

T.C.  
ORDU ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Poecilimon (Poecilimon) similis similis* RETOWSKI, 1889  
(ORTHOPTERA: PHANEROPTERINAE) TÜRÜNÜN KIYI VE  
YÜKSEK DAĞ POPÜLASYONLARINDA KUTİKULA  
MELANİZASYONU İLE BAZI İMMÜN SİSTEM  
PARAMETRELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

NİLGÜN TOKGÖZ

YÜKSEK LİSANS

ORDU 2016

## TEZ ONAY

Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Nilgün TOKGÖZ tarafından hazırlanan ve Prof. Dr. Hasan SEVGİLİ danışmanlığında yürütülen “*Poecilimon (Poecilimon) similis similis* Retowski, 1889 (Orthoptera: Phaneropterinae) türünün kıyı ve yüksek dağ popülasyonlarında kutikula melanizasyonu ile bazı immün sistem parametrelerinin karşılaştırılması” adlı bu tez, jürimiz tarafından 25/07/2016 tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Hasan SEVGİLİ

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Evrim SÖNMEZ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan SEVGİLİ

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Pelin TELKOPARAN  
AKILLILAR

İmza :

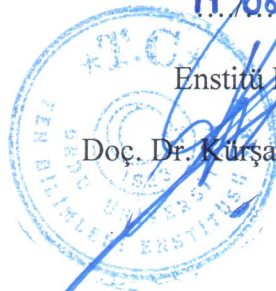
ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 28/07/2016 tarih ve 2016/362 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

11.08.2016

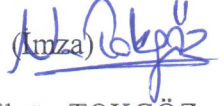
Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Kürşat KORKMAZ



## TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

(İmza) 

Nilgün TOKGÖZ

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

## ÖZET

***Poecilimon (Poecilimon) similis similis* RETOWSKI, 1889 (ORTHOPTERA:  
PHANEROPTERINAE) TÜRÜNÜN KIYI VE YÜKSEK DAĞ  
POPÜLASYONLARINDA KUTİKULA MELANİZASYONU İLE BAZI  
İMMÜN SİSTEM PARAMETRELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Nilgün TOKGÖZ**

Ordu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, 2016

Yüksek Lisans Tezi, 62s.

Danışman: Prof. Dr. Hasan SEVGİLİ

Termal melanizasyona bağlı immün yatırım hipotezi, ektotermik canlılarda vücut ısısının çevre sıcaklığındaki değişimlerden etkilenmesi nedeniyle, daha soğuk çevrede yaşayan popülasyonlarda immün aktivitelerin daha güçlü olduğunu iddia eder. Canlının yaşadığı iklimsel koşullar vücut büyüklüğünü ve kutikular melanizasyonu da etkilemektedir. Daha soğuk çevredeki popülasyonların daha melanik olduğu, melaninin de eklem bacaklıların bağışıklık sisteminde önemli bir bileşen olduğu için, immün aktivitenin çevre sıcaklığından etkilendiği bilinmektedir. Dolayısıyla kutikula rengi ve melanin kökenli bağışıklığın büyük ölçüde çevre sıcaklığının seçilimine uğradığını belirtmek gerekir. Bu çalışmada aynı türün (*Poecilimon (Poecilimon) similis*) farklı sıcaklığa sahip iki farklı alanda yayılış gösteren popülasyonlarında, immün aktivitelerinin, kutikular melanizasyon ve vücut büyüklüklerinin termal çevre farklılıklarına gösterdikleri esnekliğin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, termal melanizasyon hipotezinin öngördüğü şekilde yüksek (soğuk) bölgede yaşayan bireyler alçak (sıcak) bölgede yaşayanlara göre melanin temelli bağışıklık göstergeleri olan PO aktivitesi ve enkapsülasyon yeteneği bakımından daha güçlü bir yanıt oluşturmuştur. Ancak, hipotezin aksine, daha sıcak çevrede yaşayan bireyler soğuk bölgedekilere göre daha koyu bir kutikulaya sahip oldukları bulunmuştur. Humoral immün parametrelerden hemolimfteki protein konsantrasyonu ve lizozim aktivitesi ise farklı termal çevrenin etkisinden bağımsız olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlar, melanin temelli bağışıklığın termal çevre farklılıklarından etkilendiğini, ancak immün aktivitelerin sadece tek bir dış çevredeki değişimle değil, diğer ekeolojik faktörlerin ve fizyolojik süreçlerin de etkisi altında esneklik gösterebileceğine işaret etmektedir. Çünkü, immün aktiviteler ve kutikula renklenmesinin canlıya olan maliyeti yüksek olduğu için, çeşitli ekolojik seçimlere göre fizyolojik aktiviteler arasında bir uzlaşma söz konusu olmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Doğal bağışıklık, Kutikular melanizasyon, Enkapsülasyon, Fenoloksidaz aktivitesi, Litik aktivite, *Poecilimon*

## ABSTRACT

### COMPARISON OF THE BODY MELANISATION AND SOME IMMUNE PARAMETERS IN LOWLAND VS. HIGHLAND POPULATIONS OF *Poecilimon (Poecilimon) similis similis* RETOWSKI, 1889 (ORTHOPTERA: PHANEROPTERINAE)

Nilgün TOKGÖZ

University of Ordu

Institute for Graduate Studies in Science and Technology

Department of Biology, 2016

MSc. Thesis, 62p.

Supervisor: Prof. Dr. Hasan SEVGİLİ

Immune investment hypothesis dependent thermal melanization claims that ectothermic animals due to their body temperature is effected by the changes in environmental temperature, the population which live in colder environment have stronger immune activities. Climate conditions affects the body sizes and cuticle melanization, too. Since population living in colder environment are more melanic and melanin is an important component for immune system of arthropods, it is known that immune activity is effected by environment temperature. Therefore it should be noted that cuticle colour and immune based on melanin highly show selection of environmental temperature. In this study, it is aimed to determine plasticity of thermal environment showed in immune activities, cuticular melanization and body sizes in same species (*Poecilimon (Poecilimon) similis*) from two different population distributed in different areas which have different environment. According to the study's results, as predicted by the thermal melanization hypothesis, individuals living in high (cold) regions has created stronger response compared to living in the low (warm) regions with regard to melanin-based indicators of immune, phenoloxidase activity and encapsulation ability. But contrary to the hypothesis, it has been found that individuals living in the warmer environment has been have more darker cuticle than colder environment. It is understood that haemolymph protein concentration and lysozyme activity from humoral immune parameters are independent from different thermal environment. These results point out that melanin-based immune is affected by environmental changes, but immune activities can show plasticity under the influence of not only a single external environment change, but also other ecological factors and physiological processes. Because the cost of immune activities and cuticle pigmentation is high, for various ecological selections, between the physiological activities a trade-off should happen.

**Key words:** Innate immunity, Cuticular melanization, Encapsulation, Phenoloxidase activity, Lytic activity, bush-cricket, *Poecilimon*

## TEŐEKKÖR

Tez konunun belirlenmesi, çalıőmanın yűrűtűlmesi ve yazım esnasında desteęini esirgemeyen ve deęerli bilgilerini benimle paylaőan danıőman hocam sayın Prof. Dr. Hasan SEVGİLİ, rnek toplama, laboratuvar çalıőması ve tez yazım aőamasında maddi ve manevi desteęini esirgemeyen sayın Gűlőah YILMAZ'a sonsuz teőekkűr ederim.

Aynı zamanda maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve bu gűnlere gelmemi saęlayan canım aileme sonsuz teőekkűrlerimi sunarım.

Bu tez Ordu űniversitesi BAP birimi (TF-1434 nolu proje kapsamında) tarafından desteklenmiőtir.

## İÇİNDEKİLER

|  | Sayfa |
|--|-------|
| <b>TEZ BİLDİRİMİ</b> .....   | I     |
| <b>ÖZET</b> .....  | II    |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | III   |
| <b>TEŞEKKÜR</b> .....  | IV    |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....   | V     |
| <b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....  | VII   |
| <b>ÇİZELGELER LİSTESİ</b> .....  | IX    |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....                                       | X     |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....  | 1     |
| 1.1. Humoral Bağışıklık Aktiviteleri .....                                 | 4     |
| 1.1.1. Melanizasyon ve Fenoloksidaz Aktivitesi .....                       | 4     |
| 1.1.2. Antibakteriyal Lizozim (Litik) Aktivite .....                       | 8     |
| 1.2. Hücresel Bağışıklık .....   | 9     |
| 1.2.1. Enkapsülasyon .....   | 9     |
| 1.3. Hemolimfteki Protein Konsantrasyonu ve Antimikrobiyal Peptidler ..... | 9     |
| 1.4. Çalışmanın Hedefleri .....  | 10    |
| <b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b> .....  | 12    |
| <b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....   | 20    |
| 3.1. Çalışılan Çekirgeye Ait Temel Bilgiler .....                          | 20    |
| 3.1.1. <i>Poecilimon (Poecilimon) similis similis</i> Retowski, 1889 ..... | 20    |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1.2. Türün Yayılışı .....  | 20        |
| 3.2. Arazi Çalışmaları ve Çekirgelerin Bakımı .....  | 21        |
| 3.2.1.Çekirgelerin Laboratuvarda Bakımı .....  | 23        |
| 3.3. Hemolimf Çekimi .....   | 24        |
| 3.4. Enkapsülasyonun Belirlenmesi .....  | 24        |
| 3.5. Fenoloksidaz ve Litik Aktivite Ölçümleri .....  | 26        |
| 3.6. Hemolimfteki Protein Konsantrasyonunun Tespiti .....  | 27        |
| 3.7. Diğer Morfolojik Ölçümler .....   | 27        |
| 3.8. İstatistiksel Analizler .....   | 28        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULAR</b> .....   | <b>30</b> |
| 4.1. Kıyı ve Dağ Popülasyonlarında Humoral ve Hücrel İmmün Aktiviteler.                          | 30        |
| 4.2. Toplam Kutikular Melanizasyon .....   | 37        |
| 4.3. İmmün Parametreler, Kutikular Melanizasyon ve Vücut Büyüklüğü<br>Arasındaki İlişkiler ..... | 40        |
| 4.4. Vücut Ölçümleri ve Kutikular Melanizasyon Arasındaki İlişkiler .....                        | 41        |
| 4.5. Kutikular Melanizasyon ve İki Farklı Populasyondaki Eşeyler<br>Arasındaki İlişkiler .....   | 42        |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....  | <b>44</b> |
| 5.1. Genel Sonuç .....   | 51        |
| <b>6. KAYNAKLAR</b> .....  | <b>53</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....  | <b>61</b> |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

| <u>Sekil No</u>  | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Şekil 1.1. Böcek melanizasyonun biyokimyasal yolağı .....  | 6            |
| Şekil 1.2. Böceklerde immün-melanin ve kütikular-melanin yolağının genel modeli .....                            | 8            |
| Şekil 3.1. <i>P. (Poecilimon) similis similis</i> dişi ve erkek bireyler .....                                   | 21           |
| Şekil 3.2. Ordu ili kıyı ve dağ populasyonlar için örneklem yapılan lokaliteler .....                            | 21           |
| Şekil 3.3. Enkapsüle olmuş naylon filament örneği ve kontrol için kullanılan filament .....                      | 25           |
| Şekil 4.1. Kıyı ve dağ populasyonlardaki toplam PO aktivitesi grafiği .....                                      | 33           |
| Şekil 4.2. Kıyı ve dağ populasyonlardaki dişi ve erkek bireylerin ölçülen PO aktivite sonuçları .....            | 33           |
| Şekil 4.3. Kıyı ve dağ populasyonlardaki toplam LY aktivitesi .....  | 34           |
| Şekil 4.4. Kıyı ve dağ populasyonlarındaki dişi ve erkek bireylerin ölçülen LY aktivite sonuçları .....          | 34           |
| Şekil 4.5. Kıyı ve dağ populasyonlardaki bireylerin hemolimfnde ölçülen protein konsantrasyonu .....             | 35           |
| Şekil 4.6. Kıyı ve dağ populasyonlarındaki farklı eşeylerin hemolimfinden ölçülen protein konsantrasyonu .....   | 35           |
| Şekil 4.7. Kıyı ve dağ populasyonlardaki toplam enkapsülasyon yeteneği .....                                     | 36           |
| Şekil 4.8. Kıyı ve dağ populasyonlarındaki dişi ve erkek bireylerin ölçülen enkapsülasyon yeteneği grafiği ..... | 36           |
| Şekil 4.9. Kıyı ve dağ populasyonları arasındaki kütikular melanizasyonun gösterimi .....                        | 37           |
| Şekil 4.10. Kıyı ve dağ populasyonlarındaki dişi ve erkek bireylerin kütikular                                   |              |

|  |    |
|--|----|
| melanizasyon farklılıkları grafiği .....   | 39 |
| <b>Şekil 4.11.</b> Kıyı ve dağ populasyonlarındaki bireylerin arka femur uzunluğu ile PO aktivitelerinin karşılaştırılması ..... | 41 |
| <b>Şekil 4.12.</b> Kıyı ve dağ populasyonlarında diş ve erkek bireylerin pronotum ve arka femur uzunluğu .....                   | 42 |



## ÇİZELGELER LİSTESİ

| <u>Çizelge No</u>  | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| <b>Çizelge 3.1.</b> Örneklem yapılan lokalitelere yakın bölgelerin yıllık sıcaklık çizelgesi .....   | 22           |
| <b>Çizelge 4.1.</b> Farklı yüksekliğe sahip çevre ve eşeyin bağışıklık ve melanizasyon üzerindeki rolleri.....   | 31           |
| <b>Çizelge 4.2.</b> Kıyı ve dağ popülasyonundaki erkek ve dişiler arasında immün farklılıklar .....  | 32           |
| <b>Çizelge 4.3.</b> Toplam kutikular melanizasyon ile humoral ve hücre sel immün veriler arasındaki ilişkiyi gösteren çizelge .....                        | 38           |
| <b>Çizelge 4.4.</b> Vücut büyüklükleri ile kutikular melanizasyon arasındaki ilişkiler.....  | 42           |
| <b>Çizelge 4.5.</b> Kıyı ve dağ popülasyonundaki erkek ve dişilerin pronotum, abdomen ve arka femur kutikular melanizasyonlarına ilişkin karşılaştırma.... | 43           |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\alpha$ -ct: Alpha Chymotrypsin

ark: Arkadaşları

dk: Dakika

GLM: General Linear Model (Genel Lineer Model)

inç: 2,54 cm uzunluğundaki uzunluk ölçüsü birimidir.

km: Kilometre

log: Logaritma

LY: Litik aktivite

$\mu$ l: Mikrolitre

m: Metre

MANOVA: Multivariate analysis of variance (Çok değişkenli varyans analizi)

Max: Maksimum

Min: Minimum

ml: Mililitre

mm: Milimetre

nm: Nanometre

OD: Ortalama değer

Ort: Ortalama

PBS: Phosphate Buffered Saline (Tuzlu fosfat tamponu)

PCA: Principal Component Analysis (Temel bileşenler analizi)

pH: Power of Hydrogen (Hidrojenin gücü)

PO: Fenoloksidaz

proPO: Profenoloksidaz

$^{\circ}$ C:Celsius

## 1. GİRİŞ

Küresel iklim değişikiminin evrimsel süreci hızlandıracağı ve biyolojik çeşitliliği olumsuz etkileyeceği tahmin edilmektedir. Hızlı habitat kayıpları ve birçok organizmanın ani ekolojik değişimlere ayak uyduramayacağı, yeterli, uygun çevresel ortamların kaybedilmesi nedeniyle yeni adaptasyonların popülasyonda yayılabilmemesinin zorlaşacağı bildirilmektedir (Quintero ve Wiens, 2013). Genetik varyasyonların popülasyondan hızla kaybolması biyoçeşitliliği tehdit eden en önemli unsurlardan birisidir. Özellikle hareket yetenekleri sınırlı, dar yayılışa sahip endemik veya lokal popülasyonların yoğun olduğu bölgeler için daha dramatik senaryolar vardır (Malcolm ve ark., 2006). Kısa mesafelerde parçalı bir yayılışa sahip popülasyonların iklimsel değişimlerden, habitat kayıplarından ve diğer çevresel faktörlerin değişimlerinden daha hızlı etkileneceğini belirtmek gerekir. Bu değişimlerden etkilenecek popülasyonlar ekolojik ve biyolojik ihtiyaçlarını karşılamak için daha uygun habitatlara doğru yayılış alanlarını değiştirecek veya üreme dönemleri gibi yaşam döngülerinin zamanlamasında farklılıklar olabilecektir. Belirli çevresel faktörlere uyum sağlamış aynı türe ait lokal popülasyonların fizyolojik ve davranışsal esnekliklerinin araştırılması, gelecekteki ekolojik değişkenlere popülasyonun verebileceği tepkileri anlamak bakımından önemlidir. Popülasyon üzerinde baskı unsuru olan predator, parazit ve diğer enfeksiyon unsurlarının da bu değişimlerden doğrudan etkileneceğini unutmamak gerekir. Şayet global düzeyde ortalama sıcaklık yükselmeye devam edecek olursa, canlılarda ısı düzenlemesi, enfeksiyon ve ölüm oranları üzerinde önemli rolünün olacağı ve özellikle kritik ekosistem hizmetçilerinin etkinliğini (pollinator böcekler gibi) veya vektörel hastalıkların yayılımını etkileyeceği bildirilmektedir (Harvell ve ark., 2009; Kutch ve ark., 2014). Parazit ve enfeksiyonel unsurlardaki değişime, organizmaların bağışıklık sistemindeki uyumsal potansiyelinin ne şekilde cevap verebileceği, farklı yükseltilerde veya enlemlerde yayılış gösteren popülasyonların fenotipik esnekliğinin öneminin anlaşılmasına yönelik araştırmalar hızla artış göstermektedir ( Fedorka ve ark., 2013a; Fedorka ve ark., 2013b). Diğer taraftan farklı habitatlarda ve iklimsel şartlarda yayılış gösteren popülasyonlarda ortaya çıkan fenotiplerin patojenlere karşı vereceği cevapların farklı olabileceğinin yanısıra, termal düzenleme, vücuttaki renklenme, su kaybına karşı direnç gibi yaşamsal süreci etkileyen önemli faktörler

açısından da belirgin bir fenotipik esnekliğin olduğu bilinmektedir (Parkash ve ark., 2008; Kutch ve ark., 2014).

Bilindiği gibi böcekler ektotermik canlılar olup vücut sıcaklıklarını çevresel sıcaklığa göre düzenlemektedirler. Isı düzenlemesinde güneşlenme önemlidir. Güneşlenmenin etkinliği ile kutikula renklenmesi arasında ilişki olduğu ve daha koyu kutikula açık olanlara göre güneş ısını daha hızlı absorbe ettiği bildirilmektedir (Kingsolver, 1983; Trullas ve ark., 2007; Roulin, 2014). Dolayısıyla daha düşük sıcaklık koşullarında yaşayan popülasyonların daha koyu kutikulaya sahip olacağı iddia edilir (Majerus, 2000; Trullas ve ark., 2007; Trullas ve ark., 2008; Kutch ve ark., 2014). Diğer taraftan, “Gloger kuralı” daha nemli habitatlarda daha koyu bir renklenme olurken daha kuru çevrelerde yaşayan hayvanların daha açık renklere olduğunu iddia eder (Kamilar ve Bradley, 2011; Singaravelan ve ark., 2013). Ancak, termal düzenlemeyle ilişkili olan diğer faktörler iklimsel varyasyonlardan bağımsız olarak kutikula renklenmesini şekillendirebilir. Örneğin, vücut büyüklüğü, gizlenme, gösterişe yönelik renklenme, mimikri, eşeysel seçim gibi faktörler de vücut renklenmesinde etkili olan unsurlardır (Ellers ve Boggs, 2002; True, 2003; Kutch ve ark., 2014). Çevrenin sıcaklık parametrelerinin yanı sıra, besin bulunabilirliği, predator etkisi, popülasyon yoğunluğu gibi faktörler de canlıların renklenme, vücut büyüklüğü, bağışıklık ve gelişim zamanını etkiler (Wilson ve ark., 2001). Böceklerde kutikular melanizasyon çevrenin sıcaklığına göre düzenleniyor/değişiyor ve melanin böcek bağışıklığında çok önemli bir bileşen ise, farklı termal çevrelerdeki popülasyonların melanin temelli bağışıklıkları ile ilişkili aktivitelerinde de farklılık beklenir (Fedorka ve ark., 2013b; Fedorka ve ark., 2013a; Kutch ve ark., 2014; Fedorka ve ark., 2015). Çünkü, böcek kutikulasında, fenoloksidaz enzimi (PO) L-Dopa'nın (veya dopamin) melanine dönüşümünü başlatır (True, 2003). Kutikulayı daha melanik yapan aynı PO yolağı hemosöl içerisindeki patojenlere karşı vücudun savunulmasında iş gören güçlü antibiyotik özellikler gösteren kinon ara ürünleri üretmektedir (Soderhall ve Cerenius, 1998; Cerenius ve Soderhall, 2004; Liu ve ark., 2007). Termal düzenlemeye bağlı melanizasyon ile immün aktiviteler arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda çalışma vardır (Örnek: Cotter ve ark., 2008; Catalan ve ark., 2012; Kutch ve ark., 2014). Aynı türe ait farklı iklimsel çevrede yayılım gösteren popülasyonlarda görülen fenotipik esnekliklerdeki varyasyon organizmanın yaşadığı

çevreye olan uyum gücüyle yakından ilişkilidir. Örneğin, dağlık ve yüksek alanlarda yayılış gösteren daha koyu renklenmeye sahip böceklerin alçak alanlardaki populasyonlara göre daha yüksek su kaybetme riski ile karşı karşıya kaldığı ve kutikular su kaybetme oranının melanik formlarda açıklara göre daha düşük oranda olduğu bildirilmiştir (Parkash ve ark., 2008; King ve Sinclair, 2015). *Allonemobius socius*'un (Orthoptera: Gryllidae) daha sıcak bölgelerdeki populasyonlarının daha açık kutikulaya ve dolayısıyla daha zayıf melanin temelli bağışıklığa sahip olduğu saptanmıştır (Fedorka ve ark., 2013a). Ancak, bu ve benzeri bulguların aksine, *Saccharosydne procerus* (Hemiptera: Delphacidae) türünde (termal melanin hipotezinin aksine), daha sıcak ortamda yayılış gösteren populasyonların daha melanik oldukları ve daha güçlü immün aktiviteye sahip oldukları da bilinmektedir (Yin ve ark., 2015).

Endotermik hayvanların önemli bir kısmında daha kuzey ve soğuk bölgelerdeki bireylerin daha büyük vücut ölçülerine sahip olmalarına yönelik kabul (Bergmann Kuralı), böcekler için tam tersi bir model gösterebilir (Blanckenhorn ve Demont, 2004; Eweleit ve Reinhold, 2014). Dolayısıyla bireyin renklenmesi, bağışıklık sistemi veya vücut büyüklüğü türler arasında değişebilmekte ve benzer gelişimsel/biyokimyasal süreçler üzerinde genetik ve çevresel etkiler farklı olabilmektedir. Aynı türe ait termal olarak farklı yükseltilerde yayılış gösteren populasyonlar arasında immün aktiviteler, vücut renklenmesi ve vücut büyüklüğü gibi parametrelerin araştırılması, farklı ekolojik faktörler etkisindeki özelliklerin nasıl seçilime uğradığını anlamak açısından oldukça önemlidir. Kısa mesafedeki yükseklik farklılıklarının (çevresel faktörlerin yakın mesafedeki hızlı değişimi) hareket yeteneği sınırlı ve dar yayılış alanına sahip populasyonlarda immün aktivitelerdeki etkilerinin araştırılması, ilgili özellikler açısından lokal şartlara uyumda, populasyondaki esnekliği anlamak açısından iyi bir fırsat olacağı düşünülmektedir.

Kutikular melanizasyonun güçlü bir termal seçim altında melanin temelli bağışıklık ile genetik olarak ilişkili olması, termal düzenlemeye ilişkin stratejinin böceklerdeki immün savunmanın şekillenmesinde dolaylı olarak etki yapacağına işaret eder. Bu çalışmada aynı türe ait farklı termal ve ekolojik faktörlerin etkisi altında olan kıyı ve dağ populasyonundaki humoral ve hücrel immün aktivitelerde, kutikula

melanizasyonunda ve vücut büyüğündeki farklılıkların araştırılması hedeflenmiştir. Çünkü, dış ekolojik şartların değışmesi sıcaklığa bağı enzimatik reaksiyonlar gibi, canlının biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerini de etkileyecektir (Moczek, 2010). Daha yüksekte yayılış gösteren populasyonun daha melanik ve daha güçlü bağışıklığa sahip olacağı düşünölmüştür. Diğer taraftan eşeyler arasında bağışıklık, melanizasyon ve vücut büyüğünün farklı ekolojik koşullarda nasıl şekillendiğı merak edilen diğeri bir sorudur. Çünkü immün yeterlilik açısından eşeyler arasında fark olduğı, ve genel olarak dişilerin bağışıklık sisteminin daha güçlü olduğı belirtilmektedir (Rolff, 2002; Nunn ve ark., 2009).

## **1.1. Humoral Bağışıklık Aktiviteleri**

### **1.1.1.Melanizasyon ve Fenoloksidaz Aktivitesi**

Böcek kutikulası melanin kökenli renklenmenin derecesine göre türler arasında önemli ölçüde çeşitlilik göstermektedir. Örneğın, böcek gruplarından açık bronz rengi kutikulaya sahip termitler olduğı gibi koyu siyah renkli kınkanatlılar da çok yaygındır. Yine güvelerde melaninler en yaygın renk pigmentleri olup, beyazdan açık-koyu kahverengiye veya siyaha kadar değışebilen çeşitlilikte bir renklenmenin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Ethier ve Despland, 2012). Bireyler melanin sentezleyip kutikularında depo ederek daha koyu renklere bürünürler ve bu bireyler “melanik“ olarak adlandırılır (Örnek: Şekil 1.1) (True, 2003).

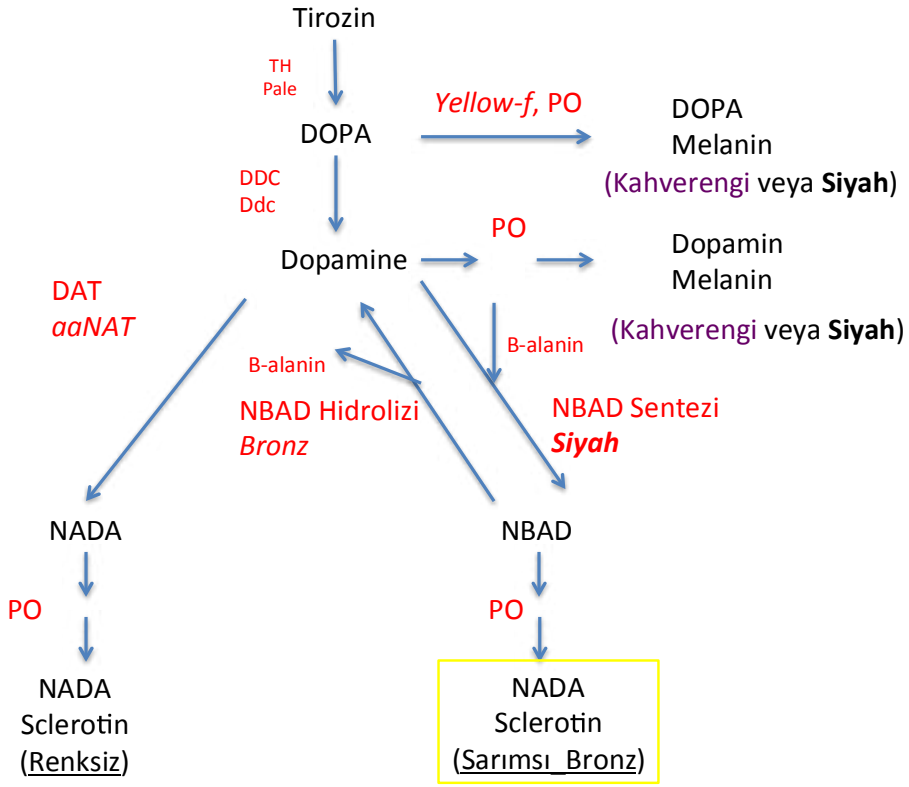
Melanizasyon çok farklı hayvan gruplarında oldukça yaygın olmasına rağmen, böceklerdeki melanizm renklenmenin hücrenel ve gelişimsel olarak farklılıklar göstermesi nedeniyle omurgalılardakine benzemez (Majerus ve Mundy, 2003; True, 2003; Trullas ve ark., 2007). Özellikle böcekler içerisinde güveler ve kınkanatlılarda melanizasyon örnekleri çoktur. Ancak bazı böcek türlerinde melanizasyona birçok farklı ekolojik ve fizyolojik faktörün etki ettiğı True (2003), tarafından özetlenmiştir. Örneğın, Hanım böceğı (*Adalia bipunctata*) termal düzenleme (De Jong ve ark., 1996), mimikri (Brakefield, 1985) ve eşeyssel seçilim (Majerus ve ark., 1982) gibi farklı seçilimlerin bir sonucu olarak farklı renk morflarına sahiptir. Çünkü çevresel ısı değışimleri organizmaların içsel düzenlemelerini ve termal baskılar ısı düzenleme mekanizmalarının fizyolojisini etkiler. Örneğın, sıcaklığa bağı olarak bireylerin bakteri gibi çeşitli enfeksiyon ajanlarına maruz kalma durumları değışebilir (Catalán



ve ark., 2012). Ektotermik canlılarda vücut ısısı çevre sıcaklığındaki dalgalanmalardan etkilenir. Bu nedenle canlının yaşadığı iklimsel koşullar patojen-konakçı ilişkisini doğrudan etkiler, çünkü çevre sıcaklığı değişimleri immün sistem tepkisini değiştirir ve bunun da optimal fizyolojik performans bağlamında canlıya bir maliyeti söz konusudur (Catalán ve ark., 2012). Örneğin uyumsal esneklik nedeniyle soğuk bölgelerde erginleşme süreci ertelenerek maliyet düşürülme yoluna gidilir (Örnek: Angilletta ve ark., 2004).

Arthropodlardaki doğal bağışıklık sistemi humoral ve hücrel tepkilerden oluşmaktadır. Humoral savunmalar antimikrobiyal peptidleri, koagülasyonu düzenleyen yolaklar ve hemolimfin melanizasyonu şeklinde özetlenebilir. Hücrel tepkiler ise hemosit aracılığıyla oluşan fagositozis, nodulasyon ve enkapsülasyondan ibarettir (Lavineve Strand, 2002; Tsakas ve Marmaras, 2010). Melanizasyon ile böcek immün sistemi arasındaki bağlantı son yıllarda yoğun bir şekilde çalışılmaktadır (Örnek: deneysel-Wilson ve ark., 2001; derleme- Rolffve Siva-Jothy, 2003; Cotter ve ark., 2008; Bailey, 2011; Fedorka ve ark., 2013a).

Bu bağlamda “termal melanin hipotezi” düşük sıcaklık şartlarında koyu renkli bireylerin açık renkli bireyler ile karşılaştırıldığında daha hızlı ısınma avantajına işaret etmektedir (Gross ve ark., 2004; Trullas ve ark., 2007). Bu durum yüksek rakımlardaki habitatlarda ve soğuk bölgelerde yaşayan türler için bir avantaj oluşturmaktadır. Termal melanin hipotezinin ana tahminlerinden biri: yansıma çevresel sıcaklık ve güneş ışınlarıyla pozitif ilişkili olmalıdır (Harris ve ark., 2013). Örneğin, kelebeklerde kanat melanizmi soğuk hava şartlarında daha hızlı ve uzun mesafe uçuş arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (*Danaus plexippus*, Hanley ve ark., 2013). Diğer taraftan koyu renkli hanım böcekleri daha yüksek üreme başarısına sahip olduğu gibi baharda yumurtadan ilk çıkan bireylerdir (Brakefield ve Willmer, 1985). Diğer taraftan hipotez ektotermik bireylerin soğuk bölgelerde daha koyu renklerde olmalarının yanında daha iri olduklarına da vurgu yapmaktadır (Fedorka ve ark., 2013a).



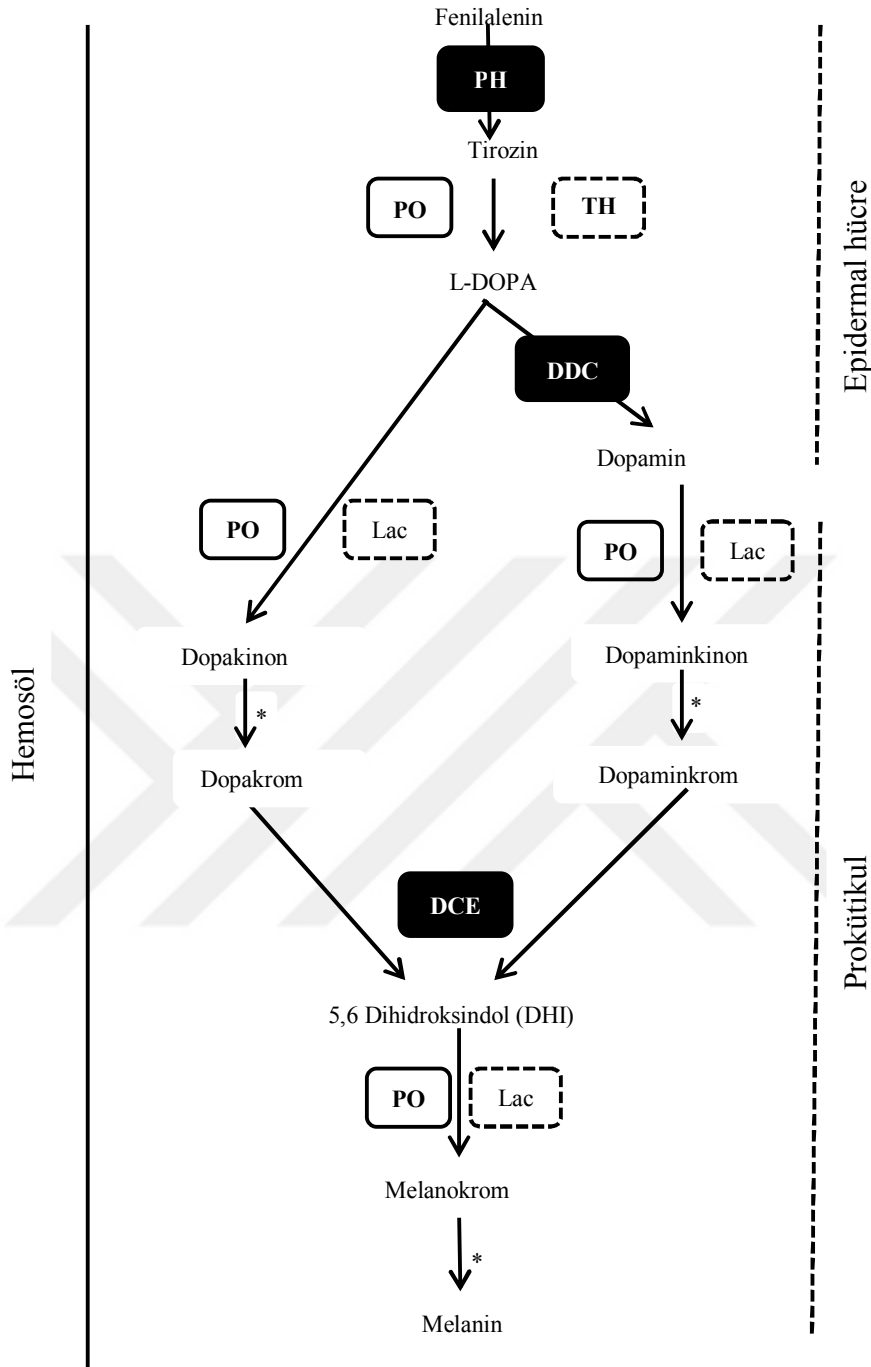
**Şekil 1.1.** Böcek melanizasyonun biyokimyasal yolağı (Kırmızılar enzimlere işaret etmektedir; detaylar için bkz. True, 2003).

Yukarıda da belirtildiği gibi koyu kutikula renginin oluşmasına neden olan melanin aynı zamanda eklem bacaklıların immün sistemi için de hayati öneme sahiptir (Wilson ve ark., 2001). Birçok böcek grubunda koyu kutikula ile popülasyonlardaki melanin kaynaklı immün sistem pozitif bir ilişki göstermektedir (Barnes ve Siva-Jothy, 2000; Wilson ve ark., 2002). Dolayısıyla böceklerdeki demografik yapı ve çevresel faktörler immün sistemi şekillendirmektedir (Rolff ve Siva-Jothy, 2003). Melaninin böceklerde patojene karşı direnç bağlamında iki yönlü rolü vardır: ilki, patojenlerin işgaline karşı kutikulada fizikokimyasal bir bariyer olarak ve ikincisi, böcek vücudu içerisine girmiş işgalcilerin etrafında birikerek hareketsiz hale getirmektedir (Prokkola ve ark., 2013).

Böceklerde patojenlere karşı savunmada ve yaraların iyileşmesinde iş gören enzim yollarından birisi hemolimfin melanizasyonudur (Cerenius ve Söderhall, 2004; Mavrouli ve ark., 2005; Beckage, 2008; Cerenius ve ark., 2008). Böcek kutikulasında, fenoloksidaz enzimi (PO) L-Dopa ve/veya dopaminin melanine

dönüşmesine öncülük etmekte ve sonuçta kutikula da koyulaşmaktadır (True, 2003). Özetle, melanizasyon tirozin metabolizmasına bağlıdır. Tirozin fenoloksidaz (PO) ile aktive edilerek dopaya dönüşmektedir. Dopakinon bir seri basamaktan sonra melanine dönüşür (Şekil 1.2) (True, 2003 ve detaylar için bkz. Cerenius ve Söderhall, 2004; Van't Hoff ve Saccheri, 2010). Dopamin ve fenoloksidaz kutikula renklenmesi ve humoral bağışıklık sisteminde birlikte rol oynarlar. PO enzimlerinin doğal bağışıklıktaki rollerine ek olarak birçok dokunun pigmentasyon ve skleritizasyonundan da sorumludur. Bu enzimin aktivasyonu bir seri olaylar ile düzenlenmekte olup, bazı mikrobiyal ürünlerin varlığında aktifleşen proteinaz, mikroorganizmalarla ilişkili diğer bileşikler ve polisakkaritlere bağlanabilen proteinleri içeren proPO aktivasyon sistemiyle ortaya çıkar. Bu sistem  $\beta$ -1,3-glukan lipopolisakkaridler, peptidoglikanları bağlayan kalıp-tanım proteinleri veya doku yaralanmaları üzerinden üretilen içsel faktörler gibi diğer bileşikler tarafından aktive edilir (Cerenius ve Söderhall, 2004; Nappi ve Christensen, 2005; Kanost ve Gorman, 2008). Son yıllarda yapılan araştırmalar profenoloksidaz (proPO) sisteminin zimojenik serin proteinazlar, serin protein homologları ve patojen tanıma proteinleri tarafından düzenlendiğini ortaya koymuştur (Cerenius ve ark., 2008; An ve ark., 2013). Melanizasyon süreci PAMPs yokluğunda da başlatılabilmektedir (Örnek: *Drosophila*, Brennan ve Anderson, 2004). proPO aktivasyon yolağı memelilerde olmamasına rağmen bu yolak insanlardaki diğer proteaz yolaklarına analogtur (kan pıhtılaşması gibi) (An ve ark., 2013). Arthropodlardaki PO gen sayısı çalışılan türlerde oldukça farklılık göstermektedir (Örnek: *Aedes aegypti* 10, Balarısı 1 gen taşır) (Cerenius ve ark., 2008). PO'lar eklembacaklılarda birincil olarak özel hemositler (Kristal hücreleri gibi Rizkive ark., 1985) ve oenositoidler (böcek kan hücresinin bir tipi) (Shrestha ve Kim, 2008) tarafından üretilmektedir.

Son yıllarda yapılan araştırmalar PO'nun hücrel savunma reaksiyonlarına (Örnek: fagositozis) ve plazma koagülasyonunun etkinliğinin artırılmasına da öncülük ettiğini desteklemektedir. Ancak, melanizasyon bir patojene karşı daha yavaş işleyen hücrel savunma (Örnek: enkapsülasyon) ve antimikrobiyal peptidlerin sentezinden daha hızlı ve erken oluşturulan bir tepkidir (Cerenius ve ark., 2008).



**Şekil 1.2.** Böceklerde immün-melanin ve kütikular-melanin yolağının genel modeli (Kutch ve ark., 2014).

### 1.1.2. Antibakteriyel Lizozim (Litik) Aktivite

Patojenlere karşı omurgasızlardaki en önemli humoral savunma mekanizmalarından birisi de lizozim benzeri aktivitelerdir. Bu enzimler bakteri hücre duvarındaki peptidoglikanları hidrolize ederler (Anderson ve Cook, 1979). Hemolimfteki fenoloksidaz aktivitesiyle birlikte litik aktivitenin ölçülmesi organizmanın hastalığa

karşı direncini anlamakta kullanılan bir yöntemdir (Adamo, 2004). Her iki system de böceklerin bağışıklığındaki en önemli savunma aracıdır (Schneider, 1985; Rowley ve ark., 1990). Litik enzim daha çok gram pozitif bakterinin hücre duvarındaki N-asetilglukozamin (GlcNAc) ve N-asetilmuramikasit (MurNAc) arasındaki  $\beta$ -1,4-glikozidik bağı hidrolize eder (Schneider, 1985; Vocadlo ve ark., 2001). Bu enzimlerin varlığı hem hemimetabol hem de holometabol böceklerde bulunduğu gibi omurgalılarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda da saptanmıştır.

## **1.2. Hücresel Bağışıklık**

### **1.2.1. Enkapsülasyon**

Hücresel tepkilerden birisi olan enkapsülasyon parazitoidler ve nematodlar gibi büyük hedeflere hemositlerin bağlanmasına işaret etmektedir. Çalışılan farklı böcek gruplarında granüler hücreler, plasmatositler (Lepidoptera) ve lamellositler (*Drosophila*, Diptera) gibi farklı hemosit tipleri kapsül oluşturmaktadır (Vass ve Napi, 2000). Vücuda giren yabancı hedef tanınır tanınmaz açık dolaşımda hareket eden hemositler yapışıcı olmayan moddan yapışıcı duruma geçerek kapsül oluşumunu başlatırlar (Lavine ve Strand, 2002). Enkapsülasyon mekanizması bu şekilde çalışarak patojeni hemolimfte izole bırakır veya etkisiz hale getirir ve omurgasızlardaki en önemli doğal bağışıklık mekanizmalarından biridir (Gillespie ve ark., 1997; Rantala ve ark., 2000; Smilanich ve ark., 2009; Mikkola ve Rantala, 2010).

### **1.3. Hemolimftteki Protein Konsantrasyonu ve Antimikrobiyal Peptidler**

Hemolimftteki protein konsantrasyonunun daha yüksek olduğu *Gryllus texensis* (Orthoptera: Gryllidae) bireylerinde bakteriyal patojenlere karşı dirençliliğin arttığı ve hayatta kalma oranının yükseldiği bildirilmiştir (Adamo, 2004). Litik aktivite ve toplam PO aktivitesi ile hemolimftteki protein konsantrasyonunun pozitif ilişki göstermesi, hemolimftteki protein miktarının hastalıklara karşı dirençte önemli bir ölçüt olduğunu ortaya koymaktadır (Adamo, 2004). Ancak, hemolimftteki pek çok proteinin bağışıklıkla ilişkili olmadığı da vurgulanmıştır (Romoser ve Stoffolano, 1998). Bağışıklıkla ilgili protein ve peptidler diğer ökaryotlarda olduğu gibi omurgasız savunma sisteminin de önemli elemanlarıdır (Kanost ve ark., 2004).

Büyük antimikrobiyal proteinler sıklıkla litik veya özel olarak mikrobiyal makromolekülleri hedef alırken, küçük antimikrobiyal peptidler mikrobiyal hücre membranının fonksiyon ve yapısını bozarak iş görür (Fredrick ve Ravichandran, 2012). Antimikrobiyal peptidler kutikuladaki yaralanma ve enfeksiyonlara karşı da etkilidir. Bazı Crustaceae türlerinde, hemolimftteki antimikrobiyal peptidlerin bir özeti Fredrick and Ravichandran (2012) tarafından sunulmuştur. Böceklerdeki antimikrobiyal peptidlerle ilgili geniş bilgi için Bulet ve ark. (1999)'nın yaptığı derlemeye bakılabilir. İndüklenebilir antimikrobiyal peptid sistemi fagositoz ve melanizasyon gibi immün savunma sistemlerinin temizleyemediği daha dirençli kalıntı mikropların uzaklaştırılmasında rol aldığına ilişkin önemli detaylar da vardır (Schneider ve Chambers, 2008). Bu çalışmada hemolimftteki toplam protein konsantrasyonu ele alınacağı için ölçülen protein miktarı ile spesifik peptidlerin etkinliği üzerine herhangi bir veri alınamayacaktır. Ancak, hemolimftteki protein konsantrasyonu ile bağışıklık arasındaki ilişki birçok omurgasızda ortaya konulmuştur (Örnek: Adamo, 2004; Kanost ve ark., 2004; Fedorka ve ark., 2013b).

#### **1.4. Çalışmanın Hedefleri**

Termal melanizasyonla immün tepkiler arasındaki ilişkinin ekolojik ve evrimsel nedenleri üzerine yapılmış birçok çalışma vardır (Cerenius ve Soderhall, 2004; Fedorka ve ark., 2013b). Ancak kısa mesafelerde immün tepkilerin esnekliği üzerine yapılmış çalışmalar çok azdır. Diğer taraftan, Türkiye'de yayılış gösteren omurgasız grupları üzerinde eko-immünojenik bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tez çalışmasında Karadeniz Bölgesinde yayılışı olan çalı çekirgesi *Poecilimon (Poecilimon) similis similis* Retowski 1889'in (Orthoptera: Phaneropterinae) kıyusal bölge ve yüksek dağ popülasyonları arasındaki bazı immün sistem parametrelerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Planlanan çalışmanın hipotezine göre; *P. similis*'in soğuk ve yüksek rakımlarda yayılış gösteren popülasyonlarında kıyusal bölgelerde yaşayanlarına göre kutikula melanizasyonunun (daha koyu) ve enkapsülasyon yeteneğinin daha yüksek olacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca her iki popülasyon için erkek ve dişiler arasında fenoloksidaz ve litik aktivite ile enkapsülasyon yetenekleri bakımından farklılık olacağı düşünülmektedir. Çünkü doğada, coğrafik olarak ayrılmış popülasyonlar farklı ekolojik şartlarda ve seçim baskısı altında patojenlere direnç ile ilgili genler bakımından varyasyon gösterirler (Brown, 2003). Daha soğuk

çevrelerde yaşayan aynı türe ait popülasyonların sıcak bölgelerde yaşayanlarına göre immün tepkilerinin bir kısmının daha yüksek olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Örnek: Fedorka et al. 2013b; Kutch et al. 2014). Ancak yüksek sıcaklıklarda fenoloksidaz ve lizozim benzeri enzim aktivitelerinin (Adamo ve Lovett, 2011; Fuller ve ark., 2011) ve aynı zamanda hemosit sayısının ve hemolimfdeki protein düzeyinin (Quedraogo ve ark., 2003) arttığı da tespit edilmiştir. Termal melanin hipotezinin aksine daha sıcak çevrede daha koyu renklenmeye sahip ve daha yüksek fenoloksidaz aktivitesi gösteren çalışma sonuçlarını da burada belirtmek gerekir (Örnek: Yin ve ark., 2015).

Bazı tür-patojen ilişkilerinde, artan sıcaklıklarda üreme ve hastalığa direnç maliyeti arasında bir uzlaşma olduğu da bildirilmiştir (Adamo ve Lovett, 2011). Yani, yüksek sıcaklıklarda böcekler üreme oranlarını arttırmaları, fakat üremenin maliyeti nedeniyle hastalıklara karşı direnç mekanizmaları daha zayıf olacağından yaşam uzunlukları azalır ve uyum güçleri düşer. Bu bağlamda, *P. similis* popülasyonunun düşük rakımlarda (daha sıcak) ve yüksek rakımlarda (daha soğuk) yayılış gösteren popülasyonları arasındaki bazı immün sistem parametrelerinin ortaya konması farklı iklim şartlarında üreyen popülasyonların immün tepkilerine ilişkin önemli ipuçları verecektir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Omurgasızlarda, doğal olarak var olan savunma sistemi patojen ve hasarlı dokuların melanizasyonu ile ilgili olup bu etkili yöntem son derece zehirli ve reaktif bileşiklerin gereksiz üretiminden kaçınmak için düzenlenen fenoloksidaz enzimi tarafından kontrol edilmektedir (Cerenius ve Söderhall, 2004). Melanizmin ısı düzenlemesinde rol oynayıp oynamadığı ektodermlerin termal ısı düzenlemeleri ile ilgili çalışmalarda sıkça sorulmaktadır (True, 2003; Trullas ve ark., 2007)

Omurgasızların bağışıklık sisteminin tarihsel sürecine bakacak olursak ilk önemli çalışmalardan biri 1884 yılında Rus bilim insanı Elie Metchnikoff yapmıştır. Gordon (2008), yaptığı bir derlemede E. Metchnikoff'u doğal bağışıklığın babası olarak nitelendirmiştir. E. Metchnikoff yaptığı çalışmalar neticesinde fagositoz adını verdiği bir bağışıklık mekanizmasını keşfetmiş ve aynı zamanda bu keşfi ona (1908) Nobel Tıp Ödülü'nü de kazandırmıştır. İlk kez çekirgelerde bağışıklık sisteminin bulunduğunu Rudolf W. Glaser ortaya çıkarmıştır. Ancak gerçek anlamda geniş kapsamlı bir çalışma Hans Boman grubu tarafından Stockholm Üniversitesi'nde başlamıştır.

Birçok makalede yer aldığı şekliyle doğuştan gelen bağışıklık mekanizmaları şu şekilde gruplandırılmıştır (Örnek: Hoffmann, 1995; Söderhall ve Cerenius, 1998; Tsakas ve Marmaras, 2010). 1. Humoral Yanıtlar (Antimikrobiyal peptitler ve Enzimatik kaskadlar): Böcek hemolimfinde bakteri, mantar ve hatta virüsler gibi istilacı organizma olan patojenleri tanıma, yeni antimikrobiyal peptit sentezi ve salgılaması şeklinde olan immün yanıtlardır ve orta bağırsak, hemolimf, tükürük bezleri ve kütikula gibi canlının farklı vücut bölgelerinde görülebilir. 2. Hücresel Yanıtlar (Fagositoz, Nodülasyon, Enkapsülasyon): Böcek hemolimfinde yer alan hemosit hücrelerinin konakçı vücuduna giren patojenlere karşı bir takım maddelerle ortak çalışarak immün savunma oluşturmalarıdır (Tsakas ve Marmaras, 2010).

Melanizasyon mekanizmasına ilişkin olarak birçok böcek türünde çalışmalar yapılmıştır (Örnek: *Bombyx mori*, Satoh ve ark., 1999; *Menduca sexta*, Gorman ve ark., 2007; *Tenebrio molitor*, Kan ve ark., 2008; Clark ve Strand, 2013; *Harmonia axyridis*, Purse ve ark., 2015). Birçok çalışmada enkapsülasyon ile kutikula renklenmesi arasında pozitif ilişkiler saptanmıştır (Örnek: Bailey, 2011; Fedorka ve



ark., 2013a). Bailey (2011), kahverengi Mormon çekirgelerinin (*Anabrus simplex*) yeşil olanlarına göre enkapsülasyon yeteneğinin daha yüksek olduğunu bildirmektedir. Fakat çalı çekirgesi *Metrioptera roeseli* (Ortoptera) türünde yeşil ve kahverengi morflar arasında enkapsülasyon kabiliyeti bakımından bir fark bulunamamıştır (Berggren, 2010). Ancak bu çalışmada kullanılan materyal farklı popülasyonlardan elde edilmiş olsa da farklı yükseltelerden toplanmamıştır. Barnes ve Siva-Jothy (2000), un kurdunda kütikular melanizasyon ile PO aktivitesi arasında önemli bir ilişki bulamamalarına rağmen, entomopatojenik fungus *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales) türüne karşı direnç ile kütikular melanizasyon arasında önemli bir pozitif ilişki saptamışlardır. Endüstriyel melanizme örnek olarak gösterilen güve türlerinden *Lymantria monacha* (Lepidoptera)'da kanat melanizasyonu ile enkapsülasyon tepkisi arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır (Mikkola ve Rantala, 2010).

*Spodoptera littoralis* (Lepidoptera) üzerinde yapılan bir çalışmada yaşam uzunluğu boyunca immün fonksiyonların ve kütikular melanizm için seçimde bir uzlaşımın söz konusu olduğu ileri sürülmüş ve bu bağlamda yapılan çalışma sonucunda melanik bireyler açık kütikulu bireylere göre düşük bir PO aktivitesi gösterirken bunun aksine daha yüksek bir litik aktivitesine sahiptir. Bu veriler de iki immün parametre arasında bir uzlaşım olduğunu onaylamaktadır. Bu durum da melanizm ve PO aktivitesi arasında genetik bir uzlaşım olduğunu söylemek mümkündür (Cotter ve ark., 2008).

Amerika'da yayılış gösteren çekirge türü *Allonemobius socius*'un (Gryllidae) Kuzey-Güney enlemlere göre 9 farklı popülasyonu üzerinde yapılan çalışmada kısa sezon uzunluğuna sahip (soğuk) popülasyonların daha büyük fenoloksidaz aktivitesine sahip oldukları (melanin kökenli immün sistem açısından) ve her iki eşey açısından daha koyu bir kutikula renginin yaygın olduğu saptanmıştır (Fedorka ve ark., 2013a). Bu model doğrudan kutikula rengi üzerine termal bir seçiliminin olduğuna ve dolaylı olarak da melanin kökenli immün sistem seçilimine işaret eder (pleiotropi nedeniyle). Bu çalışma aynı zamanda "sıcaklığa bağlı immün yatırım hipotezini" desteklemektedir. Kuzey-Güney doğrultusunda geniş yayılışı olan *A. socius* türüne (Orthoptera: Gryllidae) ait popülasyonlarla ilgili yapılan bir başka çalışmada termal çevrenin hem sezon hem de coğrafi olarak değiştiğine vurgu yapılarak

populasyonlardaki melanin yatırımının oldukça geniş bir esnekliğe sahip olduğu bildirilmektedir (Fedorka ve ark., 2013b). Soğuk sonbaharı temsil eden bir çevrede yaşayan *A. socius* bireylerinin daha koyu renklerde olduğu, daha fazla fenoloksidaz aktivitesi gösterdikleri ve bakteriye karşı daha yüksek dirence sahip oldukları saptanmıştır. Ancak LY yaz populasyonlarına oranla daha zayıf olarak tespit edilmiştir (Fedorka ve ark., 2013b). Bunun nedeni birçok farklı modeldeki durumlara analogi olarak melanin kökenli yatırımın potansiyel maliyetiyle ilgili uzlaşmadan kaynaklanmaktadır. Doğal bağışıklık sisteminde erkek ve dişiler arasında immün savunma ve kütikula melanizmi arasında farklılıklar olabilmektedir. Örneğin, un Kurdu *Tenebrio molitor* (Coleoptera) türünde dişiler erkeklerden daha güçlü bir savunmaya ve koyu kutikulaya sahiptir (Prokkola ve ark., 2013).

Parkhas ve arkadaşları (2008) *Drosophila melanogaster* (Diptera) türünde yüksek ve alçak populasyonlardan toplanan bireylerde melanizasyon ve su tutma kapasitesi (desikasyon direnci) arasındaki ilişki incelenmiş ve elde ettikleri verilere göre koyu kutikulaya sahip bireyler açık renkli bireylere göre önemli ölçüde daha yüksek desikasyon direnci göstermiştir. Bu veriler de gösteriyor ki kütikula melanizasyonu farklı fizyolojik özellikler ile ilişkili olabilir ve hatta bir uzlaşma içinde olabilir (Parkhas ve ark., 2008).

*Drosophila melanogaster* türünün iki ayrı populasyonunda yapılan başka bir çalışmada ise sıcaklık, termoregülasyon ve immün yatırım arasındaki ilişki incelenmiş ve çevre sıcaklığı artırıldığında immün savunma sisteminde değişim görülmüştür. Sıcaklık artışının yükseltilmesi ile immün savunma sisteminde ve metabolik oranda bir düşüş gözlenmiştir. Patojen savunması ılık bir iklimde gelişirken sıcaklık artışı ile termoregülasyon stratejisini kütikulada daha az melanin birikmesi ile bir uzlaşma sağlanmıştır. Araştırmacılar da türün bazı fizyolojik parametreleri üzerinde çevre sıcaklığının etkili olduğunu bildirmiştir (Kutch ve ark., 2014).

Küresel ısınma hem ortalama sıcaklığı hem de ısı dalgalarının frekans ve şiddetinin artışına neden olmaktadır (Stone ve ark., 2010). Küresel iklim değişikliklerinin kısa-yaşamlı böcek gibi hayvan gruplarında nasıl bir etkiye neden olabileceğine ilişkin çalışmalar son yıllarda hızla yaygınlaşmaktadır. Örneğin, artan sıcaklık bireylerdeki enzimatik reaksiyonların oranını arttıracaktır (Angilletta ve ark., 2010), ancak

özellikle ektotermlerde sıcaklığın enzimatik yollar üzerindeki etkilerini tahmin etmek güçtür (Chau-Berlinck ve ark., 2004). Bu bağlamda *Gryllus texensis* (Orthoptera) türünün neden düşük sıcaklıkları tercih ettiğiyle ilgili olarak yapılan çalışmada; yüksek sıcaklıklarda artan immün sistem aktiviteleriyle maksimum üreme çıktıları arasındaki maliyet uzlaşısının tercihte etkili olduğu bildirilmiştir (Adamo ve Lovett, 2011). Yin ve arkadaşlarının (2015) yayınladıkları bir çalışmada yetişkin *Saccharosydne procerus* (Hemiptera) bireylerinde renk morfolojisinde ortaya çıkan sıcaklığa bağlı çeşitlilikler üzerinde bir araştırma yapılmış ve çevresel sıcaklık ile melanizm ve PO aktivitesi arasındaki bağ incelenmiştir. Elde ettikleri sonuçlar; farklı sıcaklıklar altında oluşan melanik değişiklikler ve melanizm oluşumu bu tür için termal melanin hipotezinde bilinen kalıpların tam tersi bir sonuç sunmuştur. Termal melanin hipotezi oldukça bilinen ve kabul edilen şekliyle; soğuk çevrede bireyin ısınmak için daha çok ısı absorbe etmesi ile bireyin daha melanik olacağını ileri süren bir hipotezdir (Cerenius ve Soderhall, 2004). Fakat termal melanin hipotezi melanikleşmenin sebebinin sadece tek yönlü açıklayamaz, çünkü melanizasyon mekanizması böcek bağışıklığında oldukça karmaşık bir yoldur. Yin ve arkadaşlarının (2015) bulgularına göre melanizm için evrensel bir genelleme yapılamayacağı ve vücut rengi evrimini birçok ekolojik faktörün tetikleyebileceği söylenebilir.

*A. socius* (Gryllidae) türünde sperm transferi dışının immün fonksiyonunu azaltıcı yönde etki yaptığı ve bunun da dişi için bir üreme yatırımının başlangıç sinyali olarak iş gördüğü bildirilmiştir (Fedorka ve Sevgili, 2014). Çünkü, üreme aktivitesi zaman, enerji ve kaynaklar açısından dişi için en maliyetli olanıdır (Harshman ve Zera, 2007). Bu nedenle erkek bireyler de eş seçiminde sağlıklı bireyleri tercih etme eğilimi göstermektedir (Wittman ve Fedorka, 2015). Hamilton ve Zuk (1982) dışının temel tercihlerine dayanan sekonder eşeyssel karakterlerin (Örneğin; cazip renklenme, ses sinyalleri oluşturma vs.) erkeğin sağlığını ve üreme potansiyelini ortaya koyduğunu ve parazitlerden etkilenebilir olduğunu ileri sürmüştür. Dişiler bu nedenle dolaylı olarak patojenlere karşı daha dirençli erkekleri seçebilir. Birçok çalışma Hamilton ve Zuk (1982) tarafından öne çıkarılan "immün yeterlilik handikap hipotezini" desteklemektedir. Bu hipoteze göre eşeyssel özellikleri karakterize eden ifadeler ile bağışıklık fonksiyonu arasında bir değiş tokuş olması gerektiğini ve bu

nedenle de immün parametrelerin farklı ekolojik koşullarda, veya farklı popülasyon yoğunluğu, eşey oranı gibi durumlarda değişebileceğinin altını çizer. Rantala ve Kortet (2003), kur yapmaya yönelik çağrı sesi ve immün fonksiyonlar arasındaki ilişkiyi *Gryllus bimaculatus* (Ortoptera) üzerinde incelemiş ve kur sesinin özellikleri ve yüksek frekans süresi ile enkapsülasyon (hücre sel yanıt) arasında pozitif ilişki olduğu saptamışken, LY (humoral yanıt) ile negatif ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak sesin süresi enkapsülasyon ile negatif, LY ile pozitif ilişkili olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışma sonuçlarına göre enkapsülasyon ve LY birbirleri ile negatif ilişkilidir. Bu da kur şarkısı ile immün fonksiyonların bir uzlaşısı içinde olduğuna işaret etmektedir.

Diğer taraftan, patojen aktivitesinin sıcaklıkla değişebileceği düşünüldüğünde; immün sistem aktivitesi ile üreme çıktılarının sıcaklığın yükselmesi ile birlikte artış göstermesi ya da bu iki parametre arasındaki ayrışmanın olduğu durumlarda ilgili böceğin nasıl bir habitatı tercih etmesi gerektiği evrimsel süreçte şekillenmiş olacaktır (Adamo ve Lovet, 2011). Genel olarak böceklerde, immün sistemdeki değişimler dışının üreme potansiyelinde azalmaya yol açmaktadır (Reaney ve Knell, 2010). Çünkü, immün tepkiler bir enerji girdisine ihtiyaç duyar ve fizyolojik olarak maliyetlidir (Örnek: Ardia ve ark., 2012). Yine sıcaklığa bağlı immün yatırım, melanik bireylerin üreme ve hayatta kalma başarısı, vücut büyüklüğü ve kanat uzunluğu gelişiminin immün parametrelerle ilişkileri ve genetik esnekliğe (plastisiteye) çevre sıcaklığının etkileri, *Allonemobius socius* (Gryllidae) türü üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Fedorka ve Mousseau, 2007; Winterhalter ve Mousseau, 2007; Fedorka ve ark, 2013).

Davranışsal olarak sıcaklık düzenleme daha çok Grillid çekirge türlerinde çalışılmıştır (Örnek: *Gryllus bimaculatus*, Vanwyk ve Ferguson, 1995; *Acheta domesticus*, Adamo, 1998; *Gryllus integer*, Hedrick ve ark., 2002). “Isı düzenlemesine bağlı immün yatırım” hipotezi (Fedorka ve ark., 2013a, b, *Allonemobius socius*) özellikle küresel iklim değişikliğinde beklenen sıcaklık artışına bağlı olarak konakçı enfeksiyonu ve ölüm oranları veya vektör böceklerin etkinliği (Sivrisinek-Sıtma gibi) açısından merkezi bir rodedir. Bu hipotez holometabol böcek grubundan *Drosophila melanogaster* (Diptera) için de doğrulanmıştır (Kutch ve ark., 2014). Buna ek olarak, koyu kutikulaya sahip yüksek rakımlarda yaşayan *D.*

*melanogaster* bireyleri kurumaya karşı daha büyük direnç göstermişlerdir (Parkash ve ark., 2008).

Bakır Kelebeği *Lycaena tityrus* (Lepidoptera) yüksek ve alçak bölgelerde yaşayan popülasyonları arasında gelişim süreleri, sıcaklığa direnç toleransı ve genetik olarak varyasyon gösterdikleri bildirilmiştir. (Karl ve ark., 2008). Karl ve ark. (2009 ve 2010), yaptıkları diğer çalışmalarda yüksek rakımlardaki pupaların alçak kesimlerdekine göre daha melanik olduklarını tespit etmişlerdir. Ancak enkapsülasyon oranı yükseklikten etkilenmemiştir (Karl ve ark., 2010). Çünkü, kütikular melanizasyon parazit direnci ile pozitif ilişkilidir (Barnes ve Siva-Jothy, 2000). Benzer şekilde, *Calopteryx splendens* (Odonata) türünde daha koyu kanat beneği olan erkeklerin daha hızlı enkapsülasyon oranına sahip oldukları bildirilmiştir (Rantala ve ark., 2000).

True (2003), çalışmasında melanik alleller üzerinde seçim baskısı oluşturan durumlardan birisinin pradatörleri tarafından görülmeme durumu olduğunu vurgulamıştır. Koyu vücut gizlenmeye uygun pigmentasyonu sağlamaktadır. Örneğin; koyu bir zemin üzerinde dinlenen bir bireyin görünmemesi bir gizlenme/kamuflej olayıdır. En bilinen örneği *Biston betularia* (Lepidoptera) örneğidir. Diğer melanik formlar mimikri ve aposematizm durumları olup kelebek ve kınkanatlılarda yaygındır. Aposematiz, böceklerde koyu renkli olma durumu predatör için avın lezzetsiz olduğuna işaret eder. Bu kısım melanik alleller üzerinde av-avcı ilişkisine dayalı görsel sinyallerin selektif baskılarının etkisi sonucu olan polimorfik durumları açıklar (True, 2003). Ancak melanik alleller üzerinde görsel olmayan faktörleri içeren seçim mekanizmaları vardır. Bunlardan birisi termoregülasyon diğeri ise eşeysel seçilimdir. Termoregülasyon, daha koyu bireylerin açık renkli bireylere göre daha hızlı ısınıp soğuması anlamına gelir. Bu da daha yüksek rakımlı yerlerde ve kuzey bölgelerinde yaşayan özellikle hem gece hem gündüz aktif olan bireyler için önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Diğer taraftan bir güve türü olan *Lymantria monacha* (Lepidoptera) üzerinde yapılan çalışmada melanik morfların açık olanlara göre daha güçlü enkapsülasyon tepkisine sahip oldukları saptanmıştır (Mikkola ve Rantala, 2010). Dolayısıyla endüstriyel melanizm bağışıklık üzerindeki seçim ile de ilgilidir. Melanizm ve termoregülasyon ilişkisi farklı taksonlar arasında uyum gücü yararı bakımından oldukça ilgi çekicidir.

Örneğin; kelebeklerde kanat melanizmi soğuk iklim şartlarında daha uzun uçuş süresi ve daha uzun uçuş mesafesi ile pozitif ilişkilidir. Diğer taraftan uğur böceklerinde koyu renkli bireyler üreme başarısını arttırmakta ve baharda daha erken yumurtadan çıkmaktadırlar. Eşeyssel seçilim ise pek çok böcek türünün eşeyssel olarak farklı melanik örnekler gösterdiğini işaret etmektedir. Yani erkek ve dişi arasında farklı melanik formlar bulunmaktadır. Bu durum hem türün tanınmasında hem de dişinin eşey seçiminde etkili olmaktadır.

Wilson ve arkadaşları (2001), *Spodoptera littoris* larvaları kullanarak yaptıkları bir çalışmada melanizm ve hastalık direnci arasında nasıl bir ilişki olduğunu ve popülasyon yoğunluğunun immün parametreler üzerindeki etkisi üzerine bir çalışma yapmışlardır. PO aktivitesi koyu kütikulaya sahip ve kalabalık popülasyondaki bireylerde soluk renkli ve yalnız yetiştirilen bireylerden daha yüksektir. PO aktivitesi ve melanizasyon arasında hemolimf, orta bağırsak ve kütikula dokularında önemli derecede pozitif ilişkili bulunmuştur. Hemolimf, orta bağırsak ve kütikuladaki PO aktivitesi arasında pozitif bir ilişki saptanmış ve bireyler patojen savunması gerekli olan tüm bölgelere patojen direnci için yatırım yaparlar. Bu çalışmada farklı alanlardaki PO ifadesinin seviyeleri ile fenotip arasında bir uzlaşma olduğuna dair bir kanıt yoktur, fakat bunun olmadığı anlamına gelmez. Hemolimf ve orta bağırsakta gerçekleşen PO aktivitesi oldukça maliyetlidir, ancak tek bir bireyden laboratuvar şartlarında hızlı büyüme ile çoğaltılarak popülasyon haline getirilmiş popülasyonlarda bu maliyet ödenebilir (Wilson ve ark, 2001).

*Acheta domesticus* türünün erkek bireyleri üzerinde yapılan bir çalışmada yaşa bağlı olarak immün sistemin olgunlaşması incelenmiş ve nimf dönemlerinde hemolimfteki toplam fenoloksidaz aktivitesi erginlere göre daha düşükken hemolimfteki protein konsantrasyonu daha yüksek bulunmuştur. Enkapsülasyon yeteneği ise nimf dönemindeki erkek bireylerde ergin erkek bireylere göre daha yüksektir. Lizozim aktivitelerinde ise önemli bir farklılık görülmemiştir. Bu sonuçlara göre enkapsülasyon yeteneği toplam PO aktivitesine bağlı değildir (Pinera ve ark., 2013).

Shomaker ve arkadaşlarının (2006), *Gryllus texensis* (Gryllidae) türünün bireyleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, dişi bireylerin üreme için daha yüksek enerji yatırımı manipüle edilmiş ve bu durumda enfeksiyona karşı mücadelede bir indirgenme olduğu saptanmıştır. Virjin ve çiftleşen bireylerden oluşan iki grubun

hemolimfindeki PO ve protein miktarları ölçülmüştür. Elde ettikleri sonuçlarda virjin ve çiftleşen gruplar arasında PO aktivitesinde önemli bir farklılık gözlenmezken virjin bireylerin hemolimfindeki protein miktarı çiftleşen bireylerin hemolimfindeki protein miktarına göre önemli derecede yüksek seviyededir. Fakat hemolimfdeki protein seviyesi muhtemelen bireyin sağlık durumunu yansıtmadığı ve muhtemelen protein miktarındaki bu durumun virjin bireylerde yumurta üretimi sırasında oluşan yolk proteininden kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Shoemaker ve ark, 2006). Ancak, bu tez kapsamında yapılacak olan çalışmada kullanılacak tüm bireyler çiftleşmemiş olduğundan, çiftleşme statüsünün immün aktiviteler üzerindeki etkisiyle ilgili bir yargıya varılamayacaktır.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışılan Çekirgeye Ait Temel Bilgiler

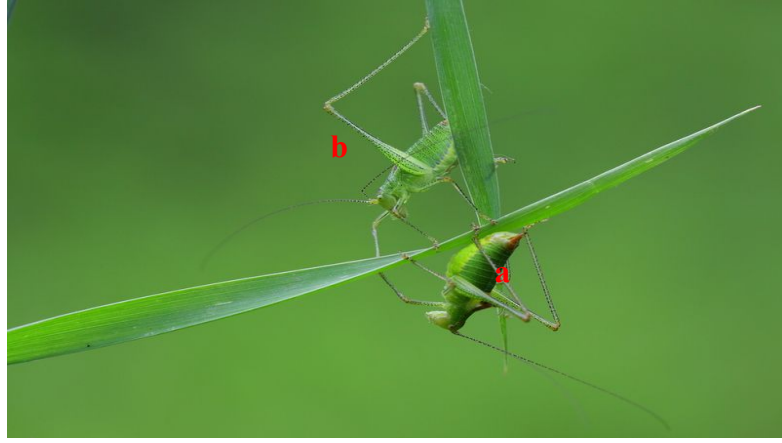
##### 3.1.1. *Poecilimon (Poecilimon) similis similis* Retowski, 1889

*Poecilimon* Fischer, 1853 Palearktik zoocoğrafik bölgede yayılış gösteren en büyük barbitistin çalı çekirgesi cinsidir (Heller ve ark., 2008). Yaklaşık 150 kadar türü olan cinsin yarısından fazlası ülkemizde yayılış göstermekte olup önemli bir kısmı endemiktir (Eades ve ark., 2015). Küçük vücut ölçüsüne sahip türleri içerse de (*P. (s. str.) minutus* Karabağ, 1975) bazı türleri oldukça iridir (Örnek:*P. (s. str.) lodosi* Harz, 1975). *P. (s. str.) similis* *P. bosphoricus* tür grubu içerisinde bulunan geniş yayılışa sahip bir türdür. Genellikle canlı bireylerde renk kahverengimsi sarı ve yeşilimsi olup, vücut genel olarak dorsal ve yan kısımlarda küçük koyu noktalarla kaplıdır. Erkeklerde vücut uzunluğu yaklaşık 14-17 mm, dişilerde 16-18 mm arasında değişmektedir. Kanatlar oldukça indirgenmiş olup erkeklerde genel olarak ses oluşturma organına dönüşmüştür. Erkekler üreme döneminde dişilere çağrı sesi üretirken, dişilerde kanatlar köreldiği için tepki cevabı yoktur. Üreme sistemlerinde hem poligami hem de poliandri gösterirler. Çiftleşme sırasında erkekler dişilere spermatofor (spermatofilaks+ampulla) transfer ederler. Yumurtalar uygun ortamlara (toprak, yaprak döküntüsü karışımı) çiftleşmeden sonra olgunlaştıkça bırakılır.

##### 3.1.2. Türün Yayılışı

Palearktik zoocoğrafik bölgede olmak üzere Ermenistan'ın bir kısmı, Gürcistan ve Türkiye'de (Karadeniz Bölgesi) yayılış göstermektedir. Türkiye'den Ardahan, Artvin, Trabzon, Giresun, Ordu, Samsun ve Sinop illerinde yayılışı olduğu hem yaptığımız ön çalışmalardan hem de kısmen literatürden (Kaya ve ark., 2012) bilinmektedir. Türün hem kıyı bölgelerde hem de yüksek kesimlerde yayılışı olduğu bildirilmiştir (Bienko, 1954). Mevcut literatür kayıtları ve yaptığımız ön araştırmalara göre, tür tipik Karadeniz ikliminin hakim olduğu ve ilgili vejetasyon yapısını tercih eden bir yayılışa sahip olduğu anlaşılmaktadır.

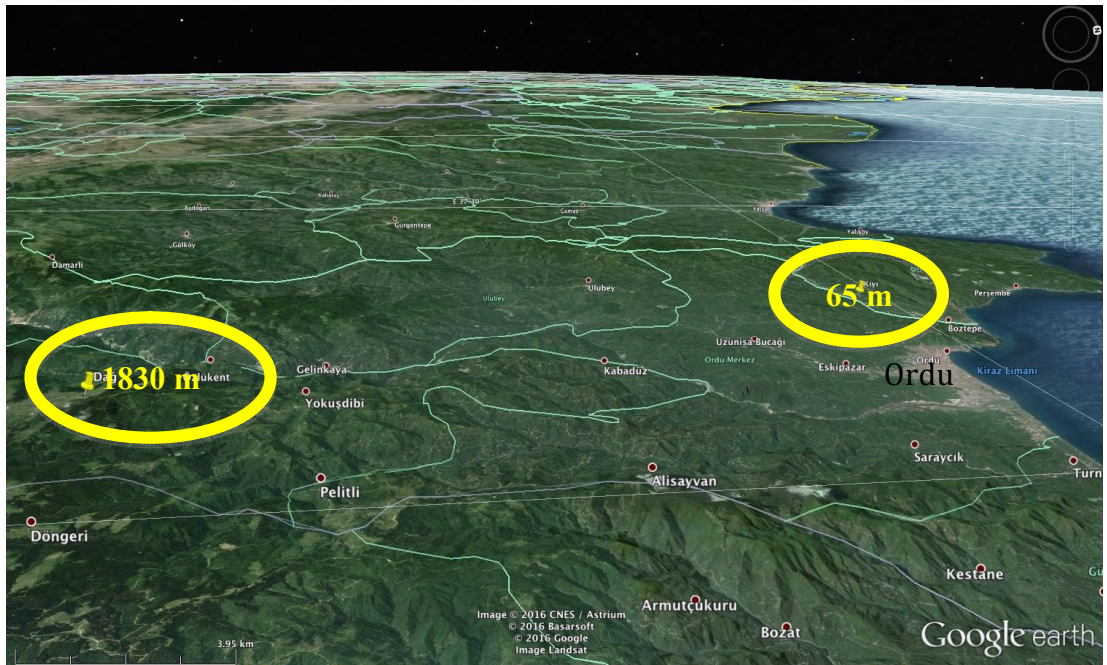




Şekil 3.1. *P. (Poecilimon) similis similis* a) erkek, b) dişi. Fotoğraf: Hasan SEVGİLİ

### 3.2. Arazi Çalışmaları ve Çekirgelerin Bakımı

Deneyde kullanılacak *P. similis* örnekleri Ordu ili popülasyonundan toplanmıştır. Bu amaçla, kıyı bölgesini temsil edecek örnekler Ordu ili Perşembe ilçesi Neneli Köyü civarından toplanmıştır (01.06.2014, 65 m, 40° 59' 18N, 37° 46' 52E). Yüksek dağ popülasyonunu temsil etmesi amacıyla diğer örneklem Ordu ili Turnalık Yaylası'ndan yapılmıştır (12.07.2014, 1830 m, 40° 37' 37N, 37° 57' 44E) (Şekil: 3.2.)



Şekil 3.2. Ordu ili kıyı ve dağ popülasyonları için örneklem yapılan lokaliteler

Çizelge 3.1.'de verildiği üzere arazi yapılan kıyı ve dağ lokalitelerinde yıllık ortalama sıcaklık farkı yaklaşık 9 °C'dir (Anonim, 2016). Bu iki farklı lokalitelerde popülasyonların habitat ve çevresel sıcaklık farklılıklarından dolayı kütikular melanizasyon ve immün aktiviteler açısından farklılık göstereceği düşünülmüştür.

**Çizelge 3.1.** Örneklem yapılan lokalitelere yakın bölgelerin yıllık sıcaklık çizelgesi

| Aylar | Kıyı (Efirli civarı) |              |              | Dağ (Çambaşı yaylası ) |              |              |
|-------|----------------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|--------------|
|       | Min sıcaklık         | Max sıcaklık | Ort sıcaklık | Min sıcaklık           | Max sıcaklık | Ort sıcaklık |
| 1     | 3.6                  | 10.8         | 7.2          | -9.3                   | -0.3         | -4.8         |
| 2     | 3.8                  | 10.9         | 7.3          | -8.0                   | 1.0          | -3.5         |
| 3     | 4.8                  | 11.7         | 8.2          | -4.7                   | 5.1          | 0.1          |
| 4     | 8.1                  | 15.2         | 11.6         | 0.0                    | 11.2         | 5.6          |
| 5     | 12.1                 | 18.9         | 15.5         | 3.6                    | 15.9         | 9.7          |
| 6     | 16.0                 | 23.7         | 19.8         | 5.8                    | 19.3         | 12.5         |
| 7     | 18.9                 | 26.5         | 22.7         | 8.2                    | 23.0         | 15.6         |
| 8     | 18.9                 | 27.0         | 22.9         | 8.0                    | 23.4         | 15.7         |
| 9     | 16.1                 | 24.4         | 20.2         | 5.1                    | 20.5         | 12.8         |
| 10    | 12,2                 | 20,1         | 16,1         | 1,5                    | 14,4         | 7,9          |
| 11    | 8,7                  | 16,4         | 15,2         | -2,4                   | 7,6          | 2,6          |
| 12    | 5,8                  | 13,0         | 9,4          | -6,3                   | 1,8          | -2,3         |

Bu örneklem yapılmadan önce belirtilen alanlarda ön gözlemler yapılmış ve türün son devre nimf dönemi belirlenmiştir. İkinci ön arazi çalışmalarında son deri değişimlerinin yoğun olduğu tarih belirlenmiştir. Örnekler yaklaşık aynı yaş grubu olacak şekilde yedi yaşlarında (bir haftalık) iken toplanmıştır. Bu süre içerisinde erkek ve dişilerin çiftleşmedikleri laboratuvar gözlemlerinden de anlaşılmaktadır. Özellikle dişiler ilk bir hafta içerisinde çiftleşmeye çok meyilli değildirler. Bu şekilde laboratuvar şartlarından doğabilecek olası olumsuz etkilerin minimuma

indirilmesi hedeflenmiştir. Çünkü yaptığımız ön çalışmalarda laboratuvarda yetiştirilen bireylerin daha melanik görünüme sahip oldukları belirlenmiştir (yayınlanmamış veri). Araziden toplanan bireyler kafesler (20x20x16) içinde birbirine zarar vermeyecek sayıda dişi ve erkek bireyler ayrı kafeslerde olacak şekilde laboratuvara taşınmıştır. Bireylerin üzerinden toplandığı ve tercih ettikleri bitkilerden beslenmeleri amacıyla kafeslere yerleştirilmiştir.

### 3.2.1. Çekirgelerin Laboratuvarında Bakımı

Örnekler yaklaşık oda sıcaklığında laboratuvar ortamında 24°C ±1 sıcaklıkta 2-3 gün tutulmuştur. Laboratuvara getirilen bireyler eşit sayılarda (10'ar adet), çiftleşmelerinin önlenmesi amacıyla dişi ve erkek bireyler ayrı olacak şekilde kafeslere yerleştirilmiştir. Kafesler; 20x20x16 cm boyutlarında, dikdörtgen, ön yüzü tamamen cam, yan iki kenarında 12.5x8 cm boyutlarında tülle kapatılmış; hava akışını sağlayan pencere şeklinde iki açıklığa sahiptir.

Tüm bireyler eşit miktarda diyete tabi tutulmuştur. *Ranunculus sp.*, *Urtica dioica*, *Rubus sp.* bu türün tercih ettiği bitkilerdir. Besin olarak kullanılacak bitkiler iç bölgelerden, insan elinin değmediği ya da yol kenarı olmayan yerlerden taze olarak toplanılmasına dikkat edilmiştir. Toplanan bitkiler karışık demetler halinde  $\frac{3}{4}$  oranında su ile doldurulmuş plastik bardaklara konularak bardağın ağız çevresi kapatılarak kafeslere yerleştirilmiştir. Buna ek olarak iyice yıkanan marul, salatalık, elma ve havuç dilimleri bireylerin beslenmesinde ek besin ve su ihtiyacının karşılanması amacıyla kullanılmıştır (Sevgili ve ark., 2015). Bitkiler su ortamında tutularak tazeliğinin daha uzun süre korunması sağlanmıştır. Kafeslerdeki bitkiler düzenli olarak iki gün arayla değiştirilerek yenilenmiş ve düzenli olarak kafeslerin temizliği yapılmıştır. Bunun dışında kafesler günlük olarak kontrol edilmiş kuruyan ve azalan besinler tamamlanmıştır. Böylece canlıların doğal ortamlarındaki beslenme durumlarıyla laboratuvar ortamındaki beslenme durumu arasındaki fark minimum düzeye indirilmesi amaçlanmıştır.

Bireylerin her biri arka femurlarından farklı numaralar verilerek etiketlenmiştir. Bireylerin etiketleri günlük olarak kontrol edilmiş; eğer düşen varsa ve hangi bireye

ait olduğu biliniyorsa yeni bir etiketle tekrar etiketleme yapılmış, eđer etiketi dūřen birey ve numarası bilinmiyorsa deney dışı bırakılmıştır.

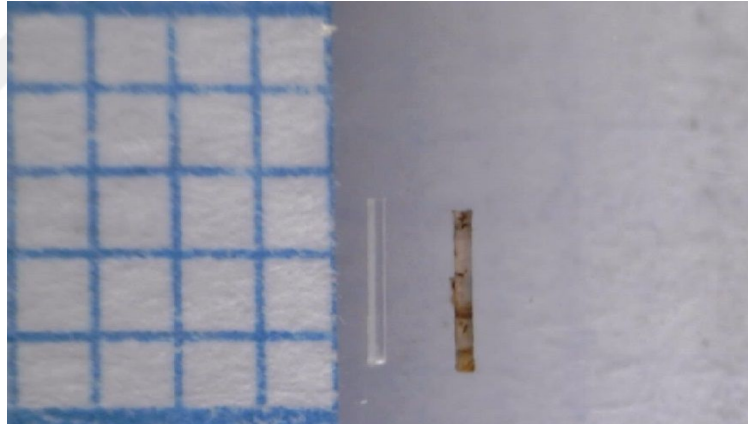
### **3.3. Hemolimf Çekimi**

Araziden toplanan örneklerden 2-3 gün laboratuvarında beslendikten sonra hemolimf çekimi işlemlerine başlanmıştır. Hemolimf çekimi yapılmadan önce bireyler karbondioksit tüpüyle 10 saniye anestezi edilmiş ve bayılmıştır. Deney öncesinde yapılan ön çalışmalarda karbondioksit ile bayılmada optimum tutma süresi olarak 8-10 saniyenin yeterli olacağı ve bireyin olumsuz etkilenmeyeceği saptanmıştır. Bayılmış olan bireyler örnek Stereo Zoom mikroskop altında yan yatırılmış ve 3.ve 4. abdomen segmenti arasından dikkatli bir şekilde mikro şırınga (10 µl) ile girilmiştir (Hamilton, Reno, NV, USA) (Fedorka ve ark., 2013; Fedorka ve Sevgili, 2014). Mikroskoptan bakılarak dikkatli bir şekilde 5 µl hemolimf çekilmiştir. Çekilen hemolimf daha önceden hazırlanan 17 µl PBS (pH= 7.4) eklenmiş olan ependorf tüplerine ilave edilmiş ve daha sonra analiz edilmek üzere -18 °C de saklanmıştır. Hemolimf çekimi öncesinde şırınga insect ringer solüsyonu ve %70'lik etil alkol serilerinden geçirilerek temizlenmiş ve bu işlem her bireyden hemolimf çekiminden önce ve sonra tekrarlanmıştır. Hemolimf çekiminden sonra enkapsülasyon işlemine geçilmiştir.

### **3.4. Enkapsülasyonun Belirlenmesi**

Enkapsülasyon işlemi için önceki çalışmalarda sıklıkla bildirildiği gibi 2 mm uzunluğunda naylon filament kullanılmıştır (Rantala ve Kortet, 2003). Deney öncesi yapılan ön çalışmada naylon filament olarak kullanılan misinanın uygun uzunluk ve çap durumu belirlenmiştir. Misinalar hemolimf içersinde hemositlerin kolayca tutunabilmelerini kolaylaştırmak amacıyla sıfır numara zımpara ile hassas bir şekilde hafifçe zımparalanmıştır. 0.40 mm çapındaki bu misinalar Stereo Zoom mikroskobu altında milimetrik kağıt üzerinde dikkatli bir şekilde ölçülerek kesilmiştir. Misina parçaları sterilizasyon amacıyla alkolden (%70) geçirilerek kullanılmıştır. Misinalar implant edilmeden 5 dk önce steril bir saat camı üzerine alınarak kurutulmuş daha sonra implant işlemi gerçekteştirilmiştir. Hemolimf çekiminin hemen arkasından kesilen misina parçaları hemolimf çekimi için açılmış olan delikten vücut içersisine

gönderilmiştir. Ayrılan bireyler beslenmeleri için yeniden alındıkları kafeslere bırakılmıştır. Misina parçaları enkapsülasyon tepkisini ölçmek amacıyla bireylerin vücutları içinde 24 saat tutulmuştur. Deney öncesi yapılan ön araştırmada misina parçaları (2 ve 3 cm halinde) 24, 36 ve 48 saat *in vivo* ortama bırakılmış ve enkapsülasyon ölçümleri yapılmıştır. Buna göre 24 saatlik bırakılma süresinin enkapsülasyon tepkisinin ölçülmesinde yeterli olacağı kanaatine varılmıştır. 24 saatin sonunda kafeslerden sırasıyla alınan bireyler -18°C’de bir süre tutulmuş ve daha sonra diseksiyon yapılarak misina parçaları alınmıştır. Çıkarılan naylon filamentlerin diğer cisimlerle teması minimum seviyede tutularak saat camı üzerinde kuruyana kadar bekletilmiş ve daha sonra bireyin etiket numarası üzerine yazılmış 0.60 ml’lik eppendorf tüplerine alınmıştır. Her bir misina parçası yanında kontrol olarak hazırlanmış 2 mm’lik misina ile birlikte Dijital mikroskop (Dino-Lite Digital Microscope, AnMo Electronics Corporation) ile fotoğraflanıp ImageJ programı (NIH, <http://rsbweb.nih.gov>) ile bireyin melanizasyon yeteneği ölçülmek üzere saklanmıştır.



**Şekil 3.3.** Enkapsüle olmuş naylon filament örneği (sağda) ve kontrol için kullanılan filament (solda).

Bu program fotoğrafın her bir kesimindeki siyah ve beyaz piksel değerlerini karşılaştırma işlemi (greyscale değeri olarak) yapabilmektedir. Bu değer 0 ile (tamamen karanlık) 255 (tamamen beyaz) arasında değişmektedir (Leman ve ark., 2009). Fotoğraflama işlemi naylon filamentler ½ oranında milimetrik kağıtla kaplı petri kutusu üzerinde tutularak gerçekleştirilmiştir. Çekim mesafesi ve ortamın ışık yoğunluğu sabit tutularak ortak değişkenlerin etkilerinin minimuma düşürülmesi hedeflenmiştir.

### 3. 5. Fenoloksidaz ve Litik Aktivite Ölçümleri

Yapılan ön çalışmalarda çalı çekirgelerinde toplam PO ve LY aktivitenin ölçülebilmesi için 5 µl kadar hemolimfin yeterli olabileceği saptanmıştır (Sevgili, 2016). LY aktivitenin ölçülebilmesi için analiz stoğundan daha fazla miktarda hemolimf+PBS kullanılması gerektiği anlaşılmıştır. Hemolimfteki toplam protein miktarının ölçümünde az bir miktar yeterli olabilmektedir.

İkinci adım olarak bireylerin hemolimfindeki total fenoloksidaz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Bailey, 2011). Fenoloksidaz melanin üretim yolağının ara bir anahtarıdır ve melanin oluşumu için enzimatik olmayan polimere edebilen kinon oluşumunu katalizler (Söderhall ve Cerenius, 1998). Fenoloksidaz assay: öncelikle ihtiyaç duyulan alfa-kimotripsin (Lot# 060M7007V Pcode:1001597183) ve L-Dopa (Lot# SLBF6724V Pcode: 1001494564) miktarı hesaplanarak çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir 96 kuyucuklu plakaya daha önce çekilen ve -18 °C de saklanan hemolimf+PBS karışımından 5 µl konulmuştur. Üzerine 14 µl α-cts olüsyonu eklenerek 20 dk oda sıcaklığında (25°C) karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir (Fedorka ve ark., 2013). α-ct solüsyonu: 1 ml distile suda 0.0013 g α-ct çözüldürülmüş ve 5 dk vortekse tabi tutularak hazırlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 1 µl PBS içinde 0.0014 g çözdürülmüş L-Dopa solüsyonundan 90 µl fenoloksidaz aktivite ölçülecek olan tüm kuyucuklara eklenerek mikropate okuyucuda (Multiscan FC, Thermo Scientific) optik yoğunluklukları ölçülmüştür (490 nm filtre ile) (Adamo ve Parsons, 2006; Adamo ve ark., 2011; Bailey, 2011; Fedorka ve Sevgili, 2014). Ölçümler bir saat boyunca her 20 dk da bir tekrarlanmıştır.

Lizozim aktivitesi fenoloksidaz aktivitesi gibi turbidometrik olarak ölçülmüştür (Bailey, 2011). Bunun için ihtiyaç duyulan *Micrococcus luteus* (Lot# SLBD6170V Pcode: 1001556300) miktarı hesaplanarak çözeltiler hazırlanmıştır. *Micrococcus luteus* hücre duvarı süspansiyonu: 1 ml PBS de 0.003 g *M. luteus* çözüldürülerek ve yaklaşık 1 dk vorteksenerek hazırlanmıştır. Her bir 96 kuyucuklu plakaya daha önce çekilen ve -18 °C de saklanan hemolimf+PBS karışımından 13 µl konulmuştur. Üzerine 14 µl PBS eklenmiştir. Daha sonra 90 µl *M.luteus* çözeltisi LY aktivitenin ölçüleceği her bir kuyucuğa eklenmiştir (Bailey, 2011). LY aktivite 450 nm filtrede

mikroplate okuyucu yardımıyla ölçülmüştür (Adamo ve Parsons, 2006; Adamo ve ark., 2011). Fenoloksidaz ölçümünde olduğu gibi 20'şer dakika aralıklarla 4 okuma gerçekleştirilmiştir.

### **3.6. Hemolimfteki Protein Konsantrasyonunun Tespiti**

Protein konsantrasyonunun belirlenmesinde tıpkı fenoloksidaz ve LY aktiviteyi belirlemede kullanıldığı gibi hemolimf+PBS karışımı şeklinde saklanan örnekler kullanılarak (1 µl) Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Adamo, 2004; Fedorka ve ark.,2013). Albümin standart eğrisi 2000, 1000, 500, 250, 125 mg/ml oranında hazırlanmıştır. Bu standart çözeltileri okuma yapılacak her 96 kuyucuklu plakada kullanılmıştır. Her bir kuyucuğa 1 µl hemolimf, 1µl PBS ve 100 µl Bradford çözeltisi (SIGMA, B6916) konulmuştur. Okuma yapılmadan önce plakalar 5 dk inkübe edilmiştir ve mikroplate okuyucu ile bradford çözeltisinin proteinle bağlandığında maksimum absorbands değerini verdiği 595 nm de gerçekleştirilmiştir (Adamo, 2004; Shoemaker ve ark., 2005; Adamo ve Parsons, 2006).

PO aktivitesi, LY aktivite ve protein analizleri yapılırken hemolimf dışındaki maddelerinin etkisini elimine edebilmek için hemolimf dışındaki tüm çözeltilerin konulmasıyla hazırlanan blank kuyucukları (kontrol grupları) oluşturularak ölçümler yapılmış ve hesaplama yapılırken hemolimfin gerçek değerini elde etmek adına hemolimfin ölçüldüğü kuyucukların verdiği değerlerden blankların bulunduğu kuyucukların verdiği değerlerin ortalamaları alınarak birbirinden çıkartılmış ve daha sonra istatistik testlere tabi tutulmuştur. Kural olarak hemolimfteki PO aktivitesi zamanla doğrusal bir artış gösterirken, LY aktivite bakteri hücre duvarlarının yıkımı nedeniyle tam tersi bir yol izler (Fedorka ve ark., 2013). LY aktivite OD değerleri negatif olduğu için, karışıklığa meydan vermemek adına pozitif sayıya dönüştürülmüştür (\*-1 negatif değer). Bu durumda en büyük değer en güçlü litik aktiviteye sahip anlamındadır.

### **3.7. Diğer Morfolojik Ölçümler**

Termal çevrenin kütikula melanizmine etkisi hipotezine yönelik olarak sağ ve sol arka femur rengi, pronotum ve abdomen rengi her iki eşey için iki popülasyonda da

incelenmiştir. Her bireyde belirlenen bu vücut bölümleri dijital kamera (Dino-Lite) kullanılarak fotoğraflanmıştır. Fotoğraflama işlemi, fotoğraflanacak vücut bölümleri ½ oranında milimetrik kağıtla kaplı petri kutusu üzerinde tutularak gerçekleştirilmiştir. Çekim mesafesi ve ortamın ışık yoğunluğu sabit tutularak ortak değişkenlerin etkilerin minimuma düşürülmesi hedeflenmiştir. Tüm veriler ImageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir (Fedorka ve ark., 2005). Ayrıca vücut büyüklüğü ile bazı immün parametreleri karşılaştırabilmek için arka femur uzunlukları hassas kumpas yardımıyla (Mitutoyo) mm cinsinden ölçülmüştür.

### 3.8. İstatistiksel Analizler

Tüm istatistiksel analizlerde R 3.2.1(R Core Team, 2014) ve SPSS kullanıldı (IBM SPSS Statistic, v. 22, 1989-2013). Verilerin normalite testleri Kolmogrov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile yapılmıştır. Normal dağılım göstermeyen toplam PO, LY aktivite ve hemolimfteki protein konsantrasyonu için “log” transformasyonu, enkapsülasyon skorları için “ln” transformasyonu tercih edilmiştir. Devamlılık içeren tüm veriler üzerinde boxplot, histogram ve ModifiyeTau tekniği (Thompson, 1935) ile aykırı değerler (Outliers) tespit edilmiştir. Analizden yaklaşık tüm verilerden toplam 70 civarında outlier saptanmış ve bunlar analize dahil edilmemiştir. Aşırı değer uzaklaştırılmasından sonra verilerin normalite testleri tekrarlanmıştır. Kıyı ve dağ popülasyonlarının çeşitli immün fonksiyonlar açısından olası etkileşimlerini anlamak açısından lokalite farklılığı baz alınarak, her bir birey için belirlenmiş etiket, her mikropkaka okutulmasında kullanılan 96 kuyucuklu plaka için öngörülen etiket ve eşey (erkek, dişi) faktör ve vücut ölçüsü (pronotum/arka sağ femur) ise kovaryant olarak analize dahil edilmiştir. Analizde Genelleştirilmiş Lineer Model (GLM) kullanılmıştır. İmmün fonksiyonlar bağımlı değişken olarak analize sokulmuştur. LY aktivitenin vücut ölçüsü ile etkileşimi olmadığı düşünüldüğü için bu analizde vücut ölçüsü parametresi analize dahil edilmemiştir. *P. similis*'te kutikular melanizasyonunu anlamak için pronotum, abdominal tergite ve arka femur dorsalinden ölçüm yapılmıştır. Toplam (Kombine) melanizasyon bu üç parametrenin Temel Bileşenler Analizine (PCA) sokulması ile elde edilen Regresyon Faktörü Skorları şeklinde hesaplanmıştır. İmmün fonksiyon verilerinin birbirleri, kutikular melanizasyon ve vücut ölçüleri ile olan ilişkilerini anlamak için Stepwise metodu (Lineer Regresyon) kullanılmıştır. Oluşturulan modelde ilgili immün fonksiyonlar



bağımlı değişken olarak analize sokulurken melanizasyon değerleri ve vücut ölçüleri belirleyici değişkenler olarak analize dahil edilmiştir. Kıyı ve dağ popülasyonlarında incelenen erkek ve dişilerin ilgili parametreler açısından karşılaştırılması MANOVA (GLM-Multivariate ) ile yapılmış ve immün fonksiyonlar ile eşeylerin etkileşimleri belirlenmeye çalışılmıştır. Vücut ölçüleri ve kütikular melanizasyon arasındaki ilişkiler ise Pairwise korelasyonu tercih edilmiştir. Standart hata grafikleri ise Excel ile tasarlanmıştır.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada kıyı ve yüksek dağ populasyonlarının çeşitli immün parametreler ve kütikular melanizasyon parametrelerinin karşılaştırılmış ve temelde kısa mesafede “termal melanin hipotezinin esnekliği” araştırılmıştır. Çalışmada *P. similis*'e ait kıyı populasyonundan 74♂♂, 73♀♀, yüksek dağ populasyonundan 90♂♂ ve 89♀♀ olmak üzere toplam 326 erkek ve dişi bireyden başarılı bir şekilde hemolimf çekimi yapılmıştır. Fenoloksidaz aktivitesi (PO), hemolimfteki protein konsantrasyonu ve enkapsülasyon yeteneğinin ölçülmesi oldukça başarılı olmuştur. Ancak litik aktivite (LY) istenildiği gibi olmamış, bireylerin hemen hemen yarısında aktivitenin yeterince başarılı olmadığı görülmüştür. Bu nedenle litik aktivite (LY) karşılaştırmalarında örneklem sayısı diğerlerine oranla küçük kalmıştır (kıyı; 40♂♂, 37♀♀; dağ 40♂♂, 30♀♀). Bunun nedeni büyük olasılıkla çalışma örneğinden LY aktivite için kullanılan miktar yeterli olmamasından kaynaklanıyor olabilir. Ya da çekilen hemolimf miktarının (5 µl) biraz daha fazla olmasıyla aktivitenin daha güçlü bir şekilde ölçülerek giderilebileceği düşünülmektedir. Enkapsülasyon için kullanılan naylon iplikçiklerin diseksiyon yapılarak bulunması oldukça başarılı olmuştur (%97). Bu iplikçiklerin ölçümleri de başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

##### 4.1. Kıyı ve Dağ Popülasyonlarında Humoral ve Hücrel İmmün Aktiviteler

Hemolimfteki toplam PO aktivitesi dağ popülasyonunda önemli derecede daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.1, Şekil 4.1). Ancak kıyı ve dağ popülasyonundaki PO aktivitesi karşılaştırıldığında bir farklılık gözlenmemiştir (Çizelge 4.2). PO aktivitesi alan (kıyı-dağ ayırmadan) farklılığından etkilenmemiştir. Ancak Tukey testi kıyıdaki erkek ve dişilerin her ikisinin de dağ popülasyonundaki erkeklerin ve dişilerden önemli düzeyde farklı olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.2). LY aktivite kıyı ve dağ popülasyonunda oldukça benzer olsa da (Şekil 4.3) eşey farklılığı her iki popülasyonda da dikkate alındığında LY aktiviteyi etkilediği görülmüştür. LY aktivite kıyı ve dağ popülasyonlarının her ikisini de içine alan eşey farklılığından etkilenmiştir (Çizelge 4.1). Kıyı popülasyonundaki erkeklerin hemolimfindeki LY aktivite dişilerinkinden önemli derece farklılık gösterdiği anlaşılmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.4). Kıyı dişi popülasyonu ise aynı zamanda dağ popülasyonundaki her iki eşeyden anlamlı düzeyde daha az LY aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Çizelge

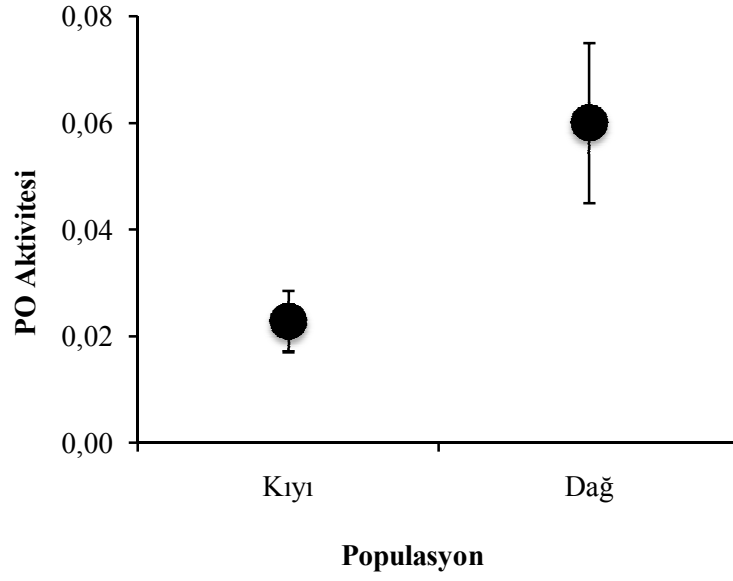
4.4). Dağ popülasyonundaki eşeyler arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli olmasa da dağ popülasyonundaki dişi kıyı popülasyonundaki dişiden daha fazla LY aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2, Şekil 4.4). Hemolimfteki protein konsantrasyonu iki farklı popülasyonda oldukça benzer olup (Şekil 4.5), eşey farklılığının bu konsantrasyonu etkilediği saptanmıştır (Çizelge 4.1, Şekil 4.6). Bireylerin vücut büyüklükleri çok az da olsa protein miktarını etkilemiştir. Kıyı dişi popülasyonu kıyı erkek ve dağ dişi popülasyonundan belirgin düzeyde daha az proteine sahip olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.6).

**Çizelge 4.1.** Farklı yüksekliğe sahip çevre ve eşeyin bağışıklık ve melanizasyon üzerindeki rolleri (Generalized Linear Model (GLM) ile bireyler, lokalite ve eşey faktörü, vücut ölçüsü kovaryant olarak analize dahil edildi Toplam melanizasyon skoru, Temel Bileşenler Analizi (PCA) ile oluşturulan tek bir sentetik faktörle pronotum, abdomen ve sağ arka femurdan elde edilen veriler birleştirilerek melanizasyon ölçümlerinden elde edilen veriler birleştirilerek melanizasyon ölçümlerinden elde edilen regresyon faktör skoru üzerine yapılan modelle belirlendi (Fedorka ve ark., 2013)

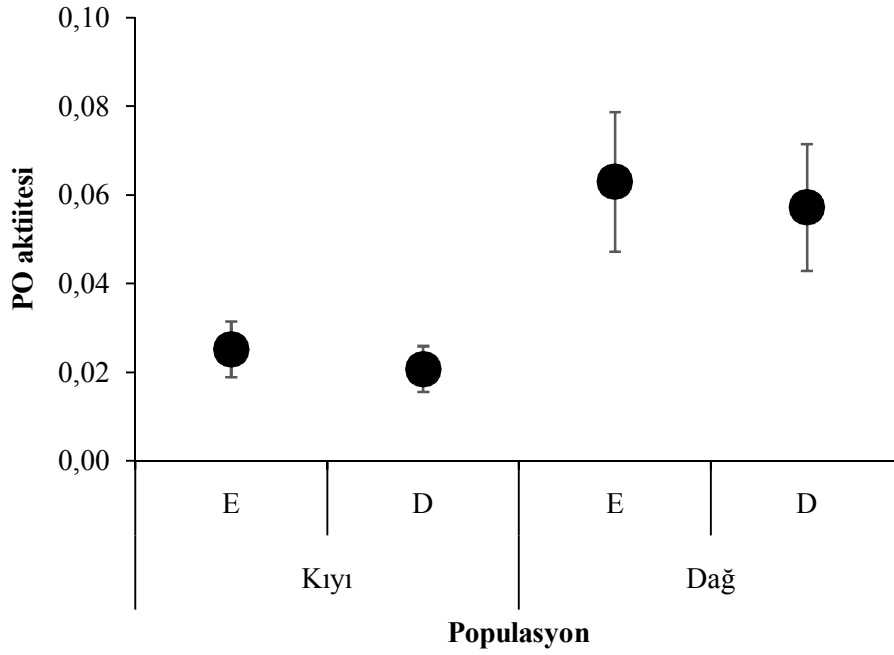
| Parametreler                              | SE    | Waldx <sup>2</sup> | df | P            |
|---|-------|--------------------|----|--------------|
| <b>Etkilenen değişken= Toplam PO</b>      |       |                    |    |              |
| Model                                     | 0.308 | 25.31              | 1  | <0.001       |
| Lokalite (Kıyı)                           | 0.049 | 87.48              | 1  | <0.001       |
| Eşey (Erkek)                              | 0.062 | 0.62               | 1  | 0.432        |
| Pronotum/Arka femur                       | 1.051 | 0.39               | 1  | 0.533        |
| <b>Etkilenen değişken= Litik Aktivite</b> |       |                    |    |              |
| Model                                     | 0.059 | 1109.02            | 1  | <0.001       |
| Lokalite (Kıyı)                           | 0.064 | 0.18               | 1  | 0.675        |
| Eşey (Erkek)                              | 0.064 | 6.03               | 1  | <b>0.014</b> |
| <b>Etkilenen değişken= Protein</b>        |       |                    |    |              |
| Model                                     | 0.066 | 157.03             | 1  | <0.001       |
| Lokalite (Kıyı)                           | 0.010 | 2.11               | 1  | 0.147        |
| Eşey (Erkek)                              | 0.013 | 23.33              | 1  | <0.001       |
| Pronotum/Arka femur                       | 0.022 | 3.69               | 1  | <b>0.055</b> |
| <b>Etkilenen değişken= Melanizasyon</b>   |       |                    |    |              |
| Model                                     | 0.463 | 30.83              | 1  | <0.001       |
| Lokalite (Kıyı)                           | 0.073 | 416.74             | 1  | <0.001       |
| Eşey (Erkek)                              | 0.094 | 36.49              | 1  | <0.001       |
| Pronotum/Arka femur                       | 1.576 | 14.75              | 1  | <0.001       |
| <b>Etkilenen değişken= Enkapsülasyon</b>  |       |                    |    |              |
| Model                                     | 0.102 | 2114.00            | 1  | <0.001       |
| Lokalite (Kıyı)                           | 0.017 | 69.11              | 1  | <0.001       |
| Eşey (Erkek)                              | 0.021 | 17.84              | 1  | <0.001       |
| Pronotum/Arka femur                       | 0.348 | 6.85               | 1  | <0,001       |

**Çizelge 4.2.** K1y1 ve dağ pop1lasyonundaki erkek ve dişiler arasındaki imm1n farklılıklarını g1rmek i1in Tukey testi (MANOVA) kullanıldı. PO, LY, protein konsantrasyonu ve enkaps1lasyon bağımlı değişken ve eşeyler fakt1r olarak analize sokuldu (K1y1; Erkek: 32, Dişi: 28; Dağ; Erkek: 31, Dişi: 19/kE= K1y1 Erkek, kD= K1y1 Dişi, dE= Dağ Erkek, dD= Dağ Dişi).

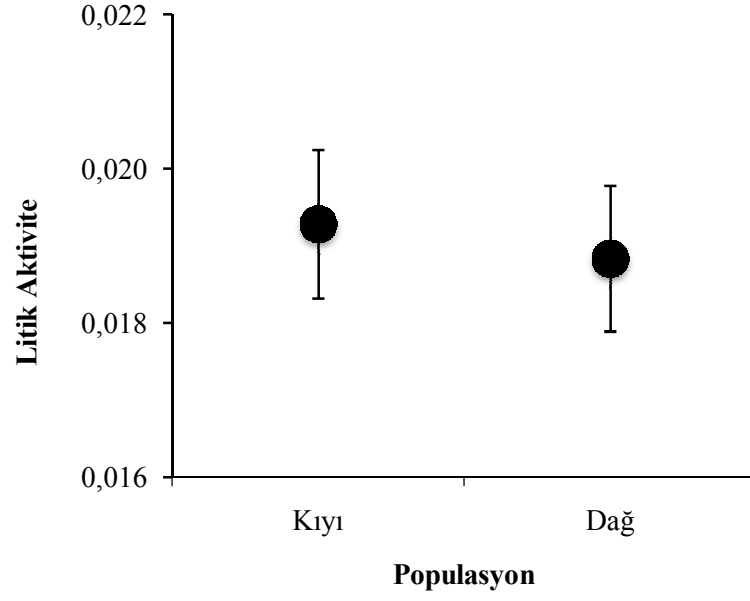
| Değişkenler (Model)   | Mean Square | Df     | F      | p      |
|-----------------------|-------------|--------|--------|--------|
| Toplam PO             | 2.29        | 3      | 14.81  | <0.001 |
| Litik Aktivite        | 1.11        | 3      | 14.81  | <0.001 |
| Protein               | 0.05        | 3      | 7.32   | <0.001 |
| Enkaps1lasyon         | 0.21        | 3      | 15.26  | <0.001 |
| Tukey Testi           |             |        |        |        |
| <b>Toplam PO</b>      |             |        |        |        |
|                       | kE          | kD     | yE     | Yd     |
| kE                    | --          | 0.941  | <0.001 | <0.001 |
| kD                    | 0.941       | --     | <0.001 | <0.001 |
| yE                    | <0.001      | <0.001 | --     | 0.999  |
| yD                    | <0.001      | <0.001 | 0.999  | --     |
| <b>Litik Aktivite</b> |             |        |        |        |
| kE                    | --          | <0.001 | 0.263  | 0.470  |
| kD                    | <0.001      | --     | 0.025  | 0.044  |
| yE                    | 0.263       | 0.025  | --     | 0.999  |
| yD                    | 0.470       | 0.044  | 0.999  | --     |
| <b>Protein</b>        |             |        |        |        |
| kE                    | --          | <0.001 | 0.426  | 0.283  |
| kD                    | <0.001      | --     | 0.014  | 0.109  |
| yE                    | 0.406       | 0.014  | --     | 0.973  |
| yD                    | 0.283       | 0.109  | 0.973  | --     |
| <b>Enkaps1lasyon</b>  |             |        |        |        |
| kE                    | --          | 0.011  | 0.018  | 0.043  |
| kD                    | 0.011       | --     | <0.001 | <0.001 |
| yE                    | 0.018       | <0.001 | --     | 1.000  |
| yD                    | 0.043       | <0.001 | 1.000  | --     |



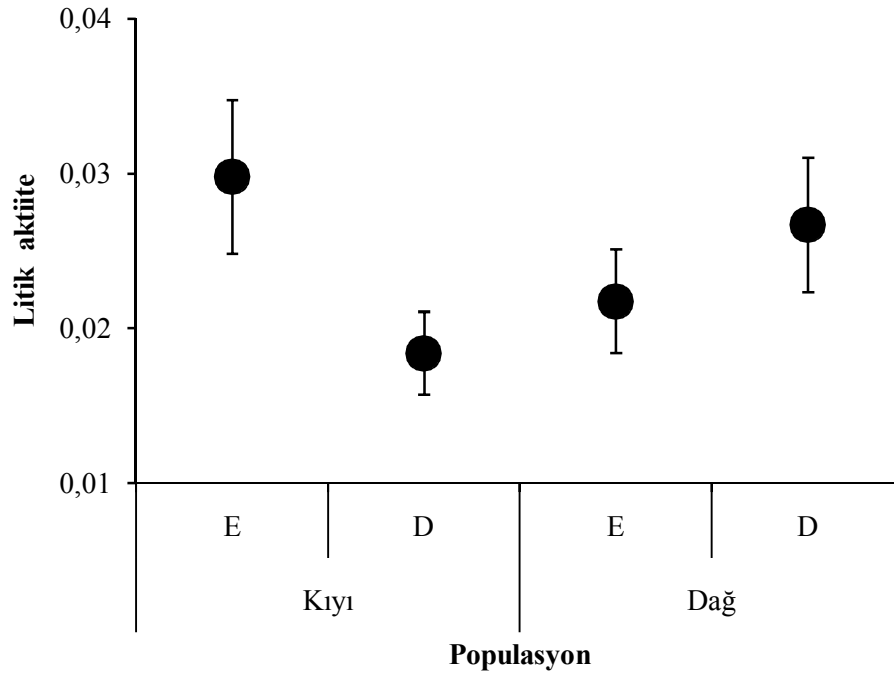
**Şekil 4.1.** Kıyı ve dağ populasyonlardaki toplam PO aktivitesi (Tüm dişi ve erkekler dahil)



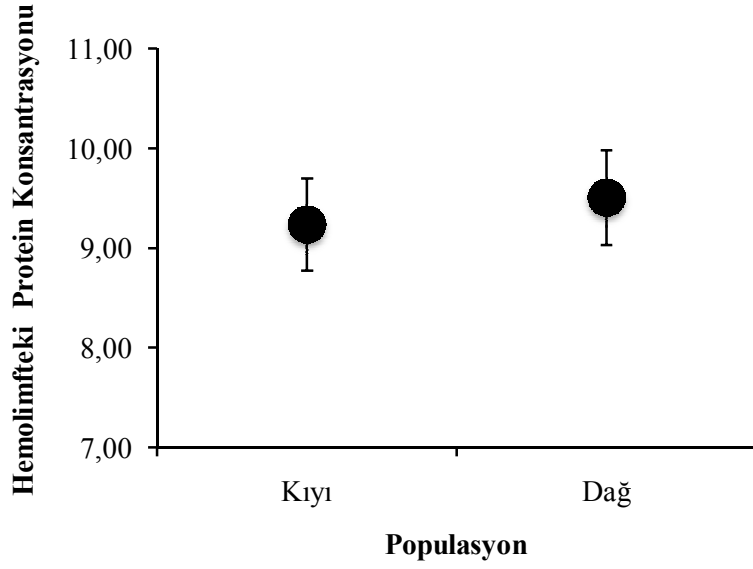
**Şekil 4.2.** Kıyı ve dağ populasyonlardaki dişi ve erkek bireylerin ölçülen PO aktivite sonuçları



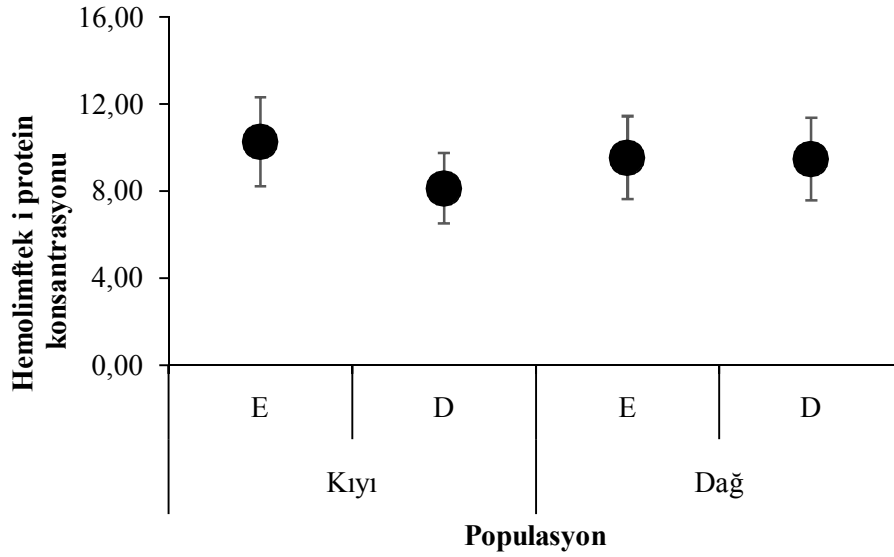
**Şekil 4.3.** Kıyı ve dağ populasyonlardaki toplam LY aktivitesi (Tüm dişi ve erkekler dahil)



**Şekil 4.4.** Kıyı ve dağ populasyonlarındaki dişi ve erkek bireylerin ölçülen LY aktivite sonuçları



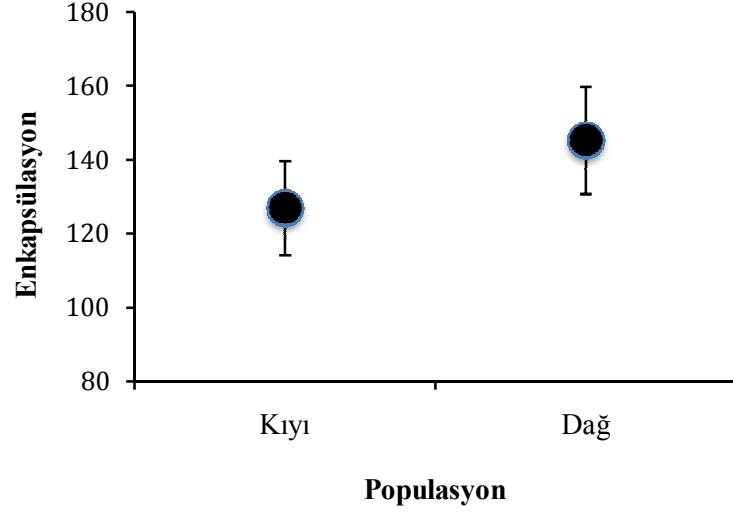
**Şekil 4.5.** Kıyı ve daha populasyonlardaki bireylerin hemolimfinden ölçülen protein konsantrasyonu (Tüm dişi ve erkekler dahil)



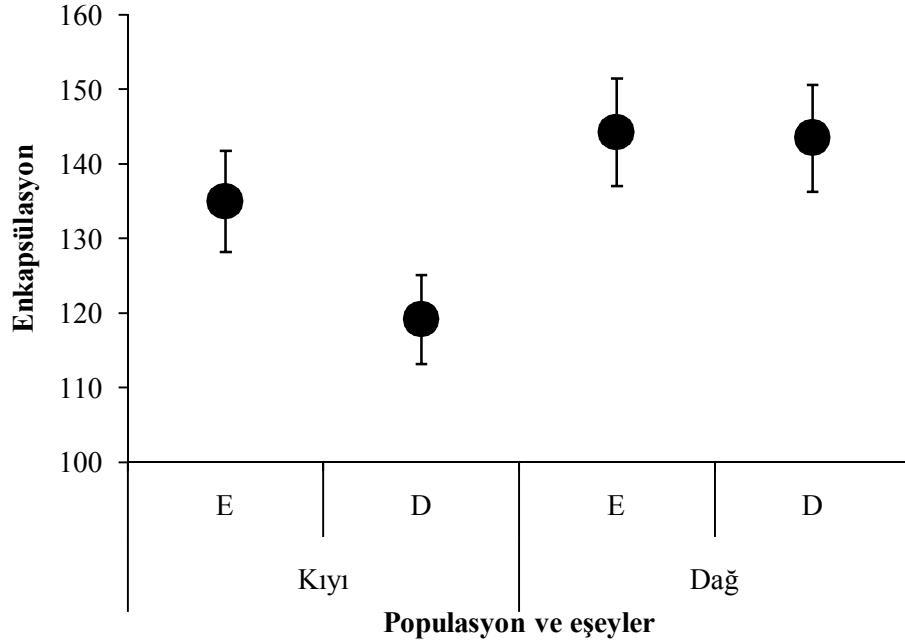
**Şekil 4.6.** Kıyı ve Dağ populasyonlarındaki farklı eşeylerin hemolimfinden ölçülen protein konsantrasyonu

Bireylerin hemolimfindeki hemositlerin aktivitelerinin birçok faktörden etkilenebileceği saptanmıştır. Daha yüksek bölgede yayılış gösteren populasyonun daha yüksek enkapsülasyon yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1, Şekil 4.7). Enkapsülasyon aynı zamanda her iki populasyondaki eşey farklılığından ve vücut büyüklüğünden de etkilenmiştir. Kıyıda erkek ve dişi populasyonunun her iki

popülasyondaki diğer eşeylerden farklı enkapsülasyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak dağ popülasyonundaki erkek ve dişilerin birbirlerinden farklı enkapsülasyon yeteneğine sahip olmadıkları saptanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. K1y1 ve dağ popülasyonlardaki toplam enkapsülasyon yeteneği (Tüm dişi ve erkekler dahil)

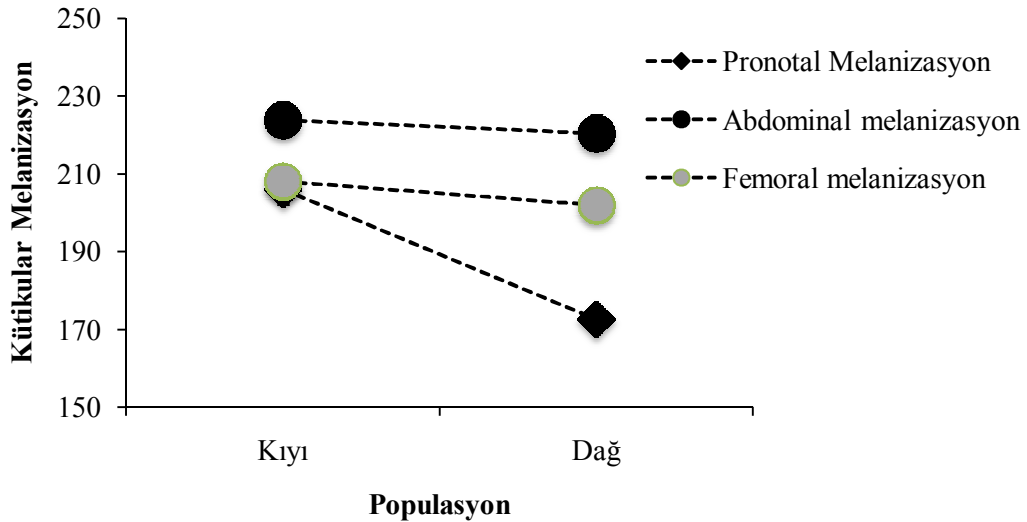


Şekil 4.8. K1y1 ve dağ popülasyonlarındaki dişi ve erkek bireylerin ölçülen enkapsülasyon yeteneği sonuçları



## 4.2. Toplam Kütikular Melanizasyon

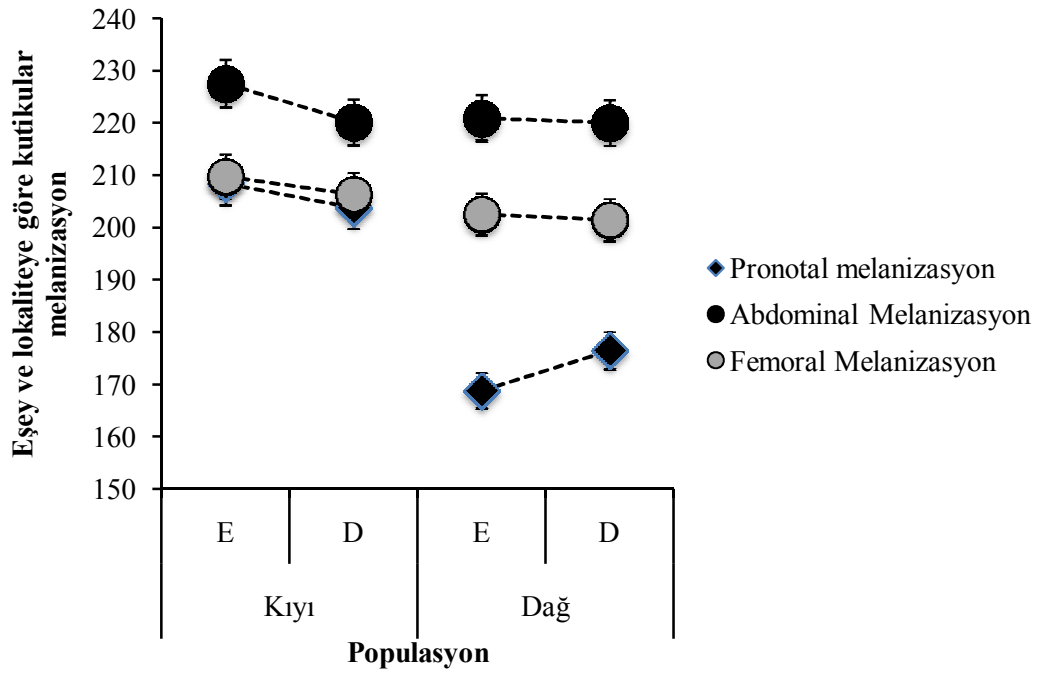
Pronotum, abdominal tergit ve arka femur dorsalinden ölçülen kutikular melanizasyon için PCA ile belirlenen kombine melanizasyon kıyı ve dağ popülasyonunda karşılaştırılmış ve beklenilenin aksine belirgin bir şekilde kıyı popülasyonunda daha yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1, Şekil 4.9). Kurulan istatistiksel modele göre her iki popülasyondaki melanizasyon farklılığını eşey farklılığı ve vücut büyüklükleri de belirlemiştir (Çizelge 4.1). Bu farklılığı ortaya çıkaran asıl nedenin pronotal melanizasyonun dağ popülasyonunda kıyı popülasyonuna göre her iki eşey için de oldukça küçük düzeyde olması belirlemiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.10). Ancak toplam melanizasyonu skorunun dağ popülasyonunda eşeyler arasında farklı olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.3). Pronotal melanizasyon her iki popülasyondaki tüm eşeyler arasında önemli derecede farklılık göstermiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.10). Abdominal melanizasyon bakımından kıyı erkek popülasyonunun diğer eşeylerin tamamından daha yüksek skorda olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.3). Diğer parametreler arasında her iki popülasyonda bir farklılığın olmadığı anlaşılmıştır. Yapılan analiz arka femur kutikular melanizasyonu açısından dağ popülasyonundaki eşeylerin kendi aralarındaki durum hariç diğer eşeyler arasında önemli derecede fark olduğunu bildirmiştir (Çizelge 4.3). Kıyıdaaki popülasyon daha melanik femura sahiptir (Şekil 4.3).



Şekil 4.9. Kıyı ve dağ populasyonları arasındaki kütikular melanizasyonun gösterimi (Tüm dişi ve erkekler dahil)

**Çizelge 4.3.** Toplam kütikular melanizasyon ile humoral ve hücrel immün veriler arasındaki ilişkiyi gösteren çizelge.

| <b>Değişkenler</b>                                      | $\beta$ | t      | P                |
|---|---------|--------|------------------|
| <b>Toplam PO</b>  |         |        |                  |
| Model   |         | -3.39  | <b>0.001</b>     |
| Enkapsülasyon   | 0.219   | 2.34   | <b>0.021</b>     |
| Litik aktivite  | 0.020   | 0.22   | 0.829            |
| Protein   | -0.038  | -0.39  | 0.699            |
| <b>Toplam PO</b>  |         |        |                  |
| Model   |         | 3.304  | <b>0.001</b>     |
| Pronotal melanizasyon                                   | -0.323  | -4.171 | <b>&lt;0.001</b> |
| Abdominal melanizasyon                                  | 0.020   | 0.27   | 0.786            |
| Femoral melanizasyon                                    | -0.001  | -0.01  | 0.992            |
| Pronotum uzunluğu                                       | 0.166   | 2.01   | <b>0.045</b>     |
| Arka femur uzunluğu                                     | -0.321  | -3.30  | <b>0.001</b>     |
| <b>Toplam PO</b>  |         |        |                  |
| Model   |         | -60.46 | <b>&lt;0.001</b> |
| Toplam melanizasyon*                                    | -0.389  | -6.83  | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>Protein</b>  |         |        |                  |
| Model   |         | 1.25   | 0.214            |
| Enkapsülasyon   | 0.211   | 2.30   | <b>0.024</b>     |
| LY aktivite   | 0.229   | 2.50   | <b>0.014</b>     |
| PO aktivitesi   | -0.42   | -0.45  | 0.654            |
| <b>Litik Aktivite</b>                                   |         |        |                  |
| Model   |         | -3.73  | <b>&lt;0.001</b> |
| Abdominal melanizasyon                                  | 0.213   | 2.34   | <b>0.021</b>     |
| Pronotal melanizasyon                                   | -0.027  | -0.27  | 0.786            |
| Femoral melanizasyon                                    | -0.166  | -1.77  | 0.079            |
| Arka femur uzunluğu                                     | -0.124  | -1.36  | 0.178            |
| <b>Enkapsülasyon</b>                                    |         |        |                  |
| Model   |         | 13.70  | <b>&lt;0.001</b> |
| Pronotal melanizasyon                                   | -0.421  | -6.35  | <b>&lt;0.001</b> |
| Abdominal melanizasyon                                  | 0.170   | 2.56   | <b>0.011</b>     |
| Femoral melanizasyon                                    | -0.000  | -0.005 | 0.996            |
| * PCA analizinden elde edilen toplam melanizasyon skoru |         |        |                  |



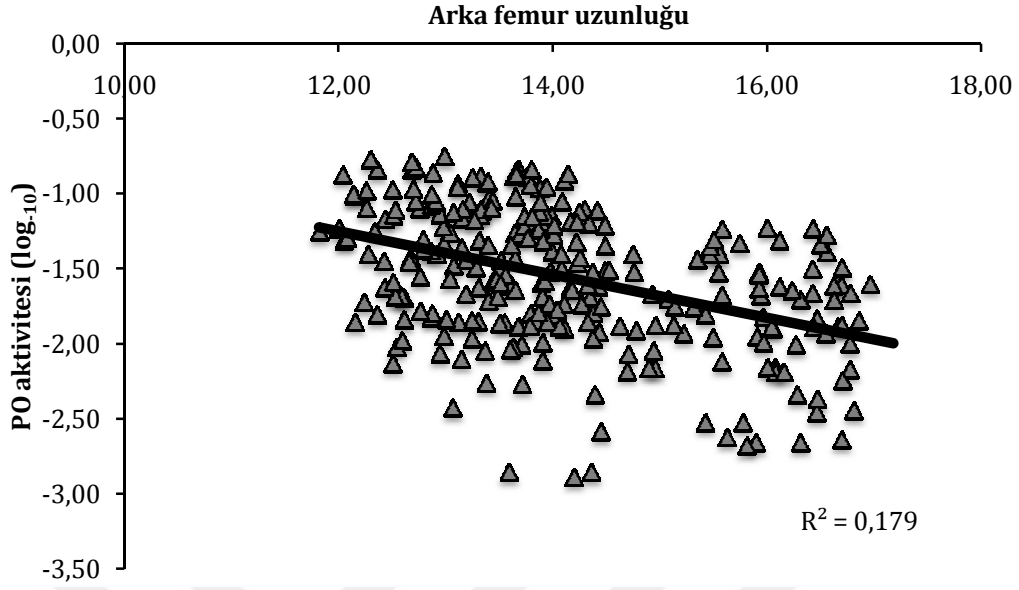
**Şekil 4.10.** Kıyı ve dağ populasyonlarındaki dişi ve erkek bireylerin kütikular melanizasyon farklılıkları

Her iki popülasyondan elde edilen tüm verilere göre; analizde PO (log) aktivitesi response (bağımlı değişken) olarak girilmiştir. LY aktivite (log), hemolimfteki protein konsantrasyonu (log) ve enkapsülasyon ise prediktör değişken olarak analize sokuldu. Stepwise regresyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar şöyle. PO aktivitesi enkapsülasyon ile pozitif ilişki göstermektedir ( $r= 0,22$ , tüm parametreler için  $n= 110$ ). Hemolimfteki protein konsantrasyonunun hem LY aktivite hem de enkapsülasyonla pozitif yönde ilişkisi olduğu bulunmuştur ( $r= 0,32$ ,  $n=110$ ). Enkapsülasyonun kütikular melanizasyonla olan ilişkisini anlamak için modele pronotal, abdomen ve arka femurdan alınan melanizasyon değerleri prediktör olarak girildi ( $n= 247$ ). Pronotal melanizasyon ile abdominal melanizasyon enkapsülasyon ile ilişkili bulunmuştur ( $r= 0,38$ ). PO aktivitesi ile vücuttan farklı kısımlardan alınan kütikular melanizasyon verileri ve iki temel vücut ölçüsü ile olan ilişkisi üzerine kurulan modelde ( $n= 229$ ) PO aktivitesinin pronotal melanizasyon ile negatif ilişki gösterdiği ancak pronotal uzunluğu ile pozitif ilişki gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan femoral ve abdominal melanizasyon ile ilişkisi yokken arka femur uzunluğu ile güçlü bir şekilde negatif ilişki saptanmıştır ( $r= 0,50$ ). Analiz PO aktivitesi ile PCA'dan elde edilen genel melanizasyon arasında güçlü bir negatif ilişki ortaya koymuştur ( $r= 0,39$ ,  $n=264$ ). LY aktivite pronotal, abdominal ve femoral

melanizasyonlar olan ilişkisi araştırılmış ve analize arka femur uzunluğu vücut ölçüsü olarak dahil edilmiştir (n= 118). Stepwise analiz ilişkiyi en iyi açıklayan parametre olarak abdominal melanizasyonu belirlemiştir (r=0,21).

#### **4.3. İmmün Parametreler, Kütikular Melanizasyon ve Vücut Büyüklüğü Arasındaki İlişkiler**

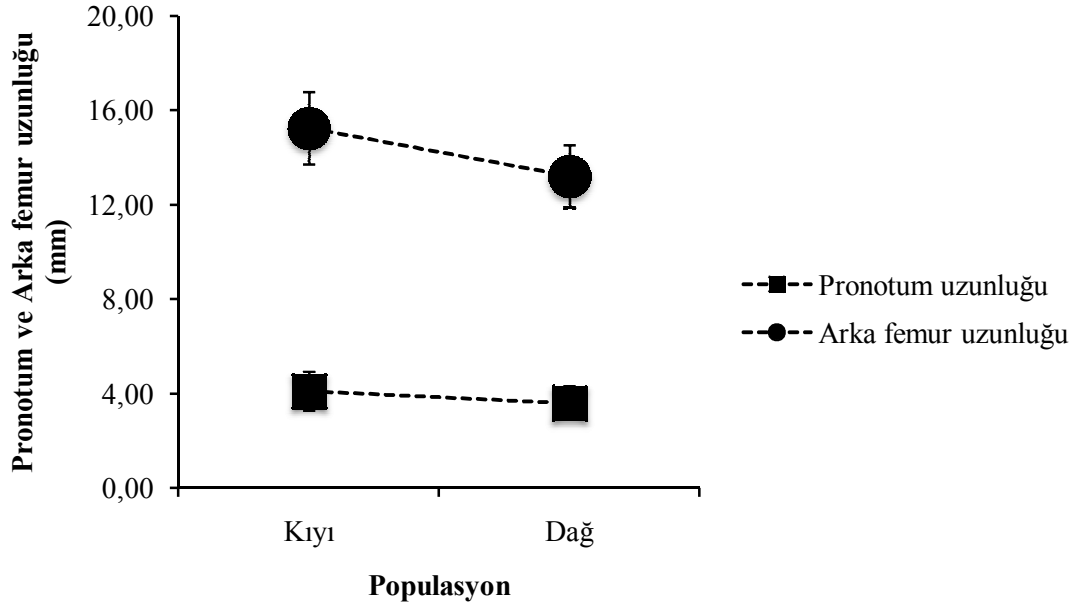
Hemolimfteki toplam PO aktivitesi ile LY aktivite ve hemolimfteki protein konsantrasyonu arasında önemli bir ilişki bulunmamıştır (Çizelge 4.3). Ancak enkapsülasyon yeteneği ile pozitif bir ilişki gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.3). Daha yüksek PO aktivitesine sahip bireyler daha yüksek bir enkapsülasyon yeteneğine sahiptir. PO aktivitesi ile pronotal ve arka femur uzunluğu arasında negatif bir ilişki saptanmış (Çizelge 4.3, Şekil 4.11 ), ancak bu ilişkinin pronotal uzunluğu ile pozitif olduğu belirlenmiştir. PCA ile elde edilen toplam melanizasyon skoru ile PO aktivitesi belirgin bir şekilde negatif ilişki gösterdiği bulunmuştur. Hemolimfteki protein konsantrasyonunun PO aktivitesi ile herhangi bir ilişkisi yokken, enkapsülasyon ve LY aktivite ile pozitif yönde bir ilişkisi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3). LY aktivite sadece abdominal melanizasyon ile pozitif ilişki göstermiştir. Vücut büyüklüğü ile LY aktivitenin herhangi bir ilişkisi bulunamamıştır (Çizelge 4.3). Enkapsülasyon yeteneği litik aktivite gibi abdominal melanizasyon ile pozitif bir ilişki göstermiştir. Enkapsülasyon yeteneğinin PO aktivitesi gibi güçlü bir şekilde pronotal melanizasyon ile ters bir ilişkiye sahip olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 4.3).



**Şekil 4.11.** Kıyı ve dağ popülasyonlarındaki bireylerin arka femur uzunluğu ile PO aktivitelerinin karşılaştırılması

#### 4. 4. Vücut Ölçüleri ve Kütikular Melanizasyon Arasındaki İlişkiler

Her iki popülasyon birlikte değerlendirildiğinde Pairwise analizi pronotum uzunluğu ile pronotal ve arka femur uzunluğu arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.12). Pronotal melanizasyon pronotum ve arka femur uzunluğu ile birlikte abdominal ve femural melanizasyon ile pozitif bir ilişkiye sahip olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.4). Beklenildiği gibi daha melanik femura sahip bireylerin daha uzun femura sahip olduğu, ve daha melanik pronotum ve abdomene sahip olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 4.4). Erkek ve dişi bireyler arasındaki vücut büyüklüğü farkı (eşeyssel dimorfizm) ile PO aktivitesi ve enkapsülasyon yeteneği arasında da ilişki saptanmıştır. Beklenenin aksine dişi bireylerin erkek bireylere göre daha az PO aktivitesine ve enkapsülasyon yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır. Daha iri erkekler daha az PO aktivitesine ve enkapsülasyon yeteneğine sahiptir (Lineer regresyon; sırasıyla  $F= 25, 62$ ;  $df=134$ ;  $p<0,001$ ;  $F=7,03$ ,  $df=126$ ;  $p=0,009$ , bu ilişki oldukça zayıftır). Benzer ancak daha güçlü bir şekilde daha büyük dişiler daha az PO aktivitesi ve enkapsülasyon yeteneğine sahip oldukları saptanmıştır (Lineer regresyon; sırasıyla  $F= 51, 11$ ,  $df= 136$ ,  $p<0,001$ ;  $f= 59,53$ ,  $df=127$ ,  $p<0,001$ ).



Şekil 4.12. Kıyı ve dağ populasyonlarında diş ve erkek bireylerin pronotum ve arka femur uzunluğu

Çizelge 4.4. Vücut büyüklükleri ile kütikular melanizasyon arasındaki ilişkiler (Pairwise analizi).

|                        | Pronotum uzunluğu (mm) | Arka femur uzunluğu | Pronotal Melanizasyon n | Abdominal melanizasyon n | Femoral melanizasyon n |
|------------------------|------------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|
| Pronotum uzunluğu (mm) |                        | <0.001 (270)        | <0.001 (289)            | 0.080 (296)              | 0.219 (289)            |
| Arka femur uzunluğu    | <0.001 (270)           |                     | <0.001 (268)            | 0.327 (276)              | <0.001 (274)           |
| Pronotal Melanizasyon  | <0.001 (289)           | <0.001 (268)        |                         | <0.001 (295)             | <0.001 (286)           |
| Abdominal melanizasyon | 0.080 (296)            | 0.327 (276)         | <0.001 (295)            |                          | <0.001 (292)           |
| Femoral melanizasyon   | 0.219 (289)            | <0.001 (274)        | <0.001 (286)            | <0.001 (292)             |                        |

#### 4.4. Kütikular Melanizasyon ve İki Farklı Populasyondaki Eşeyler Arasındaki İlişkiler

Pronotal melanizasyon tüm eşeyler arasında farklılık gösterdiği anlaşılmıştır. Kıyı popülasyonu daha melaniktir (Çizelge 4.5). Kıyı popülasyonundaki erkek bireylerin abdominal melanizasyon açısından diğer eşeylerin tamamından daha melanik olduğu bulunmuştur. Dağ popülasyonundaki erkek ve dişi bireylerin kendi arasındaki durum hariç diğer eşeylerle belirgin olarak farklılık gösterdiği anlaşılmış ve daha açık renklenmeye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Toplam melanizasyon dağ

popülasyonunda eşeyler arasında önemli bir farklılık göstermezken, diğer eşeyler arasında ve popülasyonlar arasındaki farklılığın önemli olduğu saptanmıştır.

**Çizelge 4.5.** K1y1 ve dağ popülasyonundaki erkek ve dişilerin pronotum, abdomen ve arka femur kutikular melanizasyonlarına ilişkin karşılaştırma (K1y1; Erkek: 65, Dişi: 60; Dağ; Erkek: 74, Dişi: 79/kE= K1y1 Erkek, kD= K1y1 Dişi, dE= Dağ Erkek, dD= Dağ Dişi).

| Değişkenler<br>(Doğrulanmış Model) | Mean<br>Square   | df               | F                | p                |
|------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Pronotal melanizasyon</b>       | 26664.25         | 3                | 545.69           | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>Abdominal melanizasyon</b>      | 855.47           | 3                | 34.89            | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>Femoral melanizasyon</b>        | 1344.71          | 3                | 39.06            | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>Kombine melanizasyon</b>        | 60.44            | 3                | 198.09           | <b>&lt;0.001</b> |
| Tukey Testi                        |                  |                  |                  |                  |
| Pronotal Melanizasyon              |                  |                  |                  |                  |
|                                    | kE               | kD               | yE               | yD               |
| <b>kE</b>                          | --               | <b>&lt;0.002</b> | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>kD</b>                          | <b>&lt;0.002</b> | --               | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>yE</b>                          | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> | --               | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>yD</b>                          | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> | --               |
| Abdominal Melanizasyon             |                  |                  |                  |                  |
|                                    | kE               | kD               | yE               | yD               |
| <b>kE</b>                          | --               | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>kD</b>                          | <b>&lt;0.001</b> | --               | 0.982            | 0.945            |
| <b>yE</b>                          | <b>&lt;0.001</b> | 0.982            | --               | 0.756            |
| <b>yD</b>                          | <b>&lt;0.001</b> | 0.945            | 0.756            | --               |
| Femoral Melanizasyon               |                  |                  |                  |                  |
|                                    | kE               | kD               | yE               | yD               |
| <b>kE</b>                          | --               | <b>0.001</b>     | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>kD</b>                          | <b>0.001</b>     | --               | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>yE</b>                          | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> | --               | 0.901            |
| <b>yD</b>                          | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> | 0.901            | --               |
| Kombine Melanizasyon               |                  |                  |                  |                  |
|                                    | kE               | kD               | yE               | yD               |
| <b>kE</b>                          | --               | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>kD</b>                          | <b>&lt;0.001</b> | --               | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>yE</b>                          | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> | --               | 0.604            |
| <b>yD</b>                          | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> | 0.604            | --               |

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Termal melanin hipotezi büyük vücutlu veya daha soğuk çevreden gelen ektotermlerin sıcak çevreden gelen emsallerine göre daha koyu kutikulaya sahip olduklarını iddia eder (Majerus, 2000; Trullas ve ark., 2007; Kutch ve ark., 2014). Kütikula renklenmesindeki termal modifikasyon genetik korelasyonun bir sonucu olarak melanin temelli bağışıklığı etkileyecektir. Bu çalışmada Ordu ilinde yayılış gösteren *Poecilimon similis* türünün kıyı ve yüksek dağ populasyonlarındaki humoral ve hücrel immün aktiviteleri karşılaştırılmış, yüksek dağ populasyonlarında daha güçlü bir immün aktivitenin olması gerektiği sorgulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, termal düzenlemeye bağlı immün yatırım hipotezini bir dereceye kadar desteklerken, kutikula renklenmesi anlamında tersi bir durum bulunmuştur. Bulgular, PO aktivitesinin ve enkapsülasyon yeteneğinin yüksek dağ populasyonunda daha yüksek olduğunu gösterirken, LY aktivitenin önemli bir farklılığa sahip olmadığını göstermiştir. Bunun ötesinde, vücut büyüklüğü (pronotumun arka femur uzunluğuna oranı) toplam melanizasyon ve enkapsülasyon üzerinde etkili olmuştur. Arka femur uzunluğu ile hem PO aktivitesi hem de enkapsülasyon negatif ilişki göstermiştir. LY aktivite vücut büyüklüğünden etkilenmemiştir.

Yapılan çalışmanın sonuçlarına göre toplam PO aktivitesi yüksek dağ bölgesinden toplanan bireylerde kıyı bölgesinden toplanan bireylere göre daha yüksek görülürken; total lizozim aktivitesi tam tersi bir eğilim göstermiştir. Farklı sıcaklıklarda yetiştirilen *Gryllus texensis* bireyleri üzerinde yapılan bir çalışmada ise PO ve LY aktivite birbiriyle pozitif bir ilişki göstermiş ve sıcaklık artışına paralel olarak her iki aktivitenin de yükseldiği gözlenirken bireylerin patojene karşı verdiği immün tepkiler soğuk ortamda yetiştirilen bireylerle karşılaştırıldığında daha sıcak ortamda yetiştirilenlerde daha güçlü bir yanıt oluşturmuştur (Adamo ve Lovett, 2011). Aynı türün kullanıldığı bir diğer çalışmada da PO ve LY aktivitesi anlamlı bir ilişki gösterirken ölen ve hayatta kalan bireyler arasındaki LY aktivite arasında bir farklılık görülmemiştir (Adamo, 2004). Bu durumda toplam PO ve LY aktivitesinin bu türün bireylerinde hastalık direncini hesaplayabilme yeteneği sorgulanmalıdır (Adamo, 2004; Adamo ve Lovett, 2011). Ölen ve yaşama başarısı gösteren bireylerin LY aktiviteleri arasında fark olmaması, LY aktivitenin bağışıklık parametrelerinde bir ölçüt olmakta tek başına yeterli olmayabileceğini düşündürmektedir.



Çalışmamıza benzer hipotezlerle yapılan bu çalışmaların bir kısmı termal melanin hipotezini desteklerken yani LY aktivite için bizim sonuçlarımızla ters bir sonuç verirken bir kısmı da bizim sonuçlarımızla paralel olarak LY aktivitenin tek başına bir bağışıklık belirleyicisi olamayabileceğine işaret etmektedir. Buna ek olarak PO ve LY aktivite türe özgü bir immün yanıt da sergileyebilir ve aynı zamanda bireylerin yetiştirildiği ortam, beslenme, predatordan kaçınma ve fiziksel aktivite ile çeşitlilik gösterebilir (Berggren, 2010).

*Drosophila melanogaster* (Diptera) türünde sıcaklığın termoregülasyon stratejisi ile immün parametreler üzerindeki etkileri incelenmiş ve sıcak ortamda yetiştirilen bireylerin daha açık kütikulaya sahip ve daha yüksek patojen hassasiyetine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar da bizim bulgularımızla paralel olarak şunu göstermektedir: Termal düzenleme stratejisi ile bağışıklık arasında pozitif bir ilişki vardır (Kutch ve ark., 2014).

Yüksek ve alçak bölgedeki populasyonlarda test edilen enkapsülasyon immün yanıtının sonuçlarına bakacak olursak; kıyı bölgesindeki bireyler dağlık bölgeden toplanan bireylere göre daha düşük bir enkapsülasyon yanıtı göstermiştir. Yapılan birçok çalışma bu verilerimizi desteklemektedir (Örnek: *Lycaena tityrus*, Karl ve ark., 2010; *Allonemobius socius*, Fedorka ve ark., 2013). Bu sonuçlar farklı iklimlerde lokal adaptasyonlar olduğunu gösterir yani termal çevre ektodermilerin patojen direncinde indirek bir rol oynar.

Yapılan birçok çalışmada sıcaklık ve melanizasyon bireylerin çevreyle olan uyumları, desikasyon direnci, eşeysel seçilim, vücut büyüklüğü ve immün parametreler üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Örnek: Trullas ve ark., 2007; Parkash ve ark., 2008; Kutch ve ark., 2014).

Çalışma sonucunda elde ettiğimiz bulgulara göre PO aktivitesi hem kıyı hem de dağ bölgesindeki populasyonlarda eşey farklılığından etkilenmemiştir. LY aktivite ise yüksek populasyonda eşey farklılığından etkilenmezken, kıyı populasyondaki erkek bireylerde dişi bireylere göre daha yüksek olduğu ölçülmüştür. Aynı şekilde hemolimftteki protein konsantrasyonu ve enkapsülasyon skoru sadece kıyı populasyonunda erkeklerde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Kıyı

populasyonundaki bu iki immün parametredeki eşeyssel farklılık genel beklenti olan “dişilerde immün tepkilerin erkeklere göre daha güçlü” olduğu şeklindeki hipoteze uygunluk göstermez (bkz. Rolff, 2002; Zuk ve Stoehr, 2002). Bu sonuçlar bize farklı türlerde ve farklı ekolojik koşullarda (sıcaklık, nem, besin bulunabilirliği, beslenme tipi, predasyon, populasyon yoğunluğu vs.) bağışıklık parametrelerinin genel beklentilere uygunluğu değiştirebileceğine işaret etmektedir. Dolayısıyla, bu durum PO ve LY aktivitesi arasında bir takas olabileceğini düşündürmektedir. *Anabrus simplex* (Orthoptera) türünün bireyleri üzerinde yapılan bir çalışma da bu verilerimizi desteklemektedir (Bailey, 2011). Yüksek dağ populasyonlarında erkek ve diş arasında immün parametrelerin tamamında herhangi bir farklılık olmayışı, daha soğuk çevrede yetişen populasyonların daha keskin çevresel etkenlere maruz kalmaları nedeniyle, büyüme, termal düzenleme gibi fizyolojik süreçlerin daha makul bölgelerdeki (kıyı) populasyonlardan farklılıklar gösterebileceği şeklinde yorumlanabilir. Bu durum termal çevre farklılığının böcek melanizasyonundaki etkisinin oldukça karmaşık olduğuna işaret eder. Bazı durumlarda sıcak habitatlarda yaşayan bireylerin soğuk olanlara göre daha melanik olduğuna ilişkin bulgular da vardır (Rajpurohit ve ark., 2008). Hatta tropiklerde çok sayıda melanik morflara rastlamak mümkündür (Yin ve ark., 2015). Dolayısıyla böceklerde vücut renklenmesini birden fazla ekolojik faktörün etkilediğini belirtmek gerekir (Wittkopp ve ark., 2003). *Hemideina* (Orthoptera: Anostostomidae) türleri üzerinde yapılan bir çalışmada; yüksek dağ türlerinin alçak bölgelerde yayılış gösteren türlerden daha az su kaybı riskiyle karşı karşıya olduğu bildirilmiştir (King ve Sinclair, 2015). Yani dağ türlerinde su kaybı direnci artmakta ve dolayısıyla su kaybı oranı azalmaktadır. Metabolik oran dağ türlerinde kıyıdaakilere göre anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunmuştur. Soğuk iklimlerde yaşayan çekirgelerde metabolizmanın arttığı bir çok çalışmada tespit edilmiştir (Booth ve Kiddell, 2007). Çünkü, gelişim sezonunun az olması ve soğuk çevre metabolizmayı hızlandırır. Ancak metabolizma yüksek ve alçak bölgelerde yayılış gösteren benzer diğer türlerde anlamlı değişkenlik göstermez. Dolayısıyla, fizyolojik parametreler farklı çevre koşullarının etkisiyle biyokimyasal yollardaki olası “takas” durumu populasyonlar arasında varyasyona yol açabilmektedir.

Yine farklı Arthropod türlerinde yapılan çalışmalarda eşeyler arasında immün parametrelerde farklılık olup olmadığına bakılmış ve birçok çalışma erkeklerin dişilere oranla immün açıdan daha zayıf olduklarını ortaya koymuşsa da böyle bir farkın olmadığını destekleyen çalışmalarda ortaya koyulmuştur. (Dişi>Erkek: Örnek: Gray, 1998; Kurtz ve ark., 2000; Rolff, 2001; Siva-Jothy ve ark., 2001; Rolff, 2002. Böyle bir ilişki yok: Gillespie ve Khachatourains, 1992; Yourth ve ark., 2001; Rantala ve Roff, 2005; Triggs ve Knell, 2012).

Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre termal melanin hipotezinin aksine alçak bölgeden toplanan bireylerde kütikular melanizasyon yüksek bölgeden toplanan bireylere göre önemli derecede daha yüksek ölçülmüştür. Bu durum *Saccharosydne procerus* (Homoptera) türünde termal melanizmi test etmek için yapılan bir çalışmada da daha yüksek bölgelerden toplanan bireylerde toplam PO aktivitesi daha yüksek bulunurken kütikular melanizasyon bizim bulgularımızla benzer olarak alçak bölgede yaşayan bireylerde daha yüksek bulunmuştur (Yin ve ark., 2015). Yukarıda da değinildiği gibi, daha sıcak olan tropiklerde çok sayıda melanik morflara rastlamak mümkündür (Yin ve ark., 2015). Bu durum termal melanin hipotezinin melanikleşmenin sebebini sadece tek yönlü olarak açıklayamayacağı anlamına gelmektedir. Çünkü melanizasyon mekanizması böcek bağışıklığında oldukça karmaşık bir yolaktır. Bu tez çalışması sonuçlarına göre, daha sıcak olan kıyı bölgesindeki erkek ve dişilerin dağ popülasyonuna göre daha melanik olduğu ve bu durumun da Yin ve ark. (2015), bulgularına uyumluluk gösterdiği söylenebilir. Ancak, soğuk çevrede büyütülen popülasyonların sıcak çevredekilere göre daha koyu kutikulaya sahip oldukları yönünde de bir çok araştırma sonucu vardır (Örn. *A. socius*, Fedorka ve ark., 2013; *D. melanogaster*, Kutch ve ark., 2014). Farklı yaşam döngüleri, metabolik gelişim, başkalaşım farklılıkları gibi faktörler türler veya gruplar arasında farklı uyumsal sonuçlar ortaya koyabilir.

Elde ettiğimiz bulgulara göre her iki popülasyondaki melanizasyon farklılığını eşey farklılığı ve vücut büyüklükleri de belirlemiştir. Bu farklılığı ortaya çıkaran asıl nedenin pronotal melanizasyonun dağ popülasyonunda kıyı popülasyonuna göre her iki eşey için de oldukça küçük düzeyde olması belirlemiştir. Buna karşın farklı türler üzerinde yapılan birçok çalışma da termal melanin hipotezini desteklemektedir

(*Lycaena tityrus* ve *Lycaena hippothoe*, Fischer ve Karl, 2010; farklı *Drosophila* türleri, Parkhas ve ark., 2011; *Phaulacridium vittatum*, Harris ve ark., 2013). Bu sonuçlar bizim bulgularımızla bağdaşmamaktadır ancak abdominal melanizasyon için; bireylerin fenotiplerinin çevre ile ilişkisinden kaynaklanıyor olabileceğini ve türlerin farklılaşmasının altında yatan sebebin adaptif fenotip olabileceği düşünülüyor. Yani bu farklılığın termal adaptasyon ve mevsimsel zaman baskısı nedeniyle olduğu düşünülüyor (Fischer ve Karl, 2010; Parkhas ve ark., 2011).

Daha soğuk bölgelerde yaşayan bireylerin daha melanik olduğu ve bunun da bireylere avantaj sağladığı düşünülmektedir. Daha önce de ifade edildiği gibi, melanizasyon ile patojenlere karşı savunmada rol oynayan PO yolağı benzerlik gösterir. Örneğin, *Tenebrio molitor* (Coleoptera) türünün bronz ve melanik bireylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada da melanik bireylerin bronz bireylere göre daha yüksek PO aktivitesine sahip olduğu ölçülmüştür (Armitage ve Siva-Jothy, 2005). Bu sonuçlar bizim bulgularımızla örtüşmemekte ve kütikula renginin melanin üretimine bağlı olması nedeniyle hemosit içinde inaktif formda sunulan PO enziminin melanizasyonda aktif rol oynadığı bu nedenle de melanizm ve PO aktivitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür (Armitage ve Siva-Jothy, 2005). Bu bulgunun aksine *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera) türünde yapılan benzer bir çalışmada da melanik ve melanik olmayan bireyler arasında PO aktiviteleri karşılaştırılmış ve melanik bireyler melanik olmayan bireylere göre daha düşük PO aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır (Cotter ve ark., 2008). Bu bulgu bizim çalışmamızdaki sonuçlarla örtüşmektedir. Bu durum melanizmin genetik bir bileşen olduğu ve genetik olarak melanizm ile PO aktivitesi ve diğer temel fizyolojik parametreler arasında bir uzlaşımın (trade-off) söz konusu olduğu şeklinde açıklanmıştır (Cotter ve ark., 2008). Benzer şekilde *Tenebrio molitor* (Coleoptera) türünün bireylerinde yapılan bir çalışmada da sıcaklık artışı ile enkapsülasyon yeteneği azalırken kütikula melanizminde bir artış gözlenmiştir (Prokkola ve ark., 2013). Bu sonuçlarda çalışmamızla paralel bir ilişki göstererek verilerimizi desteklemektedir. Bu analizler gösteriyor ki; melanine yapılan yatırımlar yaşam süresi, morfolojik ve fiziksel yanıtlar üzerinde varyasyona yol açabilmektedir (Prokkola ve ark., 2013). Beslenme veya diyet farklılıklarının da melanizasyon ve bağışıklık üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Örnek: Lee ve ark., 2008). Diamond

ve Kingsolver (2011), *Manduca sexta* (Lepidoptera) bireyleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada besin kalitesinin büyüme oranına ve immün savunma sisteminde etkin bir rolünün olup olmadığını test etmişlerdir. Elde ettikleri bulgulara göre, besin kalitesi yüksek tutulan popülasyonlarda düşük kaliteli besin ile beslenen popülasyonlara oranla daha yüksek büyüme oranı, melanizasyon ve enkapsülasyon yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur. Ancak, protein diyeti tüm immün fonksiyonlar üzerinde aynı etkiyi göstermez. Bu tez çalışmasında olası diyet farklılıklarının bağışıklık parametreleri üzerindeki etkisini gidermek için, tüm bireyler aynı tip besinle beslenmiştir. *Malacosoma disstria* (Lepidoptera) türünde yapılan bir çalışmada polimorfik melanizmin genetik temeli olup olmadığı araştırılmış ve elde edilen sonuçlar beslenmenin de melanizasyon üzerinde etkili olmadığını göstermiştir. Bulunan sonuçlara göre araştırmacılar melanizasyonun genetik temelli de olabileceğini ileri sürmüştür (Ethier ve Despland, 2011). Farklı kutikula renklenmesi ile bağışıklık parametreleri arasında her hangi bir ilişkinin saptanamadığı bulgular da vardır. Örneğin, *Metrioptera roeseli* (Orthoptera) türünün iki farklı renk morfundu (kahverengi ve yeşil) immün parametreler karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu durum yeşil kutikula renginin oluşturulmasının kahverengi rengin oluşturulmasından daha maliyetli olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Berggren, 2010). Yani farklı renk morflarının oluşumu farklı bireylerde maliyet bakımından değişiklik gösterebilir ve bu da farklı immün tepkiler arasındaki takas farklılıklarını ortadan kaldırabilir. *P. similis*'te kıyı ve dağ popülasyonları arasında LY aktivitenin farklılık göstermemesi hem kutikula renklenmesindeki maliyetlerden kaynaklanan uzlaşmaya hem de vücut büyüklüğünün PO ve enkapsülasyon ile negative ilişkiye sahip olmasına bağlanabilir. Vücut büyüklüğü *P. similis*'te dağ popülasyonunda daha küçüktür. Bu durum Bergman Kuralı'na ters bir durum ortaya koymaktadır (bkz. *Poecilimon veluchianus*, Eweleit ve Reinhold, 2014). Dağ popülasyonlarında PO ve enkapsülasyonun yüksek olması bireyler açısından bir maliyet oluşturmakta, ve bu durumda LY aktivite kıyı popülasyonu ile hemen hemen aynı düzeyde tutulmaktadır.

Kutikular melanizm ile kuruma direnci arasında da ilişki vardır. *Hemideina* (Orthoptera: Anostostomidae) türleri üzerinde yapılan bir çalışmada; yüksek dağ türlerinin ve alçak bölgelerde yayılış gösteren türlerden daha az su kaybı riskiyle karşı karşıya olduğu bildirilmiştir (King ve Sinclair, 2015). Yani dağ türlerinde su

kaybı direnci artmakta ve dolayısıyla su kaybı oranı azalmaktadır. Kurakcıl bölgelerde yayılış gösteren böceklerde kutikular su kaybı indirgenmiştir. Ancak, melanik *Drosophila* morfları melanik olmayanlara göre daha çok yüksek alanlarda (kuruma riskinin yüksek olduğu çevre) bulunur (Parkash ve ark., 2008b). Ancak *Drosophila*'daki model *P. similis*'e uymamaktadır. Kıyı bölgesindeki populasyon yüksek dağ populasyonuna göre daha melaniktir. Bu durum *Hemideina maori* türündeki bulguya uygunluk göstermektedir (King ve Sinclair, 2015) ve melanizasyon-kuruma direnci hipotezine uyum göstermez. Aynı türe su kaybı parametreleri eşeyler arasında da farklılık göstermemiştir. Bu durumun nedeni eşeyler arasındaki vücut büyüklüğü oranı veya başkalaşım/yaşam süresi ile ilgili olabilir (King ve Sinclair, 2015).

*Drosophila melanogaster* (Diptera) bireyleri ile yapılan bir diğer çalışmada ise yabani (8 farklı populasyon) ve laboratuvar ortamında yetiştirilen populasyonlardaki bireylerin vücut melanizasyonları karşılaştırılmıştır. Elde ettikleri sonuçlar gösteriyor ki; yabani populasyonlar daha geniş bir melanizasyon çeşitliliği göstermiştir. Buna ek olarak daha melanik bireylerin daha yüksek su tutma direnci, daha uzun çiftleşme süresi, daha düşük oranda su kaybetme ve daha yüksek verimliliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum yabani populasyonlardaki esnekliğin daha güçlü olduğunu ileri sürer. Fakat bu sonuçların esneklik etkisinin yanı sıra genetik etkilerin de etki edebileceğini ileri sürer. Vücut melanizasyonundaki yüksekliğe bağlı değişiklikler soğuk veya daha kuru iklimsel koşullar tarafından oluşturulan seçim baskısına karşı genetik bir cevabı temsil ediyor olabilir (Parkhas ve ark., 2008). Bu nedenle biz de çalışmamızda kullandığımız bireyleri habitatlarından topladıktan hemen sonra deneylerimizi başlatarak laboratuvar ortamında meydana gelebilecek, kütikula melanizmindeki herhangi bir farklılığa neden olabilecek etkenleri en düşük seviyeye indirdik.

*Hemideina maori* (Ortoptera) türünün poliformik bireylerinde kütikular melanizasyon ile immün savunma sağlayıcı parametreler arasındaki ilişki incelenmiş ve kütikular renklenmenin immün parametreler üzerinde etkili olmadığı gösterilmiştir (Robb ve ark., 2003). Bizim sonuçlarımız da PO aktivitesi kütikula melanizmiyle negatif bir ilişki gösterirken LY aktiviteyle pozitif bir ilişki

göstermiştir. Bu sonuçlara gösteriyor ki kütikular melanizm ve immün parametreler arasındaki ilişki her zaman anlamlı olmayabilir ve türe özgü bağışıklık yanıtının bir sonucu da olabilir. Melanizme bağlı enkapsülasyon derecesi bağışıklığı yansıtabilir ve böceklerde daha çok tercih edilen bir savunma olabilir. Ya da lokal yoğunluk altında verilen bir cevap olabileceği ve tam bir bağışıklık yanıtı olmayabileceği de düşünülebilir (Robb ve ark., 2003).

Bulgularımız beklenildiği gibi daha melanik femura sahip bireylerin daha uzun femura sahip olduğu, ve daha melanik pronotum ve abdomen sahip olduğu anlaşılmıştır. Daha iri erkekler daha az PO aktivitesine ve enkapsülasyon yeteneğine sahiptir. Çağlar ve arkadaşları (2014), *Isophya rizeensis* (Orthoptera) türünün farklı yükseltilerdeki popülasyonlardan toplanan erkek bireylerin vücut büyüklüğü ile coğrafik varyasyon arasındaki ilişkisini incelemişlerdir. Aynı araştırmacılar hem yüksek hem alçak bölgelerde su tutma direncinin, nem ve sıcaklığın vücut büyüklüğü üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar da gösteriyor ki, bireylerin fizyolojik ve moleküler bir takım yolakları arasında bir uzlaşma söz konusudur. Ayrıca bu yolaklar birçok ekolojik faktörden de etkilenmektedir.

### **5.1. Genel Sonuç:**

Bu tezin sonuçları genel olarak “yüksek veya daha soğuk bölgelerde yayılış gösteren popülasyonların bazı immün cevaplarının daha yüksek olacağına” ilişkin hipoteze destek vermektedir. Ancak, bu duruma çalışmada analiz edilen immün parametrelerden LY aktivite uygunluk göstermemiştir. Diğer taraftan “yüksek dağ popülasyonlarında PO aktivitesinin yüksekliği ile çekirgede daha yüksek bir melanizasyon” olması beklentisi, elde edilen sonuçlarla çatışma göstermiştir. Kıyı bölgesindeki popülasyon yüksek dağ popülasyonuna göre daha melaniktir. Hipotez ile örtüşmeyen veya tam tersi bulguların ortaya çıkmış olması, immün fonksiyonlar ile melanizasyon sürecinin bir çok farklı fizyolojik değişiklikler izlediği ve farklı çevre koşullarına farklı adaptasyonlar olabileceğine işaret etmektedir. Melanizm ile immün fonksiyonlar arasındaki farklılıkların nedeni, melanik pigmentasyonu etkileyen genler PO gibi bazı immün cevapları içeren bileşiklerin üretilmesindeki rolünün farklı olabilmesidir (Wittkopp ve Beldade, 2009). Doğal popülasyonlarda

pigmentasyon ile immün fonksiyon arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılması için immün sistemin gelişimini etkileyen faktörlerin çok iyi irdelenmesi gerekmektedir.

Şayet küresel iklim değişimi nedeniyle gelecekte ortalama sıcaklık değerleri yükselecek olursa, doğal populasyonlarda daha melanik bireylerin yoğunluğunun artacağı ve bunun da melanin kaynaklı bağışıklığın güçleneceği tahmin edilmektedir (Yin ve ark., 2015). Ancak, daha önce de değinildiği gibi, çeşitli ekolojik ve biyolojik faktörlerin etkisi altında biyolojik süreçler arasında olması gereken uzlaşımın yukarıdaki beklentinin tersi yönündeki adaptasyonlara da yol açabileceğini belirtmek gerekir. Bu konu daha çok konakçı-parazit yaşam gösteren bazı gruplar için analiz edilmiş ve bazı türlerin küresel ısınma sürecinde parazit etkinliğinin arttığına işaret edilmiştir (Harvell ve ark., 2009). Fakat, termal düzenleme stratejisi melanin kaynaklı bağışıklık ile sıkı bir ilişki içerisinde ise, küresel ısınma sürecinde vektörün immün yatırımının azalması nedeniyle sıcak bölgelerde vektörel hastalıkların yayılımının artış gösterebileceği de belirtilmektedir (Kutch ve ark., 2014).



## 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., Parsons; N. M. 2006. The emergency life-history stage and immunity in the cricket, *Gryllus texensis*. *Animal Behaviour*, 72: 235-244.
- 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*. *The Journal of Experimental Biology*, 214: 1997-2014.
- Anderson, R. S., Cook, M. L. 1979. Induction of lysozyme like activity in the hemolymph and hemocytes of an insect, *Spodoptera eridania*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 33: 197-203.
- Anonim, 2016. Dünya geneli şehirlerde iklim verileri. <http://tr.climate-data.org> (Erişim tarihi: 05.06.2016).
- Armitage, S. A. O., Siva-Jothy, M. T. 2005. Immune function responds to selection for cuticular colour in *Tenebrio molitor*. *Heredity*, 94: 650-656.
- 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.
- Berggren, A. 2010. Testing the effect of individual color morphology on immune response in brush-crickets. *Insect Science*, 17: 400-405.
- Bienko, B. 1954. Phaneropterinae. Orthoptera, II (2): The fauna of Russia (the USSR Fauna). *Nes Series (Fauna of Russia)*, s: 59: 336.
- Blanckenhorn, W. U., Demont, M. 2004. Bergmann and converse Bergmann latitudinal clines in arthropods: Two ends of a continuum? *Integrative and Comparative Biology*, 44(6): 413-424.
- Brekafeld, P. M. 1985. Polymorphic mullarian mimicry and interactions with thermal melanism in ladybirds and a soldier beetle: a hypothesis. *Biological Journal of Linnean Society*, 26: 243-267.

- Booth, D. T., Kiddell, K. 2007. Temperature and the energetics of development in the house cricket (*Acheta domesticus*). *Journal of Insect Physiology*, 53(9): 950-953.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., Hoffmann, D. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*, 23(4-5): 329-344.
- Catalan, T. P., Wozniak, A., Niemeyer, H. M., Kalergis, A. M., Bozinovic, F. 2012. Interplay between thermal and immune ecology: Effect of environmental temperature on insect immune response and energetic costs after an immune challenge. *Journal of Insect Physiology*, 58(3): 310-317.
- Cerenius, L., Söderhall, K. 2004. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198: 116-126.
- Cotter, S. C., Myatt, J. P., Benskin, C. M. H., Wilson, K. 2008. Selection for cuticular melanism reveals immune function and life-history trade-offs in *Spodoptera littoralis*. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(6): 1744-1754.
- De Jong, P. W., Brakefield, P. M. 1998. Climate and change in clines for melanism in the two-spot ladybird *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 265: 39-43.
- Eades, D. C., Otte, D., Cigliano, M. M., Braun, H. 2015. Orthoptera Species File. Version 5.0/5.0. <http://Orthoptera.SpeciesFile.org>. (Erişim tarihi: 26.10.2015).
- Ellers, J., Boggs, C. L. 2002. The evolution of wing color in *Colias* butterflies: heritability, sex linkage, and population divergence. *Evolution*, 56(4): 836-840.
- Ethier, J., Despland, E. 2012. Effects of polymorphic melanism and larval diet on life history traits of *Malacosoma disstria* moths. *Journal of Insect Physiology*, 58(1): 67-74.
- Eweleit, L., Reinhold, K. 2014. Body size and elevation: do Bergmann's and Rensch's rule apply in the polytypic bush cricket *Poecilimon veluchianus*? *Ecological Entomology*, 39(1): 133-136.

- Fedorka, K. M., Zuk, M., Mousseau, T. A. 2005. Natural selection drives the link between male immune function and reproductive potential. *Canadian Journal of Zoology*, 83: 1012-1014.
- Fedorka, K. M., Lee, V., Winterhalter, W. E. 2013a. Thermal environment shapes cuticle melanism and melanin-based immunity in the ground cricket *Allonemobius socius*. *Evolutionary Ecology*, 27(3): 521-531.
- Fedorka, K. M., Copeland, E. K., Winterhalter, W. E. 2013b. Seasonality influences cuticle melanization and immune defense in a cricket: support for a temperature-dependent immune investment hypothesis in insects. *Journal of Experimental Biology*, 216(21): 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*, 2: 89-93.
- Fedorka, K. M., Kutch, I. C., Sevgili, H. 2015. Temperature-dependent immune investment in insects. *Integrative and Comparative Biology*, 55: E55-E55.
- Fischer, K., Karl, I. 2010. Exploring plastic and genetic responses to temperature variation using copper butterflies. *Climate and Evolutionary Physiology*, 43: 17-30.
- Fredrick, W. S., Ravichandran, S. 2012. Hemolymph proteins in marine crustaceans. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(6): 496-502.
- Gordon, S. 2008. Elie Metchnikoff : Father of natural immunity. *European Journal of Immunology*, 38: 3257-3264.
- Gorman, M. J., Wang, Y., Jiang, H., Kanost, M. 2007. *Manduca sexta* Hemolymph Proteinase 21 Activates Prophenoloxidase-activating Proteinase 3 in an Insect Innate Immune Response Proteinase Cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16): 11742-9.
- Gross, J., Schmolz, E., Hilker, M. 2004. Thermal Adaptations of the Leaf Beetle *Chrysomela lapponica* (Coleoptera: Chrysomelidae) to Different Climes of Central and Northern Europe. *Environmental Entomology*, 33(4): 799-806.

- Haris, R. M., McQuillan, P., Hughes, L. 2013. A test of the thermal melanism hypothesis in the wingless grasshopper *Phaulacridium vittatum*. *Journal of Insect Science*, 13: 51.
- Harvell, D., Altizer, S., Cattadori, I. M., Harrington, L., Weil, E. 2009. Climate change and wild life diseases: When does the host matter the most? *Ecology*, 90(4): 912-920.
- Heller, K. G., Sevgili, H., Reinhold, K. 2008. Are-assessment of the *Poecilimon syriacus* group (Orthoptera Tettigonioidae, Phaneropteridae) based on bioacoustics, morphology and molecular data. *Insect Systematics and Evolution*, 39: 361-379.
- Hoffmann, J. A. 1995. Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology*, 7: 4-10.
- Kamilar, J. M., Bradley, B. J. 2011. Interspecific variation in primate coat colour supports Gloger's rule. *Journal of Biogeography*, 38(12): 2270-2277.
- Kanost, M. R., Jiang, H. B., Yu, X. Q. 2004. Innate immune responses of a Lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews*, 198: 97-105.
- Karacaoğlu, Ç., Kuyucu, A. C. 2014. Humidity and seasonality drives body size patterns in males of the bush cricket *Isophya rizeensis* Sevgili, 2003 (Orthoptera: Tettigoniidae: Phaneropterinae). *Insect Science*, 21(2): 213-26.
- Karl, I., Sorensen, J. G., Loeschcke, V., Fischer, K. 2008. HSP70 expression in the copper butterfly *Lycaena tityrus* across altitudes and temperatures. *Journal of Evolution Biology*, 22: 172–178.
- Karl, I., Fischer, K. 2009. Altitudinal and environmental variation in life span in the Copper butterfly *Lycaena tityrus*. *Functional Ecology*, 23: 1132–1138.
- Karl, I., Hoffmann, K. H., Fischer, K. 2010. Cuticular melanisation and immune response in a butterfly: local adaptation and lack of correlation. *Ecological Entomology*, 35: 523–528.

- Kaya, S., Çıplak, B., Chobanov, D., Heller, K.G. 2012. *Poecilimon bosphoricus* group (Orthoptera, Phaneropterinae): iteration of morpho-taxonomy by song characteristics. *Zootaxa*, 3225: 1-71.
- King, K. J., Sinclair, B. J. 2015. Water loss in tree weta (Hemideina): adaptation to the montane environment and a test of the melanisation-desiccation resistance hypothesis. *Journal of Experimental Biology*, 218(13): 1995-2004.
- Kingsolver, J. G. 1983. Thermoregulation and flight in colias butterflies elevational patterns and mechanistic limitations. *Ecology*, 64(3): 534-545.
- Kutch, I. C., Sevgili, H., Wittman, T., Fedorka, K. M. 2014. Thermoregulatory strategy may shape immune investment in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 217(20): 3664-3669.
- Lavine, M. D., Strand, M. R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1295-1309.
- Lee, K. P., Simpson, S. J., Wilson, K. 2008. Dietary protein quality influences melanization and immune function in an insect. *Functional Ecology*, 22(6): 1052-1061.
- Leman, J. C., Wedole, C. B., Gershman, S. N., Kerr, A. M., Ower, G. D., Jhon, J. M. S. T., Vogel, L.A., Sakaluk, S. K. 2009. Love sick: immunological costs of mating to males age brush crickets. *Journal of Evolution Biology*, 22: 163-171.
- Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Cerenius, L., Lee, B. L., Sorderhall, I., Soderhall, K. 2007. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (46): 33593-8.
- Majerus, M., O'Donald, P., Weir, J. 1982. Evidence for preferential mating in *Adalia bipunctata*. *Heredity*, 49: 37-49.
- Majerus, M. E. N. 2000. Melanism: evolution in action. *Journal of the Lepidopterists' Society*, 54 (1): 38.
- Majerus, M. E. N., Mundy, N. I. 2003. Mammalian melanism: natural selection and black and white. *Trends in Genetics*, 19 (11): 585-588.

- Malcolm, J. R., Liu, C. R., Neilson, R. P., Hansen, L., Hannah, L. 2006. Global warming and extinctions of endemic species from biodiversity hotspots. *Conservation Biology*, 20 (2): 538-548.
- Mikkola, K., Rantala, M. J. 2010. Immune defence, a possible nonvisual selective factor behind the industrial melanism of moths (Lepidoptera). *Biological Journal of the Linnean Society*, 99 (4): 831-838.
- Moczek, A. P. 2010. Phenotypic plasticity and diversity in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365 (1540): 593-603.
- Nunn, C. L., Lindenfors, P., Pursall, E. R., Rolff, J. 2009. On sexual dimorphism in immune function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364 (1513): 61-69.
- Parkash, R., Ramniwas, S., Rajpurohit, S., Sharma, V. 2008b. Variations in body melanization impact desiccation resistance in *Drosophila immigrans* from Western Himalayas. *Journal of Zoology*, 276 (2): 219-227.
- Parkash, R., Rajpurohit, S., Ramniwas, S. 2008. Changes in body melanisation and desiccation resistance in highland vs. lowland populations of *D. melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 54 (6): 1050-1056.
- Pinera, A. V., Charles, H. M., Dinh, T. A., Killian, K. A. 2013. Maturation of the immune system of the male house cricket, *Acheta domesticus*. *Journal of Insect Physiology*, 59: 752-760.
- Quintero, I., Wiens, J. J. 2013. Rates of projected climate change dramatically exceed past rates of climatic niche evolution among vertebrate. *Ecology Letters*, 16 (12): 1516-1516.
- Rajpurohit, S., Parkash, R., Ramniwas, S. 2008. Body melanization and its adaptive role in thermoregulation and tolerance against desiccating conditions in Drosophilids. *Entomological Research*, 38: 49-60.
- 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.

- Robb, T., Forbes, M. R., Jamieson, I. G. 2003. "Greater cuticular melanism is not associated with greater immunogenic response in adults of the polymorphic mountain stone weta, *Hemideina maori*", *Ecological Entomology*, 28 (6): 738-746.
- Rolff, J. 2001. Effects of age and gender on immune function of dragonflies from a wild population (*Odonata, Lestidae*). *Canadian Journal of Zoology*, 79, 2176-2180.
- Rolff, J. 2002. Bateman's principle and immunity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269 (1493): 867-872.
- Romoser, W. S., Stoffolano, J. G. 1998. *The Science of Entomology*. Fourth ed. Boston, McGraw-Hill. 605s.
- Roulin, A. 2014. Melanin-based colour polymorphism responding to climate change. *Global Change Biology*, 20 (11): 3344-3350.
- Rowley, A. F., Brookman, J. L., Ratcliffe, N. A. 1990. Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in antimicrobial activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56 (1): 31-38.
- Satoh, D., Horii, A., Ochiai, M., Ashida, M. 1991. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11): 7441-53.
- Schneider, D. S., Chambers, M. C. 2008. Microbiology rogue insect immunity. *Science*, 322 (5905): 1199-1200.
- Schneider, P. M. 1985. Purification and properties of three lysozymes from hemolymph of the cricket, *Gryllus bimaculatus* (Degeer). *Insect Biochemistry*, 15 (4): 463-470.
- Sevgili, H., Önal, H. ve Yiğit, A. 2015. Mating behavior and spermatophore characteristics in two closely related bush cricket species of the genus *Phonochorion* (Orthoptera: Phaneropterinae). *Journal of Insect Behavior*, 28: 369-386.
- Sevgili, H. 2016. İki çalı çekirgesi üzerinde doğal bağışıklık parametrelerinden fenolksidaz aktivitesi ile litik aktivitenin ve hemolimfteki protein

- konsantrasyonunun yöntemsel olarak belirlenmesi. Akademik Ziraat Dergisi, 5 (1): 51-62.
- Shoemaker, K. L., Parsons, N. M., Adamo, S. A. 2006. Mating enhances parasite resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Animal Behaviour*, 71: 371-380.
- Singaravelan, N., Raz, S., Tzur, S., Belifante, S., Pavlicek, T., Beiles, A., Ito, S., Wakamatsu, K., Nevo, E. 2013. Adaptation of pelage color and pigment variations in Israeli subterranean blind mole rats, *Spalax ehrenbergi*. *PloS ONE*, 8(7): e69346.
- Soderhall, K., Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10(1): 23-28.
- Thompson, W. R. 1935. On a criterion for the rejection of observations and the distribution of the ratio of deviation to sample standard deviation. *The Annals of Mathematical Statistics*, 6: 214–219.
- True, R. J. 2003. Insect melanism: the molecules matter. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(12): 640-647.
- Trullas, C. S., Van, W. J. H., Spotila, J. R. 2007. Thermal melanism in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*, 32(5): 235-245.
- Trullas, C. S., Terblanche, J. S., Blackburn, T. M., Chown, S. L. 2008. Testing the thermal melanism hypothesis: a macrophysiological approach. *Functional Ecology*, 22(2): 232-238.
- Tsakas, S., Marmaras, V. J. 2010. Insect immunity and its signalling: an overview. *Invertebrate Survival Journal*, 7: 228-238.
- Vocadlo, D. J., Davies, G. J., Laine, R., Withers, S. G. 2001. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, 412(6849): 835-838.
- Wilson, K., Cotter, S. C., Reeson, A. F., Pell, J. K. 2001. Melanism and disease resistance in insects. *Ecology Letters*, 4(6): 637-649.
- Wittkopp, P. J., Carroll, S. B., Kopp, A. 2003. Evolution in black and white: genetic control of pigment patterns in *Drosophila*. *Trends in Genetics*, 19(9): 495-504.



Wittkopp, P. J., Stewart, E. E., Arnold, L. L., Neidert, A. H., Haerum, B. K., Thompson, E. M., Akhras, S., Smith-Winberry, G., Shefner, L. 2009. Intraspecific polymorphism to interspecific divergence: Genetics of pigmentation in *Drosophila*. *Science*, 326(5952): 540-544.

Yin, H., Shakeel, M., Kuang, J., Li, J. 2015. An opposite to the conventional thermal hypothesis: temperature- dependent variation in coloration of adults of *Saccharosydne procerus* (Homoptera: Delphacidae). *PloS ONE*, 10(5): e0128859.

Zuk, M., Stoehr, A. M. 2002. Immune defense and host life history. *American Naturalist*, 160: S9-S22.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

---

**İsim:** Nilgün TOKGÖZ

**Doğum Yeri:** Trabzon

**Doğum Tarihi:** 09/03/1991

**Yabancı Dil:** İngilizce

**E-mail:** bionilguntokgoz@gmail.com

**İletişim Bilgileri:** Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

### ÖĞRENİM DURUMU

---

Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans 2016

Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 2013

### ÖZETİ BASILI SÖZLÜ BİLDİRİLER

---

1. Tokgöz, N., Sevgili, H. ve Fedorka, K. M. Farklı termal çevrenin melanizasyon temelli bağışıklık sistemi üzerindeki etkisini çalı çekirgesi *Poecilimon similis* üzerinde araştırılması, 12. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 2015, Muğla.

2. Sevgili, H., Tokgöz, N. ve Fedorka, K. M. *Isophya speciosa*'da Frivalsdky, 1867) (Orthoptera: Ohaneropterinae) eşeyssel olgunluk sürecinin bazı immün fonksiyonlar üzerindeki etkilerinin araştırılması. VI. Ekoloji Sempozyumu, Sinop, Türkiye, 2015.

### SERTİFİKALAR

---

ISO 17025 Deney ve kalibrasyon laboratuvarları temel eğitimi

ISO 14001:2004 Çevre yönetim sistemi temel eğitimi

ISO 9001:2008 Kalite yönetim sistemi temel eğitim

ISO 22000:2005 Gıda güvenliği yönetim sistemi temel eğitimi

PCR kullanımı ve gen dizilimi eğitimi