki protein konsantrasyonunun LY ve PO aktiviteleri ile ilişkili olup olmadığını belirlemek amaçlı kullanılmıştır (Fedorka ve ark., 2013). Yapılan çalışmada protein konsantrasyonunun bireyler arasında varyasyonel olabileceğine ilişkin ön veriler ortaya çıkmıştır (Şekil 7).



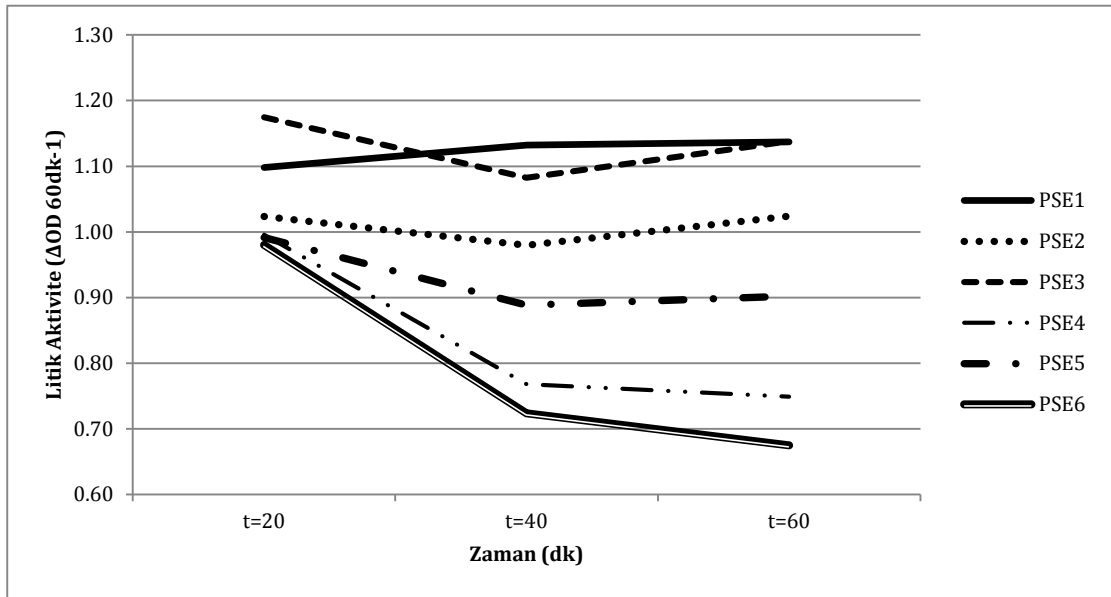
Şekil 1. *Isophya speciosa*'da zamana bağlı olarak Fenoloksidaz (PO) aktivitesinin değişimi (3 µl hemolimf PBS karışımı için $y = 0.082x - 0.05$, $R^2 = 0.99$; 6uL hemolimf PBS karışımı için $y = 0.120x - 0.078$, $R^2 = 0.99$, OD A_{492}).



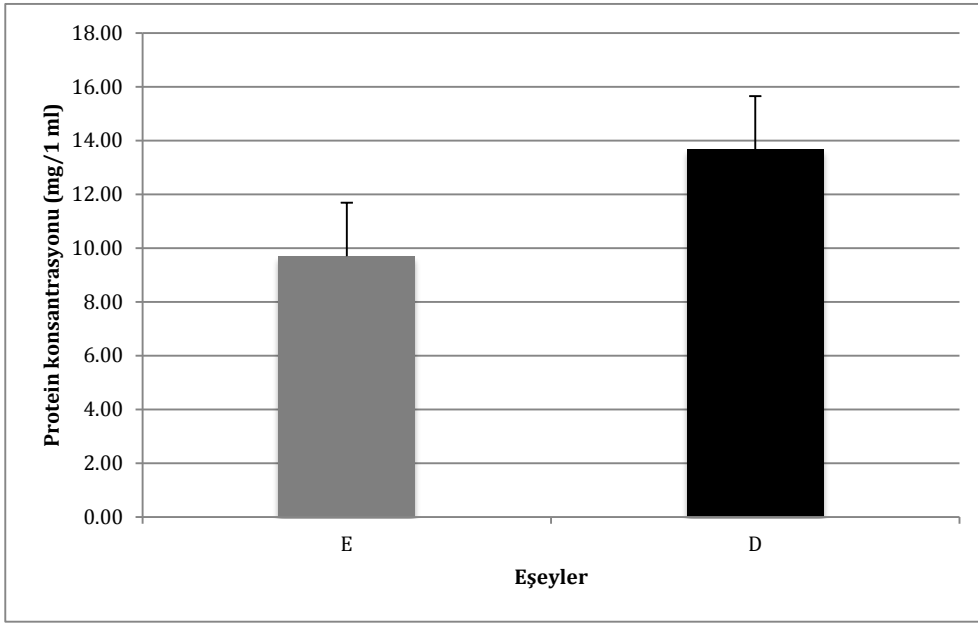
Şekil 2. *Isophya speciosa*'da zamana bağlı olarak litik aktivitenin (LY) değişimi (3 µl hemolimf PBS karışımı için $y = -0.004x + 0.028$, $R^2 = 0.74$; 8uL hemolimf PBS karışımı için $y = 0.016x + 0.185$, $R^2 = 0.77$; 10 µl hemolimf PBS karışımı için $y = 0.024x + 0.14$, $R^2 = 0.81$, OD A_{450}).



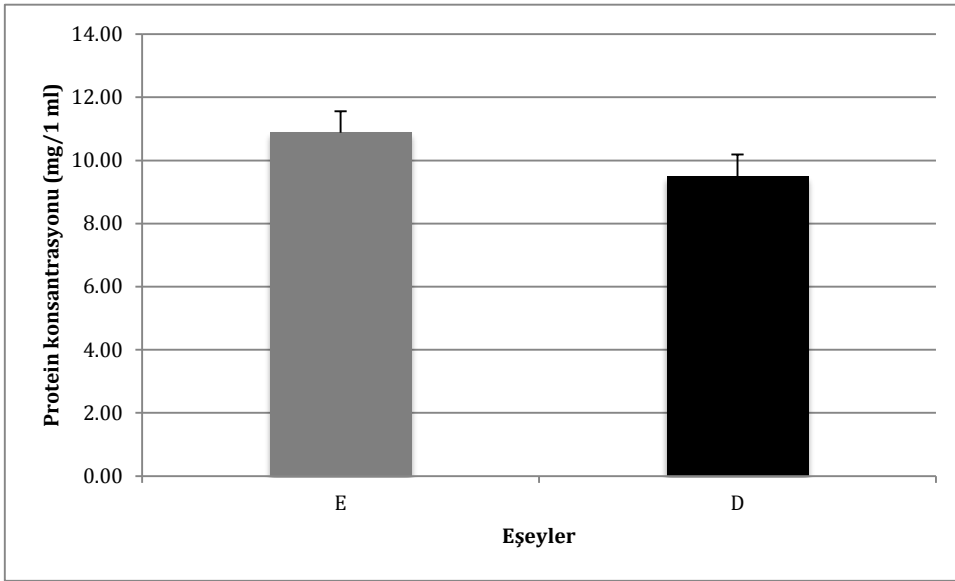
Şekil 3. *Poecilimon similis*'te zamana bağlı olarak Fenoloksidaz (PO) aktivitesinin değişimi (PSE1: $R^2= 0.78$; PSE2: $R^2=0.87$; PSE3: $R^2=0.91$; PSE4: $R^2=0.91$; PSE5: $R^2=0.90$; PSE6: $R^2= 0.57$; 6 μ l hemolimf+PBS; OD A_{492}). (PSE:*Poecilimon similis* erkek).



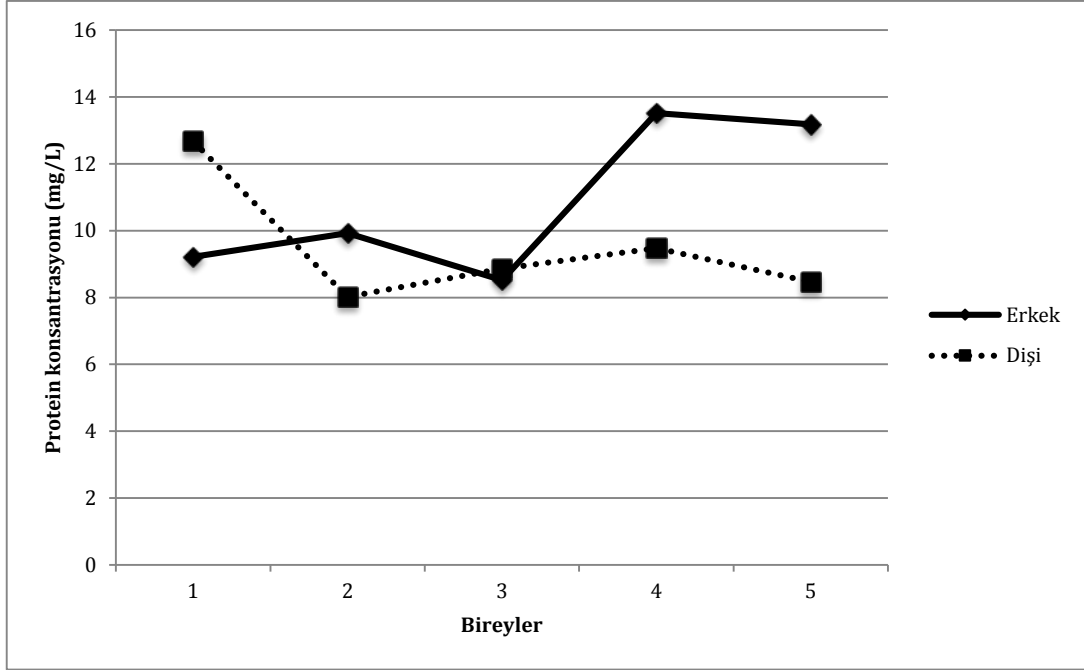
Şekil 4. *Poecilimon similis*'te zamana bağlı olarak litik aktivitenin (LY) değişimi (13 μ l hemolimf + PBS; OD A_{492}). (PSE:*Poecilimon similis* erkek).



Şekil 5. *Isophya speciosa*'da erkek (E) ve dişilerde (D) hemolimfteki protein konsantrasyonu (1 μ l PBS + hemolimf; OD₅₉₀).



Şekil 6. *P. similis*'in erkek (E) ve dişisinde (D) hemolimfteki protein konsantrasyonu (1 μ l PBS+hemolimf; OD₅₉₀).



Şekil 7. *P. similis*'in erkek ve dişisinde hemolimfteki protein konsantrasyonu ölçümünde bireyler arasındaki değişkenlik (1 µl PBS+hemolimf; OD₅₉₀).

Sonuç

Çalışmada cins olarak birbirlerine yakın iki türde bazı immün parametrelerin ölçümüne ilişkin yöntemsel bir veri sunulmuştur. Yapılan çalışma ile böceklerin immün tepkilerinin değerlendirilmesinde en önemli yöntemlerden olan hemolimfteki fenoloksidaz ve lizozim aktivitelerinin belirlenmesinde Rantala ve Kortet (2003, 2004), Rantala ve Roff (2005), Fedorka ve Mousseau (2007), Fedorka ve Sevgili (2014) tarafından önerilen yöntemlerin çalıçekirgeleri için de farklı hemolimf oranlarında uygun olabileceği anlaşılmıştır. Çalışma sonucunda hem *Isophya speciosa* hem de *Poecilimon similis*'te fenoloksidaz aktivitesi için PBS+hemolimf karışımından 3-6 µl kullanmanın analiz için yeterli olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu sonuç grillid türleri ile yapılan çalışmalarda oranlara yakın değerlerdir (Adamo, 2004; Adamo ve ark., 2001; Adamo ve Lovett, 2011; Fedorka ve ark., 2013; Fedorka ve Sevgili, 2014). Litik aktivite ise daha yüksek bir konsantrasyon gerektirmekte ve minimum 8-10 µl kullanılmalıdır. Çalıçekirgeleri için 15 µl önerilebilir. Eğer litik aktivitenin ölçümünde bu şekilde sonuç alınmaz ise, her ne kadar bu çalışmada denenmemişse de litik zon belirleme yöntemine gidilebilir (Lee ve ark., 2008). Grillidlerle yapılan çalışmalarda 10-16 µl

PBS+hemolimf karışımı kullanılmıştır (örn. Sevgili ve Fedorka, 2014). Hemolimfteki protein miktarının belirlenmesinde ise çalışma stoğundan çok az miktar, minimum 1 µl kullanmak yeterli olmaktadır. Ölçülen fenoloksidaz ve litik aktivitelerin eşeyler arasındaki değişkenliğinin anlaşılması için daha fazla sayıda örnekleme ihtiyaç duyulduğundan bu çalışmada bu sonuçlara değinilmemiştir. Ancak Bateman'ın prensibine göre yumurta üretimi ve yumurta bırakma zorunlulukları nedeniyle immün aktivitelerin dişilerde daha yüksek olması beklenir (Rolf, 2002).

Hemolimf çekiminden sonra immün analizler için uzun süre beklenirse (genel olarak 2-3 aydan sonra) çalışma örneklerinin -80°C'de bekletilmesi analizlerin sağlıklı olması açısından önemlidir. Diğer bir husus ise hemolimf toplama sırasında tüplerin buz içerisinde tutulması önerilir. Olası kontaminasyonlar için kullanılacak malzemelerin otoklavlanması gerekir.

Ölçülen parametrelerdeki değerlerin farklı türlerde farklı olabileceğine ilişkin ön bulguların olması gelecekte planlanacak çalışmalar için önem arz etmektedir. Sonuç olarak; birbirlerine çok yakın iki cinse ait iki farklı çekirge türünde yapılan bu ön çalışma, her iki grup için de benzer yöntemlerin ve protokolün uygulanabileceğini göstermiştir.

Teşekkür

Bu çalışma Ordu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından AR-1303 kodlu proje ile desteklenmiştir. Çalışmada böceklerin beslenmesinde ve araştırma sürecindeki diğer yardımları nedeniyle Nilgün TOKGÖZ'e teşekkür ederim. Metodoloji için önerilerde bulunan Kenneth M. FEDORKA'ya da (University of Central Florida/USA) ayrıca teşekkür etmek isterim.

Kaynaklar

- Adamo, S. A., 2004. Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of Insect Physiology*, 50: 209-216.
- Adamo S. A, Jensen M., Younger M., 2001. Changes in lifetime immuno competence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. *Animal Behavior*. 62:417-425.
- Adamo, S. A., Lovett, M.M.E., 2011. Some like it hot: the effects of climate change on reproduction, immune function and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of Experimental Biology*, 214: 1997-2004.
- Asada, N., Yokoyama, G., Kawamoto, N., Norioka, S., Hatta, T., 2003. Prophenol oxidase A3 in *Drosophila melanogaster*: activation and the PCR based cDNA sequence. *Biochemical Genetics*, 41: 151-163.
- Asano, T., Ashida, M., 2001. Cuticular pro-phenoloxidase of the silk worm, *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 111000-11112.
- Bailey, N. W., 2011. A test of the relationship between cuticular melanism and immune function in wild-caught Mormon crickets. *Physiological Entomology*, 36: 155-164.
- Beckage, N. E. 2008. *Insect Immunology*, Academic Press/Elsevier.
- Berggren, A. 2010. Testing the effect of individual color morphology on immune response in bush-crickets. *Insect Science*, 17: 400-405.
- Bradford, M. M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cerenius L., Soderhall, K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198: 116-126.
- Cerenius, L., Lee, B. L., Söderhall, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29: 263-271.
- Cooper, M. D., Alder, M. N., 2006. The evolution of adaptive immune system. *Cell*, 124: 815-822.
- Cotter, S.C., Kruk, L. E. B., Wilson, K., 2004. Cost of resistance: genetic correlations and potential trade-offs in an insect immune system. *Journal of Evolutionary Biology*, 17: 421-429.
- Eades, D.C., Otte, D., Cigliano, M. M., Braun, H., 2015. Orthoptera Species File. Version 5.0/5.0. [17.10.2015]. <<http://Orthoptera.SpeciesFile.org>>.
- Fedorka, M. K, Zuk, M., Mousseau, T. A., 2004. Immune suppression and the cost of reproduction in the ground cricket, *Allonemobius socius*. *Evolution*, 58: 2478-2485.
- Fedorka, K. M., Mousseau, T. A., 2007. Immune system activation affects the male sexual signal and reproductive potential in crickets. *Behavioral Ecology*, 18: 231-235.
- Fedorka, K. M., Copeland, E. K., Winterhalter, W. E., 2013. Seasonality influences cuticle melanization and immune defense in a cricket: support for a temperature-dependent immune investment hypothesis in insects. *The Journal of Experimental Biology*, 216: 4005-4010.
- Fedorka, K. M., Sevgili, H., 2014. The influence of nuptial feeding and sperm transfer on the immunological cost of reproduction in the ground cricket *Allonemobius socius*. *Physiological Entomology*, 39: 89-93.
- Fredrick, W. S., Ravichandran, S., 2012. Hemolymph proteins in marine crustaceans. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2: 496-502.
- Fujimoto, K., Okino, N., Kawabata, S., Ohnishi, E., 1995. Nucleotide sequence of the cDNA encoding prophenoloxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 7769-7773.
- Ganz, T., 2003. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integrative and Comparative Biology*, 43: 300-304.
- Gershman, S. N., 2008. Sex-specific differences in immunological costs of multiple mating in *Gryllus vocalis* field crickets. *Behavioral Ecology*, 19 (4): 810-815.
- Gershman, S. N., Barnett, C. A. Pettinger, A. M., Weddl, C. B., Hunt, J., Sakaluk, S. K., 2010. Give 'til it hurts: trade-offs between immunity and male reproductive effort in the decorated cricket, *Grylloides sigillatus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 23 (4): 829-839.

- Hoffmann, J. A., 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426: 33-38.
- Hoffmann, J. A., Reichart, J. M., 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunology*, 3: 121-126.
- Hoffmann, J. A., Reichart, J. M., Hetru, C., 1996. Innate immunity in higher insects. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 8-13.
- Imler, J. L., Hoffmann, J. A., 2000. Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 16-22.
- Iwanaga, S., Lee, B. L., 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 128-150.
- Jacot, A., Scheuber, H., Kurtz, J., Brinkhof, M. W. G., 2005. Juvenile immune system activation induces a costly up-regulation of adult immunity in field crickets *Gryllus campestris*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Science*, 272: 63-69.
- Janeway, C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate immunity recognition. *Annual Review of Immunology*, 20: 197-216.
- Jiang, H., Wang, Y., Ma C., Kanost, M. R., 1997. Submit composition of pro-phenoloxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit proPO-P1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 835-850.
- Jiang, H., Wang, Y., Yu, X., Kanost, M. R., 2003. Prophenoloxidase-activating proteinase-2 from hemolymph of *Manduca sexta*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 3552-3561.
- Kawabata, T., Yashuara, Y., Ocha, M., Matsuura, S., Ashida, M., 1995. Molecular cloning of insect prophenoloxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92: 7774-7778.
- Lee, K. P., Simpson, S. J., Wilson, K., 2008. Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Functional Ecology*, 6: 1052-1061.
- Lee, K. Y., Zhang, R., Kim, M. S., Park, J. W., Park, H. Y., Kawabata, S., Lee, B. L., 2002. A zymogen form of masquerade-like serin proteinase homologue is cleaved during pro-phenoloxidase activation by Ca⁺⁺ in coleopteran and *Tenebrio molitor* larvae. *European Journal of Biochemistry*, 269: 4375-4383.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86: 973-983.
- Moret, Y., Schmid-Hempel, P., 2001. Immune defence in bumblebee offspring. *Nature*, 414: 506.
- Nappi, A. J., Christensen, B. M., 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 443-459.
- Park, Y., Kim, Y., Stanley, D., 2011. Cellular immunosenescence in adult male crickets, *Gryllus assimilis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 76: 185-194.
- Rantala, M.J., Kortet, R., 2003. Courtship song and immune function in the field cricket *Gryllus bimaculatus*? *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 503-510.
- Rantala, M.J., Kortet, R., 2004. Male dominance and immunocompetence in a field cricket. *Behavioral Ecology*, 15 (2): 187-191.
- Rantala, M. J., Roff, D. A., 2005. An analysis of trade-offs in immune function, body size and development time in the Mediterranean Field Cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Functional Ecology*, 19: 323-330.
- Rantala, M. J., Roff, D. A., 2006. Analysis of the importance of genotypic variation, metabolic rate, morphology, sex and development time on immune function in the cricket, *Gryllus firmus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 19: 834-843.
- Rolff, J., 2002. Bateman's principle and immunity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Science*, 269: 867-872.
- Schneider, P. M., 1985. Purification and properties of three lysozymes from haemolymph of the cricket, *Gryllus bimaculatus* (De Geer). *Insect Biochemistry*, 15: 463-470.
- Schnitger, A. K., Kafatos, F. C., Osta, M. A., 2007. The melanization reaction is not required for survival of *Anopheles gambiae* mosquitoes after bacterial infections. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 21884-21888.
- Sevgili, H., 2004. Türkiye *Isophya* Brunner von Wattenwyl (Orthoptera: Tettigoniidae: Phaneropterinae) türlerinin revizyonu. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 387 s.
- Silva, C. C. A., 2002. Activation of prophenoloxidase and removal of *Bacillus subtilis* from the hemolymph of *Acheta domesticus* (L.) (Orthoptera: Gryllidae). *Neotropical Entomology*, 31: 487-491.
- Silva, C. C. A., Dunphy, G. B., Rau, M. E., 2000. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria.

- Developmental & Comparative Immunology, 24: 367-379.
- Srygley, R. B., 2012. Age and density-dependent prophylaxis in the migratory, cannibalistic Mormon cricket *Anabrus simplex* (Orthoptera: Tettigoniidae). Environmental Entomology, 41: 166-171.
- Srygley, R. B., Lorch, P. D., Simpson, S. J., Sword, G. A., 2009. Immediate protein dietary effects on movement and the generalised immunocompetence of migrating Mormon crickets *Anabrus simplex* (Orthoptera: Tettigoniidae). Ecological Entomology, 34: 663-668.
- Srygley, R. B., Lorch P. D., 2011. Weakness in the band: nutrient mediated trade-offs between migration and immunity of Mormon crickets. Animal Behavior, 81: 395-400.
- Tang, H., Kambris, Z., Lemaitre, B., Hashimoto, C., 2006. Two proteases defining a melanization cascade in the immune system of *Drosophila*. The Journal of Biological Chemistry, 281: 28097-28104.
- Tregenza, T., Simmons, L. W., Wedell, N., Zuk, M., 2006. Female preference for male courtship song and its role as a signal of immune function and condition. Animal Behavior, 27: 809-818.
- Tsakas, S., Marmaras, V. J., 2010. Insect immunity and its signalling: an overview. Invertebrate Survival Journal, 7: 228-238.
- Tunaz, H., 2004. Böceklerde bağışıklık mekanizması. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 7(2): 78-82.
- Zhao, P., Li, J., Wang, Y., Jiang, H., 2007. Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated in vitro by *Manduca sexta* phenoloxidase. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 37: 952-959.
- Zuk, M., Simmons, L. W., Rotenberry, J. T., Stoer, A. M., 2004. Sex differences in immunity in two species of field crickets. Canadian Journal of Zoology, 82: 627-634.