

***Drosophila melanogaster*'de COĞRAFİ VE MEVSİMSEL DİYAPOZ
DEĞİŞİMİ VE İNSÜLİN-BENZERİ RESEPTÖR (*InR*)
POLİMORFİZMİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF GEOGRAPHICAL AND SEASONAL
DIAPAUSE AND RELATION TO INSULIN-LIKE RECEPTOR (*InR*)
POLYMORPHISM IN *Drosophila melanogaster***

BENGİSU SEZEN SUBAŞI

YRD. DOÇ. DR. BANU ŞEBNEM ÖNDER

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

BENGİSU SEZEN SUBAŞI'nın hazırladığı “*Drosophila melanogaster*'de Coğrafi ve Mevsimsel Diyapoz Değişimi ve İnsülin-Benzeri Reseptör (*InR*) Polimorfizmi ile İlişkisinin Araştırılması” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hacer ÜNLÜ
Başkan



Yrd. Doç. Dr. Banu Şebnem ÖNDER
Danışman



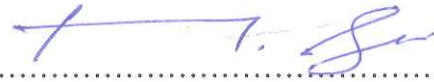
Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN
Üye



Prof. Dr. Hatice Mergen
Üye



Doç. Dr. Mutlu KART GÜR
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/~~raporumun~~ tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ Tezimin/~~Raporumun~~ tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ Tezimin/~~Raporumun~~ 12/06/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ Tezimin/~~Raporumun~~ 12/06/2020 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

14 / 06 / 2017


(İmza)

Bengisu Sezen SUBAŞI

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

12/06/2017

BENGİSU SEZEN SUBAŞI

ÖZET

***Drosophila melanogaster*'de COĞRAFI VE MEVSİMSSEL DİYAPOZ DEĞİŞİMİ VE İNSÜLİN-BENZERİ RESEPTÖR (*InR*) POLİMORFİZMİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bengisu Sezen SUBAŞI

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Banu Şebnem ÖNDER

Haziran 2017, 65 sayfa

Reprodüktif diyapoz *Drosophila melanogaster*'de, yaşlanma, ömür uzunluğu, yumurta verimi ve çeşitli stres koşulları ile ilişkili, zor koşullar altında canlının hayatta kalmasına olanak tanıyan, iklimsel koşullardan etkilenen, enlemsel ve mevsimsel varyasyon gösterdiğine dair kanıtlar olan adaptif bir yaşam öyküsü karakteridir. Diyapoz frekansının Kuzey Amerika ve Avustralya'da paralel klin göstermesi, bu kıtalarda diyapoz adaptasyonunun benzer olduğuna işaret etmektedir. Bu çalışma kapsamında diyapozun paralel adaptasyon gösterdiğine dair hipotezi sınamak amacıyla, bir enlemsel klin içerisinde bulunan Türkiye, Ukrayna ve Rusya'dan toplanan *D. melanogaster*'in doğal popülasyonlarında diyapoz fenotip frekansı araştırılmıştır. Diyapozun enlemsel değişiminin yanı sıra mevsimsel değişimi de incelenmiş ve diyapoz için güçlü bir aday gen olarak gösterilen insülin benzeri reseptör geni olan *InR* geni alelleri ile ilişkisi araştırılmıştır. Ayrıca, yaşam öyküsü karakterlerini etkilediği bilinen *Wolbachia* enfeksiyonunun diyapoz fenotipi ile olası ilişkisi de incelenmiştir. Son olarak popülasyonların toplandığı coğrafi bölgelerin iklimsel değişkenleri ile başta diyapoz, alal polimorfizmleri ve *Wolbachia* enfeksiyonlarının ilişkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada

diyapoz deneyi ve *InR* polimorfizmlerinin belirlenmesi için 20 kuşak boyunca tam kardeş eşleşmesi ile kendileştirilen, Türkiye’den 2014 yılına ait 46 soy hattı, 2015 yılına ait 59 soy hattı; Rusya’dan 2014 yılına ait 36 soy hattı ile Ukrayna’dan 2014 yılına ait 2 soy hattı kullanılmıştır. 2015 yılında Türkiye’den toplanan 59 soy hattının *Wolbachia* enfeksiyon durumu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, diyapoz frekansının bu coğrafi kesitte Amerika ve Avustralya ile paralel klin oluşturmadığı, diyapoz karakterinin coğrafi varyasyonunun sadece iklimsel değişkenlere bağlı ortaya çıkan adaptif bir karakter olmadığı yönünde güçlü bir kanıt sunmuştur. Bunun yanı sıra mevsim ile diyapoz arasında bulunan anlamlı ilişki, populasyon içi diyapoz frekansı dalgalanmalarının varlığına işaret etmiştir. Öte yandan, *InR* polimorfizmi ile diyapoz ilişkisi bulunmamasına rağmen, *InR* alel polimorfizminin enlemsel klin oluşturduğu görülmüştür. Bu sonuç, *InR* gen bölgesinin fonksiyonel bir gen bölgesi olduğunu ve farklı coğrafyalarda seçilim baskısı altında olduğunu göstermiştir. *Wolbachia* enfeksiyonu ile diyapoz frekansı arasında da anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Anahtar kelimeler: reproduktif diyapoz, klin, enlemsellik, mevsimsellik, insülin-benzeri reseptör, *InR*, nükleotid polimorfizmi, adaptasyon.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF GEOGRAPHICAL AND SEASONAL DIAPAUSE AND RELATION TO INSULIN-LIKE RECEPTOR (*InR*) POLYMORPHISM IN *Drosophila melanogaster*

BENGİSU SEZEN SUBAŞI

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Dr. Banu Şebnem ÖNDER

June 2017, 65 pages

Reproductive diapause is an adaptive life history trait, which is related to aging, longevity, fecundity and various stress responses in *Drosophila melanogaster*. Diapause allow survival in difficult environments and affected by climatic conditions, also demonstrating latitudinal and seasonal variations. Parallel clines of diapause phenotype in North America and Australia suggest that adaptation for diapause is similar in these regions. This study aims to test the hypothesis ‘diapause shows parallel adaptation’ by investigating the diapause frequency in different natural populations from Turkey, Ukraine and Russia belongs to a latitudinal cline. Aside from latitudinal variations, seasonal variations in diapause were also examined. Additionally, the study investigated the relation between diapause frequency and the alleles of *InR* gene, known as insulin-like receptor gene and shown as a strong candidate gene for diapause. The possible relationship between diapause phenotype and *Wolbachia* infection, which is known to affect several life history traits, is also examined. Finally, the study analysed the correlation between the climatic variables of the geographical regions of the populations and diapause frequency, allele polymorphisms as also with *Wolbachia* infections. In this study, 46 lines and 59 lines collected from

Turkey in 2014 and 2015, respectively, 36 lines collected from Russia and 2 lines collected from Ukraine, which were subjected to 20 generations of full-sib mating for inbreeding, were used for determination of diapause frequencies and *InR* polymorphisms. *Wolbachia* infection status of 59 lines, collected from Turkey in 2015, has been determined.

Results provide strong evidence that the diapause frequency did not display a parallel cline with America and Australia in this geographical gradient and that the geographic variation of the diapause phenotype is not just an adaptive trait related to climatic variables. In addition, the significant relationship between season and diapause indicated a presence of diapause frequency fluctuations within the population. On the other hand, the *InR* allele polymorphism was found to produce a latitudinal cline without a relation to diapause. This result shows that *InR* gene is a functional gene region and is under selection pressures in different geographical regions. There was no significant relationship between *Wolbachia* infection and diapause frequency.

Keywords: reproductive diapause, cline, latitudinal, seasonal, insulin-like receptor, *InR*, nucleotide polymorphism, adaptation.

TEŞEKKÜR

Bana tanıdığım günden beri hep yol gösteren ve her zaman destek veren, tez çalışmam sırasında benim kadar heyecanlanan ve her anında bana destek olan değerli tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Banu Şebnem ÖNDER'e tüm emekleri için sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmaya katkılarından ve önerilerinden dolayı değerli jüri üyeleri, Prof. Dr. Hacer ÜNLÜ, Prof. Dr. Hatice MERGEN, Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN ve Doç. Dr. Mutlu KART GÜR'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca tavsiyeleri ve güler yüzleriyle bana destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Hacer ÜNLÜ ve Dr. Güzen EMECEN'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Canım dostum, ekip arkadaşım sevgili Cansu AKSOY'a sabırla beni desteklediği ve çalışmamın her anında yardımları ve paylaşımlarından ötürü teşekkürü borç bilirim.

Hayatımın her anında hep yanımda olan ve bu tez çalışması sırasında yaşadığım bütün sıkıntılara benimle birlikte katlanan ve bana her zaman moral veren sevgili Alper ORHAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Ekip arkadaşlarım Fatma TURHALLI ve Ufuk ÜNAL'a, bize ellerinden geldiğince yardımcı olmaya çalışan özel çalışma öğrencileri sevgili Sezay ONBAŞI, Dilara ULUSAL ve Okan KARAHAN'a çalışmalarımız boyunca gösterdikleri yardımlar için çok teşekkür ederim. Sevgili dostlarım Uğur KARŞI, Can ELVERİCİ ve Damla AYGÜN'e hayatıma her zaman neşe kattıkları ve bana destek olduklarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmada kullanılan soyların toplanması sırasında bize yardımcı olmaya çalışan ve bahçesini açan Mustafa Bey'e, konaklamamız ve arazi çalışması sırasında bize yardımcı olan Yeşilöz Köyü Muhtarı Osman ODABAŞI'na teşekkür ederim. Ayrıca Rusya ve Ukrayna soylarını bizimle paylaşan Prof. Dr. Elena PASYUKOVA ve Prof. Dr. Irina KOZERETSKA'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük teşekkürü hak eden ve bana her koşulda mücadele etmeyi öğreten canım annem Nuray SUBAŞI'na, her türlü koşulda beni destekleyen canım kardeşim Mina Sezin SUBAŞI'na sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmayı 214Z238 ve 116Z238 nolu projeler ile destekleyen TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	viii
ŞEKİLLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Klinal Varyasyonlar ve Adaptasyon.....	3
2.1.1. Yaşam Öyküsü Karakterlerinin Evrimi	6
2.2. Diapoz ve Reprodüktif Diapoz	7
2.3. Diapozu Kontrol Eden Faktörler	11
2.3.1. Sirkadiyen Saat	11
2.3.1.1. Işık ve Sıcaklık	12
2.3.1.2. Sirkadiyen Osilatör ve Dış Yolaklar.....	13
2.3.2. Hormonal Regülasyon	14
2.4. Diapozu Etki Eden Genetik Faktörler.....	17
2.4.1. İnsülin Reseptörü – <i>InR</i>	20
2.4.2. İnsersiyon – Delesyon (İndel) Polimorfizmleri	23
2.5. <i>Wolbachia</i> Enfeksiyonu.....	24
3. MATERYAL VE METOD	25
3.1. Arazi Çalışmaları.....	25
3.1.1. Çalışma Alanları	25
3.1.2. Soyların Toplanması ve Çoğaltılması.....	26
3.2. Laboratuvar Çalışmaları	28
3.2.1. Kendileşmiş Soy Hatlarının Oluşturulması	28
3.3. Reprodüktif Diapoz Deneyi.....	29
3.3.1. Reprodüktif Diapoz İçin Gerekli Çevresel Koşulların Oluşturulması	30
3.3.2. Ovaryum Diseksiyonu	31
3.4. Moleküler Çalışmalar	32

3.4.1. DNA İzolasyonu	32
3.4.2. Soylarda Bulunan <i>Wolbachia</i> Enfeksiyonlarının Tespiti	33
3.4.3. <i>InR</i> Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Sekanslanması	34
3.5. İstatistiksel Analizler	36
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	37
4.1. <i>InR</i> Gen Polimorfizmi ve Coğrafi Örüntüler	37
4.2. Diyapoz Fenotipi	43
4.2.1. Enleme Bağlı Diyapoz Frekansları	43
4.2.2. Yıla ve Mevsime Bağlı Diyapoz Frekansları	46
4.3. <i>Wolbachia</i> Enfeksiyonu ve Diyapoz	48
4.4. İklimsel Parametrelerin Diyapoz ile İlişkisi	50
KAYNAKLAR	52
EKLER	61
ÖZGEÇMİŞ	65

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 3.1. Kullanılan doğal populasyonların toplandığı bölgelere ait iklimsel ve coğrafi parametreler.....	26
Çizelge 3.2. Populasyonların toplandığı yıl ve aya ait sıcaklık ve nem değerleri.....	26
Çizelge 3.3. Kullanılan standart besiyeri bileşen ve miktarları.....	27
Çizelge 3.4. Örneklem yapılan lokasyonlar, örneklem yılları ve deneylere alınan soy sayıları	29
Çizelge 4.1. Lokasyonlara ait <i>InR</i> alel frekansları ve ki kare analizi sonucu.....	38
Çizelge 4.2. <i>InR</i> alellerinin aydan aya değişimlerini gösteren ki kare analizi	39
Çizelge 4.3. Populasyonlara ait soy hatlarının sayısı (N), alellere göre diyapoz frekansı (DF) ortalamaları, ortalamaların standart sapma (S.S.) değerleri.....	41
Çizelge 4.4. <i>InR</i> gen bölgesi için McDonald-Kreitman ayrılma testi sonucu.....	42
Çizelge 4.5. <i>InR</i> gen bölgesinin istatistiksel özeti.....	43
Çizelge 4.6. Populasyonlara ait soy hatlarının sayısı (N), diyapoz gösteren soyların frekans ortalamaları (DF), ortalamaların standart sapma (S.S) değerleri.....	44
Çizelge 4.7. Yeşilöz populasyonun soy hatlarında gözlenen diyapoz frekanslarının (DF) aydan aya değişimlerinin soy hattı sayıları (N), ortalamaları, ortalamaların standart sapma (S.S.) değerleri	47
Çizelge 4.8. Diyapoz gösteren ve göstermeyen birey sayıları, frekansları (parantez içerisinde verilmektedir) ve diyapoz fenotipinin aydan aya değişimlerini ve bu değişimin önemini gösteren ki kare analiz sonucu.....	47
Çizelge 4.9. Tüm populasyonlar için coğrafi, iklimsel ve genetik değişkenler ile diyapoz frekansı, <i>InR</i> polimorfizmi ve <i>Wolbachia</i> enfeksiyonu arasındaki <i>Pearson</i> korelasyon katsayıları (<i>r</i>).....	50

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Sirkadiyen sistemin bileşenlerinin şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.2. Memeli beyinde (solda) ve <i>Drosophila</i> 'da (sağda) osilatörler	12
Şekil 2.3. <i>D. melanogaster</i> 'de diyapozun hormonal kontrolünün şematik gösterimi.....	16
Şekil 2.4. <i>InR</i> geninin şematik gösterimi ve <i>InR</i> geninde gözlenen SNP'ler. Gri kutular ekzonları, gri kutuların arasında kalan alanlar ise intronları temsil etmektedir	22
Şekil 3.1. Kullanılan doğal populasyonların toplanma noktalarının harita üzerinde gösterimi	25
Şekil 3.2. Kardeş eşleşmesi ile tek bir dişi kullanılarak bir sonraki kuşağın kurulması prensibine dayanan “Full-sib” kendileşme yönteminin şematik gösterimi	28
Şekil 3.3. <i>Drosophila</i> ovaryumlarındaki folikül hücrelerinde yumurta gelişiminin evreleri.....	31
Şekil 3.4. Diyapoz fenotipi gösteren (solda) ve göstermeyen (sağda) dişilere ait ovaryum görüntüleri	32
Şekil 3.5. <i>Wolbachia</i> enfeksiyonunun tespitinde kullanılan <i>wsp</i> gen bölgesinin jel görüntüsü	34
Şekil 3.6. <i>D. melanogaster</i> 3. kromozomun sağ kolunda bulunan <i>InR</i> gen bölgesinin bir kısmının görünümü ve 1.ekzon indel polimorfimini belirlemek için kullanılan primerlerin gösterimi	35
Şekil 3.7. Sanger sekansı sonrası elde edilen <i>InR</i> geni dizilerinden birinin kromatogram görüntüsü.....	36
Şekil 4.1. <i>D. melanogaster</i> 'de görülen <i>InR</i> geninin amino asit dizilerinde görülen indel polimorfizimleri.Yaygın olarak bulunan alellerden örneklem grubumuzda görülenler koyu renk, başka çalışmalarda tespit edilenler açık renk ile gösterilmiştir	37
Şekil 4.2. Lokasyonlara bağlı alel frekansları dağılımının harita üzerinde gösterimi.....	38
Şekil 4.3. Kuzey Amerika verileri ile birleştirilerek Türkiye ve Rusya'da gözlenen <i>InR</i> indel polimorfizminin üç alelinin frekanslarının gösterimi	40
Şekil 4.4. Kuzey Amerika populasyonları diyapoz klini ile Avrupa populasyonları diyapoz frekanslarının Türkiye ve Rusya Populasyonlarına ait ortalama diyapoz frekansları ile karşılaştırılması	46
Şekil 4.5. Yeşilöz populasyonuna ait soyların 2014 ve 2015 yılları aya bağlı diyapoz frekanslarının bar grafik olarak gösterimi	47

Şekil 4.6. Yeşilöz popülasyonuna ait soylarının aydan aya <i>Wolbachia</i> enfeksiyonu yüzdelik dilimleri.....	50
---	----



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g	Gram
ml	Mililitre
m	Metre
μ l	Mikrolitre
mM	Milimolar
π	Ortalama nükleotit çeşitliliği
S	Ayrışma bölgelerinin sayısı
θ	Watterson nükleotit çeşitliliği
Σ	Toplam
r	Pearson korelasyon katsayısı

Kısaltmalar

InR	İnsülin benzeri reseptör
dINR	<i>Drosophila</i> insülin reseptörü
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı RNA
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi
JH	Juvenil hormon
IIS	İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörü sinyali
QTL	Kantitatif karakter lokusu
AA	Aminoasit
indel	İnseriyon-Delesyon baz değişimi
<i>Adh</i>	Alkol dehidrogenaz
CO ₂	Karbondioksit
NH ₂	Amin grubu
COOH	Karboksilik asit
PCR-PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
bç	Baz çifti
ANOVA	Varyans Analizi
Hd	Haplotip Çeşitliliği
Wb	<i>Wolbachia</i>

1. GİRİŞ

Diyapoz böceklerin zor koşulları atlatabilmesini sağlayan ve canlının hayatta kalabilirliğini arttıran bir yaşam öyküsü karakteridir ve kısa gün uzunluğu, düşük sıcaklık gibi çevresel değişkenlerle tetiklenir. Kışı ergin halde geçiren *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae)'de yaygın olarak görülen bir diyapoz stratejisi olan reproduktif diyapoz, özellikle zorlu kış koşullarında ovaryum gelişiminin previtellogenik evrede kalıp, koşullar düzelince canlının üremesini devam ettirmesine ve böylece yeni bir kuşağın oluşmasına olanak sağlar. Bitkilerde dormansi ve omurgalılarda hibernasyon böcek diyapozuna benzer biyolojik süreçlerdir ve bütün türler değişen çevresel koşullara adapte olup üreme döngüleri başta olmak üzere birçok gelişimsel karakteri bu koşullara göre ayarlamaktadırlar. Reproduktif diyapoz da diğer yaşam öyküsü karakterleri gibi canlının uyum başarısını etkileyen ve çeşitli çevresel etmenlerle şekillenen bir karakterdir. Reproduktif diyapoz birçok metabolik, fizyolojik ve hormonal mekanizmalarla kontrol edilir ve ömür uzunluğu, yaşlanma, çeşitli stres koşullarına direnç gibi uyum başarısını etkileyen karakterler ile bedel-uzlaş (trade-off) içerisinde olduğu bilinen bir yaşam öyküsü karakteridir.

Yaşam öyküsü karakterleri, farklı organizmaların çevresel kısıtlamalar karşısında hayatta kalması ve üreme stratejisini düzenlemesi ile doğrudan ilişkili bazı fenotipik ve demografik özellikleri tanımlar ve çeşitli çevresel etmenlerle ilişki içindedir. Örneğin, birçok böcek türünde görülen ve *D. melanogaster*'de çok sık rastlanan *Wolbachia* bakterisi enfeksiyonu, üreme verimini, ömür uzunluğunu ve hatta eşey oranını bile etkilediği bilinen bir etmendir. Yaşam öyküsü karakterlerinin çevresel etmenlerden nasıl etkilendiklerini incelemek amacıyla heterojen ortamlar olan coğrafi gradientler boyunca bu karakterlerin fenotipik ve genotipik değişikliklerini çalışmak, çevresel adaptasyon mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Çok geniş yayılım alanına sahip ve yüksek oranda çeşitlilik gösteren ortamlara uyum göstermiş bir tür olan *D. melanogaster* bu adaptasyon çalışmalarını yapmak için oldukça kullanışlı bir model organizmadır.

Doğal populasyonların değişen çevresel koşullara nasıl uyum sağladığını ve türlerin lokal adaptasyon süreçlerine neden olan çevresel varyasyonların populasyonlarda görülen genetik çeşitliliğe yapabileceği etkiyi anlamak evrimsel biyolojinin temel amacıdır. Bu amaç doğrultusunda, bu çalışmada yakın boylamlar üzerinde farklı enlemlerden olmak üzere Türkiye, Rusya ve Ukrayna'dan toplanan *D. melanogaster*'in doğal populasyonları kullanılarak, reproduktif diyapozun enlemsel değişimleri incelenmiştir. Türkiye

populasyonundan 2014-2015 yıllarında Yeşilöz'den Mayıs ve Ekim ayları arasında her ay toplanan doğal populasyonlar ile reproduktif diyapozun mevsimsel olarak değişimi araştırılmıştır. Bunlara ek olarak reproduktif diyapozun altında yatan genetik adaptasyonları belirlemek ve bu doğrultuda diyapoz fenotipi için aday gösterilen insülin sinyal yolağı reseptör geni olan *InR*'nin farklı alellerinin reproduktif diyapoz ile ilişkisini ve *InR* geni alel frekanslarının enlemsel ve mevsimsel değişimlerini belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca, *D. melanogaster*'de yaygın olarak görülen *Wolbachia* enfeksiyonunun varlığı test edilmiş ve bu enfeksiyonun reproduktif diyapoz ve *InR* geni alelleri ile ilişkisi yine bu çalışma kapsamında sorgulanmıştır.

Çalışma sonucunda, örneklem yapılan soy hatlarında diyapoz ile enlem arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Diyapozun mevsimsel varyasyonları incelendiğinde ise, diyapozun aydan aya değişim gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuçlar, diyapozun sadece iklimsel değişkenlere bağlı olarak ortaya çıkan adaptif bir karakter olmadığını, enlemsel ve mevsimsel klinleri farklı seçim baskılarının şekillendirdiğine dair güçlü kanıtlar sunmuştur. Diyapoz ile *InR* polimorfizmi arasında bir ilişki bulunamamasına rağmen, *InR* alel polimorfizminin literatürdeki mevcut verilerle değerlendirildiğinde daha düşük enlemlerde gözlenen klinal örüntüleri desteklediği görülmüştür. Bu sonuç, *InR* gen bölgesinin seçim baskısı altında ve fonksiyonel bir gen bölgesi olduğunu desteklemektedir. *Wolbachia* enfeksiyonu ile diyapoz arasında ise anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Klinal Varyasyonlar ve Adaptasyon

Adaptasyon, bir türün genetik yapısının değişimi ile sonuçlanan evrimsel bir süreçtir. Bütün türler zaman ve mekansal olarak farklı çevrelerde yaşamaktadır ve bu farklılıkların yarattığı çevresel heterojenlik, populasyonlar arasında adaptif farklılıkların ortaya çıkmasında etkili bir seçim baskısı yaratmaktadır [1]. Çeşitlilik gösteren çevresel koşullara doğal populasyonların nasıl uyum sağladığı ve adaptif farklılıklara neden olan çevresel varyasyonların populasyonlarda görülen genetik çeşitliliğe nasıl katkı yaptığını anlamak evrimsel biyolojinin temel amacıdır.

Çevresel varyasyonların canlıların adaptasyonuna nasıl etki ettiğini anlayabilmek için, canlının uyum başarısına etki eden karakterlerin doğal seçim baskısı ile şekillendiği ortamlara adaptasyonunu (lokal adaptasyonu) çalışmak önemlidir. Lokal adaptasyon çalışmaları gen akışı ve diğer evrimsel güçlere kıyasla, doğal seçim ile ilgili daha fazla bilgi vermektedir. Lokal adaptasyonlarda populasyonlar arasında yüksek oranda görülen gen akışının, farklı adaptif örüntülerin ortaya çıkmasını engellediği ve seçilimin gen akışının homojenleştirici etkisini aştığı zaman lokal adaptasyonun gerçekleşebileceği düşünülmektedir [2]. Ancak yüksek oranda başarılı olan fenotipler bir sonraki kuşağa aktarılmakta; bu nedenle doğal seçilimin etkisi lokal adaptasyonlarda daha fazla görülmektedir.

Lokal adaptasyon bir populasyonun doğal olarak bulunduğu bir çevrede o populasyonun uyum başarısına etki edecek bir karakterin ortaya çıkmasıyla oluşur [3]. Populasyonların sahip olduğu lokal adaptasyonları çalışmak için çevresel faktörlerin sistematik bir şekilde değiştiği coğrafi gradiyentler olan enlemsel ve rakımsal klinler yaygın olarak kullanılır. Heterojen ortamlara uyumla ilgili olan fenotipik (vücut büyüklüğü, termal tolerans vb.) ve genotipik (allozim, alel frekansı vb.) karakterlerdeki değişiklikleri coğrafi gradiyentler boyunca irdelemek, adaptasyonun nedenlerini anlamamızda önemli veriler sağlamaktadır.

Ekologlar birçok türde fenotipin, coğrafi gradiyentler olan enlem ve rakım gibi büyük coğrafi skalalarda değiştiğini gözlemlemişlerdir. Örneğin, Bergmann [4] fenotipik bir karakter olan vücut büyüklüğünün enlemsel klin gösterdiğini ortaya koymuştur. Klinler tahmin edilebilir ve tekrar edebilir örüntülerdir ve bu nedenle değişen ‘mekansal seçilimi’ yansıttığı düşünülmektedir. Fenotiplerde görülen coğrafi varyasyonlar seçim baskısının işlediğini gösterirken, farklı kıtalarda birbiriyle eşleşen klinal ekolojik özelliklerin ve gen

frekanslarının eşzamanlı evrimi iklimsel adaptasyon için daha güçlü kanıtlar sağlamaktadır [5].

Lokal adaptasyonlar, farklı kıtalarda görülen benzer özelliklerin klinal örüntülerini şekillendirmede rol oynayabilir. Farklı coğrafi bölgelerde tekrarlanan klinler “paralel klin” olarak adlandırılır ve bu bölgelerde paralel adaptasyonlar olduğu ön görülmektedir. Örneğin, Avustralya, Kuzey Amerika, Afrika ve Avrupa’da vücut büyüklüğünün benzer şekilde klin göstermesi, iklimsel adaptasyonun kıtasal ölçekte benzer fenotipik tepki verebileceğini göstermektedir [5].

Drosophila melanogaster enlemsel, rakımsal ve mevsimsel klinleri çalışmak için oldukça kullanışlı bir model organizmadır. Kökeni Afrika’nın tropikal alanları olmasına rağmen, yaklaşık 10.000-20.000 yıl önce dağılımını genişleterek birçok farklı kıtaya yayılmıştır. Günümüzde Avrupa’nın en kuzeyinde bulunan Finlandiya (64°K) ile Avustralya’nın güneyinde bulunan Tazmanya (43°G)’ya kadar yayılış gösterdiği bilinmektedir. *D. melanogaster* tropik bölgelerden tüm dünyaya yayılması nedeniyle çok geniş bir coğrafyaya, mevsimsel döngü gösteren ılıman bölgeler gibi çeşitlilik gösteren çevrelere uyum sağlamıştır [6, 7]. Bu nedenle *D. melanogaster*’in doğal populasyonları heterojen çevrelere adapte olmaları bakımından birçok evrimsel, ekolojik ve genetik çalışmalarda kullanılmaktadır. İlıman bölgelerdeki *D. melanogaster* populasyonları, mevsimlik bir meta populasyon olarak düşünülür ve bu populasyonlar kışın küçülür, ardından ilkbaharda yeniden kurulur. Populasyon, ilkbahardan sonbaharın sonuna doğru bir kez daha küçülünceye kadar artan populasyon büyüklüğü ile dispersal gösterir. Bu örüntü, seçilim baskısının iklimsel parametrelerle ilişkili bir biçimde coğrafi ve mevsimsel olarak lokal populasyonlarda çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymaktadır [8].

Fenotipik olarak klin varyasyonları, *Drosophila*’da birkaç önemli yaşam öyküsü karakteri için belirlenmiştir. *D. melanogaster*’de fenotipik ve genotipik varyasyonları klinal örüntülerin şekillendirdiğine ve ılıman çevrelere lokal adaptasyonda mekansal olarak çeşitlilik gösteren seçilim baskılarının etkili olduğuna dair çok sayıda kanıt vardır [1]. *D. melanogaster*’de enlemsel klinler, vücut büyüklüğü [9, 10], yumurta büyüklüğü ve ovariyol sayısı [11], soğuk ve sıcak direnci [12], alkol toleransı [13], susuzluk direnci [14] ve reproduktif diyapozda [15] tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda vücut büyüklüğünün kuzey enlemlerde arttığı, ovariyol sayısının ve yumurta büyüklüğünün de enlemle doğru orantılı olarak artış gösterdiği bulunmuştur [11, 15].

Enlemsel klinler *Drosophila*'da çok çalışılmış olmasına rağmen rakımsal klinlerle ilgili az çalışma vardır. *D. buzzatii* ile yapılan bir çalışmada sıcaklık ve susuzluk direncinin rakımsal klin gösterdiği gözlenmiştir [16]. Ayrıca *D. melanogaster*'in Avustralya popülasyonu ile yapılan çalışmada, vücut büyüklüğü, gelişim zamanı, sıcak ve soğuk toleransında rakımsal farklılıklar görüldüğü saptanmıştır [17]. Bir başka çalışmada, *D. melanogaster* popülasyonlarında stres direnci ve ömür uzunluğunun rakım ile ilişkili olduğunu göstermiştir [18].

D. melanogaster'de enlemsel klinler fenotipik ve genetik olarak tanımlanmış ve klinal örüntüler Avustralya, Hindistan alt kıtası, Kuzey Amerika, Güney Amerika ve Afrika'da dahil olmak üzere birçok kıtada ortaya konmuştur [19]. Paralel klinler *D. melanogaster*'de farklı kıtalarda, morfolojik karakterlerde [20], stres toleransında [12, 21] ve yaşam öyküsü karakterlerinde [21] tanımlanmıştır. Çalışmalar yoğunlukla Kuzey Amerika ve Avustralya kıtasında yapılmış ve her iki kıtada da popülasyonlar kıyı şeridi boyunca örneklenmiş, ayrıca 10°'den fazla olan enlemsel skalada çalışılmıştır. *D. melanogaster*'in Amerika popülasyonlarında, yüksek enlemlerde diyapoz görülme sıklığının düşük enlemlerdekine göre daha fazla olduğu, ayrıca soğuk toleransının daha yüksek olduğu ortaya konmuştur [22]. Avustralya'da bulunan popülasyonlarda da benzer şekilde yüksek enlemlerde soğuk toleransının arttığı fakat diyapoz görülme sıklığı ve ovariyol sayısının Amerika kıtası ile paralellik göstermediği bulunmuştur [23]. Aynı zamanda enlemsel klinler genetik düzeyde de belirlenmiştir. Örneğin, hem Kuzey Amerika hem de Avustralya popülasyonlarında allozim, DNA ve kromozom inversiyon polimorfizmlerinde klin varyasyonları görülmüştür [24, 25, 26, 27]. Yapılan çalışmalarda çevresel adaptasyonun altında yatan genetik faktörlerin evrimsel cevapta nasıl bir rol oynadığı, farklı yaşam öyküsü karakterlerinde aday genler belirlenerek çalışılmaktadır. Bu doğrultuda, McKechnie ve arkadaşları [28] *Dca* geninin *D. melanogaster*'de kanat büyüklüğü ile ilişkili aday gen olduğunu ve bu genin paralel klin gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde, Paaby ve arkadaşları [26] da *InR* geninin farklı alellerinin ömür uzunluğu, stres toleransı ve üremeyle ilişkili olduğunu ve bu genin alelleriyle ilişkili karakterlerin enlemsellik gösterdiğini bulmuştur.

Enlemsel klinlerde olduğu gibi mevsimsel döngülerde de canlıların benzer seçim baskısına maruz kaldığı ve adaptif mekanizmanın altında yatan nedenlerin benzer olduğu düşünülmektedir [19]. Yüksek ve düşük enlemler ile yaz ve kış mevsimlerinde seçim rejimleri birçok yönden benzerlik gösterir. Yüksek enlemler ve kış mevsiminde düşük sıcaklık ve kısıtlı kaynaklar bulunurken, düşük enlemlerde ve yaz mevsiminde ise artan

sıcaklık ve bol kaynak bulunmaktadır. Mevsimsel döngülerde de tekrar edebilir ve tahmin edilebilir fenotip ve alel frekansında değişimler gözlenmiştir [1, 19]. Genomik çalışmalarda yıllar içerisinde frekans değişimleri gösteren, mevsimsel ve günlük döngülerle dengelenmiş seçilim ilişkisinde olan yüzlerce tek nükleotit polimorfizmi (SNP) bulunmuştur [1].

Yapılan birçok çalışmaya rağmen, *D. melanogaster*'in heterojen ortamlara uyum göstermesinde hangi kantitatif karakterin diğer karakterleri büyük oranda etkilediği tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat, reproduktif diyapozun *D. melanogaster*'in enlemsel ve mevsimsel gradientlere adaptasyonu ile ilişkili fenotip olduğu ve bu adaptasyonun da iklimsel parametreler ve seçilim rejimleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [19]. Çünkü, diyapoz fenotipi birçok çevresel parametreden etkilenmektedir (düşük-yüksek sıcaklık, uzun-kısa gün uzunluğu, sirkadiyen ritim gibi) ve ovaryum gelişimi dolayısıyla üreme, ömür uzunluğu, yaşlanma ve stres toleransına karşı direncin artmasıyla da ilişkili olduğu bilinmektedir [29].

2.1.1. Yaşam Öyküsü Karakterlerinin Evrimi

Yaşam öyküsü karakterleri, organizmaların hayatta kalma ve üreme gibi uyum başarısının iki önemli bileşeni ile doğrudan ilişkili kantitatif ve demografik özellikleri temsil eder. Yaşam öyküsü karakterlerinin evrimi, farklı organizmaların çevrenin yarattığı zorluklar karşısında hayatta kalmasını sağlayan ve üreme stresini optimize etmek için kullandığı başlıca fenotipik özellikleri ve adaptif stratejilerin çeşitliliğini açıklar. Yaşam öyküsü karakterlerini ve bu karakterlerin evrimini anlamak için evrimsel biyologlar demografi, kantitatif genetik, matematiksel modelleme ve filogeniyi kullanmaktadırlar [23, 30].

Bu karakterler, demografi ile ilişkili ve kompleks olduğundan dolayı, genellikle kantitatif ve poligenik karakterler olarak görülmektedir. Yaşam öyküsü karakterleri çevresel koşullara da oldukça bağımlılık göstermektedir ve bu nedenle yaşam öyküsü çalışmalarında 'fenotipik esneklik' kavramının üzerinde özellikle durulmaktadır [30].

Kavramsal olarak fenotipik ekspresyonları ayarlayan mekanizmalar iki sınıfa ayrılır: genetik adaptasyon (örneğin allel frekanslarında değişiklik) ve fenotipik esneklik [31, 32].

Fenotipik esneklik, bir genotipin farklı çevre koşulları altında farklı fenotipik özellikleri açığa çıkarması olarak tanımlanabilir. Fenotipik esneklik doğrudan çevresel etkileri fenotipte gösterir ve bu mekanizma kısa süreli çevresel varyasyonlara karşı adaptif bir strateji olabileceği gibi, adaptif olmayan ve organizmanın çevre ile kurduğu biyokimyasal

veya fizyolojik bir etkileşim sonucu da ortaya çıkabilir [32]. Canlının uyum bileşenini etkileyen birçok fenotipik ve genotipik karakter bileşenleri canlının yaşam öyküsüne katkıda bulur. Kompleks ve birbiriyle ilişkili karakterler yaşam öyküsü stratejilerinin devamlılığını sağlayabilmek için evrimleşmişlerdir. Canlıların çok çeşitli yaşam öyküsü stratejileri olmasına rağmen, yapılan çalışmalar yaşam öyküsü karakterlerinin birbirleriyle korelasyon içinde olduklarını göstermiştir. Ömür uzunluğu, üreme ile negatif korelasyon gösterirken, stres toleransı ile pozitif korelasyon göstermektedir [33, 34]. Doğal seleksiyon maksimum üretkenlik ve ömür uzunluğunu desteklemektedir, çünkü gelecek nesiller için genetik katkıyı en üst düzeye çıkarmak esastır. Fakat gerçekte bu iki yaşam öyküsü karakteri birbirleriyle ters bir ilişki içerisindedir. Örneğin, memeliler ve kuşlarda uzun yaşam süresi düşük doğurganlıkla ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda, yumurta verimi ile ömür uzunluğunun ters ilişki içerisinde olduğu gözlenmekte ve bunun üreme maliyetiyle ilişkili olduğu öne sürülmektedir [35]. Üreme, büyüme, somatik bakım ve onarım ve hareket gibi enerji gerektiren işlemler için yeterli kaynak yoktur ve bu nedenle bazı yaşam öyküsü karakterleri arasında bedel-uzlaş (trade-off) söz konusudur. Bir yaşam öyküsü karakterindeki artış canlının uyum başarısının artmasına neden olurken, bununla ilişkili olarak bir başka yaşam öyküsü karakterinde ise düşüş olması ve bu düşüşün canlının uyum başarısının azalmasına neden olması yaşam öyküsü karakterleri arasındaki trade-off olarak açıklanabilir [36]. Üreme, gamet oluşumunun maliyeti nedeniyle canlının hayatta kalabilirliğinin azalmasına neden olabilir veya üremeye yönlendirilen kaynaklar somatik bakım ve onarım için kullanılamadığından ömür uzunluğunu azaltabilir [35].

Diyapoz, canlının zor çevresel koşulları atlatarak popülasyonun devamlılığını sağlamasına olanak veren ve birçok yaşam öyküsü karakteri ile ilişkili bir karakterdir. Diyapoza giren dişi *D. melanogaster*'de diyapoz ile birlikte ömür uzunluğu ve soğuk ile açlık stresine karşı direnç artmaktadır [21, 22].

2.2. Diyapoz ve Reprodüktif Diyapoz

Mevsimsel olarak değişen çevresel koşullarda yaşayan canlılar, ritmik sıcaklık değişimleri, besin ve suya ulaşılabilirlik, predasyon baskısı, sığınak ve yuva bulma gibi durumlarla başa çıkabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmek zorunda kalmışlardır. Bu mekanizmalardan biri olan diyapoz, böceklerde metabolizmanın ve gelişimin durakladığı ve böceklerin zor koşullarda hayatta kalmak için geliştirdikleri bir karakterdir. Bitkilerde dormansi ve omurgalılarda hibernasyon da böcek diyapozuna benzer şekilde ve benzer mekanizmalarla, uygun olmayan çevresel koşulları atlatabilmek için birçok mekanizmanın

birlikte meydana getirdiği biyolojik süreçlerdir. Omurgalı veya omurgasız bütün türler değişen mevsimsel koşullara adapte olup gelişimlerini ve üreme döngülerini buna göre ayarlamaktadırlar [36].

Diyapoz, böceklerde farklı gelişim basamaklarında (yumurta, larva, pupa veya ergin) meydana gelebilen ve temelde nöroendokrin sistem ile kontrol edilen bir mekanizmadır. Diyapoz çevresel koşullara verilen aktif bir cevaptır. Böcekler, gün uzunluğu ve sıcaklık gibi mevsimsel olarak öngörülebilir ipuçlarını kullanarak kötü koşullar öncesi diyapoza girerler. Böcek diyapoz evresi türe bağlı değişkenlik göstermektedir. Örneğin *Bombyx mori*'de embriyo, güneybatı mısır zararlısı *Diatraea grandiosella*'da larva, *Sarcophaga crassipalpis*'te pupa ve *Culex pipiens*'te ergin dönemde diyapoz görülebilir [29, 36].

Birçok *Drosophila* türünün diyapoza girdiği bilinmektedir [36]. Böcek türlerinde çok farklı diyapoz stratejileri görülse de, *Drosophila* türlerinde en yaygın görülen diyapoz stratejisi “reproduktif diyapozdur”. Diğer adı ovaryum diyopozu olan reproduktif diyapozda, dişilerde ovaryum vitellogenesezi durur ve üreme için kullanılacak enerji bünyede saklanır. Reproduktif diyapoz ilk olarak *Drosophila nitens* [38] türünde tanımlanmış olup, daha sonra diğer *Drosophila* türlerinde de keşfedilmiştir [36]. *Drosophila*'da reproduktif diyapoz ılıman ve soğuk bölgelerde kışlamak için uygun bir stratejidir. Diyapoz süresi ve görülme sıklığı büyük ölçüde hem populasyon hem de tür seviyesinde değişkenlik gösterir [36]. Üreme diyopozu *Drosophila* dışında, sivrisinek *Culex pipiens* [39], kral kelebeği *Danaus plexippus* [40] ve birçok çekirge türünde [41] de çalışılmaktadır. Yapılan çalışmalarda iplik kurdunun (*Caenorhabditis elegans*) dauer formu *Drosophila*'daki reproduktif diyapoz ile, gerek diyapoz fenotipini etkileyen gen etkileşimleri, gerekse fizyolojik (hormonlar gibi) mekanizmalar yönünden oldukça benzerlik göstermektedir [29].

Diyapoz, yüksek enlemlerdeki soğuk iklimlerde canlıya avantaj sağlamaktadır. Çünkü, diyapoz dişilerin birkaç ay süren soğuk kış koşullarında hayatta kalmasını sağlarken, iklimsel koşullar düzeliş sıcaklık ve gün uzunluğundaki artışla birlikte canlının diyapozdan çıkıp tekrar yumurta bırakmasına olanak sağlar [42]. Yüksek enlemlerde bulunan *Drosophila* türlerinde diyapoz, kötü koşulları geçirmek için seçilen ve sıklıkla gözlenen bir durum olmasına rağmen, tropikal *Drosophila* türlerinde de düşük düzeyde de olsa diyapoz görüldüğü bilinmektedir [43]. Reproduktif diyapoz birçok *Drosophila* türünde yaygın olarak görülse de, hepsi için bir kışlama stratejisi olmayabilir. Örneğin, *D. robusta* dişilerinin çevresel sıcaklığın çok düşük olmadığı Ağustos-Eylül aylarında diyapoza

girdiği bilinmektedir [44]. Diğer yandan, üreme diyopozu dişilerin kışlamasındaki tek metot değildir. Örneğin, *D. curviceps*, *D. immigrans* ve *D. albomicans* türlerinin yayılım alanı tropik ve subtropik bölgelerdir ve bu türler kışlama stratejisi olarak yaşamalarına olanak verecek sıcaklıktaki bölgelere göç etmektedir [45]. *D. pseudoobscura* ve *D. subobscura* türleri ise kışı ergin formda geçirmekte ve kış boyunca üremelerini sürdürmektedirler [46].

D. melanogaster'de ergin reproduktif diyapoz 25 yıl önce ilk defa tanımlanmış ve klasik böcek diyapozunun birçok özelliğini gösterdiği görülmüştür [47]. Reproduktif diyapoz zor koşullar altında canlının hayatta kalabilirliğini arttırması yönünden klasik böcek diyapozuna benzese de birçok yönüyle klasik diyapozdan ayrılmaktadır. Örneğin, klasik böcek diyapozunda canlı diyapoz süresince kullanacağı besini diyapoza girmeden önce vücudunda depolar ve depoladığı besin diyapoz süresince kullanılır. Buna karşın *D. melanogaster*'de reproduktif diyapoz önceden programlanan bir süreç değildir ve diyapoz süresince az da olsa besin alımı görülür. Ayrıca, besin depolamayla ilişkili genlerin reproduktif diyapoz sırasında ekspresyonlarında meydana gelen değişimler *D. melanogaster*'de reproduktif diyapozun aktif bir süreç olduğunu düşündürmektedir [48].

Birçok *Drosophila* türü gibi *D. melanogaster* de kışı ergin formda geçirmekte ve bu, popülasyonun devamlılığını sağlamaktadır. Afrika kökenli bir tür olan *D. melanogaster*'de üreme diyopozu atasal Afrika popülasyonlarında ve kardeş türü olan *D. simulans*'ta görülmemektedir. Bu nedenle, bu adaptif karakterin *D. melanogaster*'in son buzul çağından sonra ılıman bölgelere yayılmasıyla ilişkili olarak yakın zamanda ortaya çıktığı düşünülmektedir [49].

Reproduktif diyapoz *D. melanogaster*'de, kısa gün uzunluğu ve orta dereceli düşük sıcaklık (10/14 saat aydınlık/karanlık, 12°C) ile tetiklenmektedir. Reproduktif diyapozun canlının uyum başarısına etki eden farklı yaşam öyküsü karakterleriyle de ilişki olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda diyapoz fenotipi gösteren dişilerde ömür uzunluğunda ve lipit depolamasında artış olduğu ayrıca açlık ve soğuk stresi gibi çeşitli stres toleranslarına direncin arttığı gözlenmiştir [21, 22, 29, 50]. Diyapoz ifadesi *D. melanogaster* popülasyonlarında varyasyon göstermekte ve bu varyasyonun temelinde popülasyonların bulunduğu çevrenin ve genetik faktörlerin yattığı bilinmektedir [19]. Bu farklılıklar değişik çevrelerdeki popülasyonların genotipinde sahip oldukları yüksek ve/veya düşük diyapoza girme eğiliminden kaynaklanmaktadır.

Diyapoz ile yaşlanma ilişkisini gösteren birçok çalışma yapılmıştır [48, 51, 52]. Örneğin, Tatar ve arkadaşları [51] *D. melanogaster*'de belirli bir süre diyapozda kalan post-diyapoz dişiler ile pupadan yeni çıkan ve diyapoza hiç girmeyen genç dişilerin yaşlanma örüntülerini karşılaştırmışlardır. Sonuçlar post-diyapoz dişiler ile genç dişilerin yaşlanma örüntüleri arasında farklılık olduğunu, reproduktif diyapoza giren dişilerde yaşlanma sürecinin yavaşladığı saptanmıştır. Çalışmanın bir sonraki aşamasında *D. melanogaster*'deki bu yaşlanma örüntüsünün düşük sıcaklıkla ilişkili olup olmadığı başka bir böcek olan *Pyrrhocoris apterus* (alev tahtakurusu) ile araştırılmıştır [30]. Bu araştırmaya göre, *P. apterus*, *D. melanogaster* gibi kısa gün uzunluğunda diyapoza girmektedir, ancak diyapoza girme sıcaklığı *D. melanogaster*'e göre daha yüksektir. *P. apterus*'un diyapoza giren erginleri girmeyen erginlerinden iki kat daha uzun yaşamaktadır [53]. Diyapoza giren *P. apterus* dişileri bir süre sonra non-diyapoz koşullara transfer edildiklerinde, aynı *D. melanogaster*'deki gibi post-diyapoz dişilerin ömür uzunluğunun pupadan yeni çıkan dişilerle aynı olduğu gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar reproduktif diyapozun, üremeyi baskılaması nedeniyle yaşlanmayı dolaylı olarak etkilediğini düşündürmektedir [54].

Üreme diyapozunun enlemsellik ile ilişkisi, Schmidt ve Paaby'nin [22] *D. melanogaster*'in Kuzey Amerika popülasyonlarıyla yaptığı çalışmayla ortaya konmuştur. Bu çalışmaya göre diyapoz ifadesi Kuzey Amerika'da, güney enlemlerden kuzey enlemlere doğru gidildikçe artmaktadır. Aynı çalışmada yine güney enlemlerden kuzey enlemlere gidildikçe diyapozla ilişkili karakterlerde enlemsellik görülmüştür. Bu enlemsellik kuzey enlemlerde ortalama ömür uzunluğunda artış, üreme gücünde düşüş, soğuk toleransında artış ve sıcaklık direncinde düşüş olarak gözlenmiştir.

Kuzey Amerika'nın doğusunda yapılan bir çalışmada, reproduktif diyapozun güçlü enlemsel klin gösterdiği ve sineklerin %90'ının ılıman habitatlarda reproduktif diyapoza girdiği, neotropikal habitatlarda ise bu oranın %30 olduğu gözlenmiştir [21]. Emerson ve arkadaşlarının [55] Kuzey Amerika popülasyonlarıyla yaptığı çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre, kısa gün uzunluğu koşullarında ve 12°C'de kuzey popülasyonlarında güney popülasyonlarına göre diyapoz görülme oranının daha fazla olduğu ortaya konmuştur.

2.3. Diyapozu Kontrol Eden Faktörler

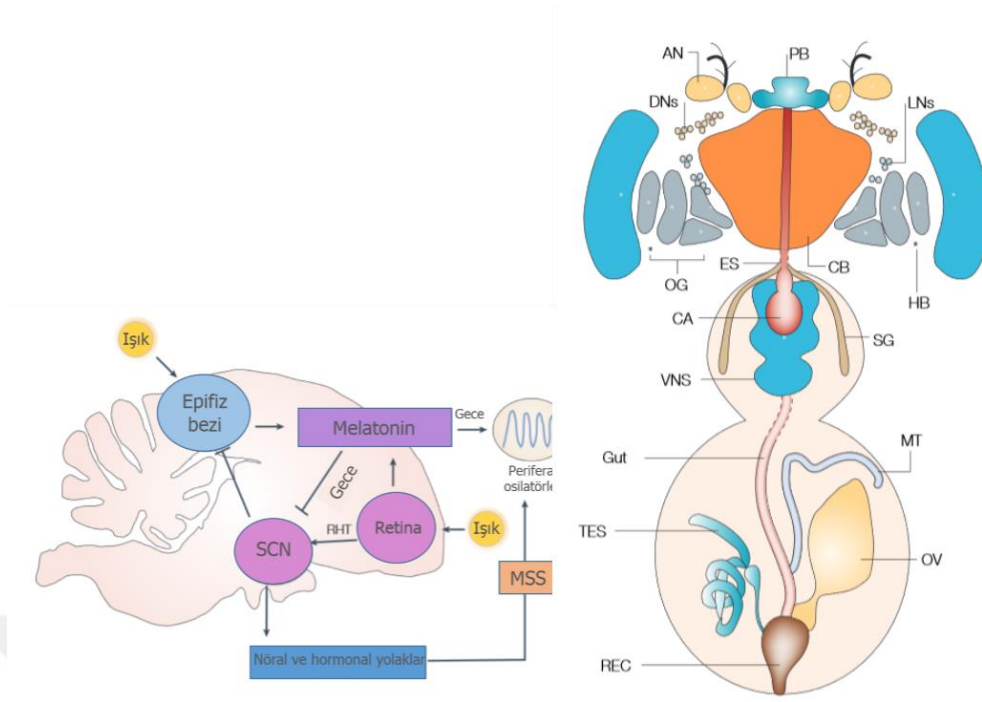
2.3.1 Sirkadiyen Saat

Tüm canlıların fizyolojik ve metabolik aktiviteleri, davranış ve gen ifadeleri belirli bir günlük ritim göstermektedir [56]. Bu günlük ritimler, her ne kadar çevresel döngüden etkilense de, çevresel değişkenlerin olmadığı durumlarda canlıların sahip olduğu sirkadiyen saatle (circadian clock) kontrol edilmektedir. Sirkadiyen saat vücuttaki pek çok ritmi kontrol eder ve bazı çevresel değişkenlerce düzenlenir. Eskin'e göre [57] sirkadiyen saatin üç basit aşaması vardır. Buna göre, birincisi çevresel değişkenleri algılayan ve bunları sirkadiyen osilatörlere aktaran bir giriş yolağı, ikincisi zamanı belirleyen ve dış yolakları aktive eden sirkadiyen osilatörler ve üçüncüsü çeşitli gen ifadeleri, metabolik, fizyolojik ve davranışsal süreçleri düzenleyen dış yolaklardır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Sirkadiyen sistemin bileşenlerinin şematik gösterimi.

Canlılarda ışık, sıcaklık gibi çevresel değişkenler, sirkadiyen osilatörlerin cevabını belirler ve bu cevaba göre fizyolojide, metabolizmada ve davranışta kendini gösteren ritimler günün uygun saatlerinde ortaya çıkarlar. Işık, sirkadiyen osilatörleri etkileyen en önemli çevresel değişkendir ve farklı türlerde farklı dokulardaki metabolik mekanizmaları etkiler. Memelilerde ışık gözdeki retinal ganglion hücrelerinde bulunan melanopsin tarafından algılanır ve retinohipotalamik yol boyunca suprachiasmik çekirdekdeki (suprachiasmatic nucleus - SCN) “ana saat”e (“master clock”) sinyal iletir. Bu sinyaller SCN’deki sirkadiyen osilatörler tarafından algılanıp beyindeki ve periferik organlardaki osilatöre bilgi aktarılır. Böylece sirkadiyen ritmin kordinasyonu sağlanır [58]. Memelilerdeki bu iki basamaklı mekanizma *Drosophila*’da farklılık gösterir. *Drosophila*’da osilatör hücreler ışığı direkt veya fotoreseptör hücreleri aracılığıyla algılar. *Drosophila*’da beyin ve vücudun çeşitli bölgelerinde bulunan birçok osilatör hücre vardır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Memeli beyinde (solda) ve *Drosophila*'da (sağda) osilatörler (Bell-Pedersen ve arkadaşlarından [59] alınmıştır).

2.3.1.1. Işık ve Sıcaklık

Bilindiği üzere fotoperiyot, gün uzunluğunda meydana gelen değişikliklerdir ve birçok mevsimsel gelişim döngüsünün kontrol edilmesinde anahtar rol oynar. Canlılarda sirkadiyen saat kavramını ortaya koyan Alman botanikçi Erwin Bünning, mevsimsel fotoperiyodun günlük sirkadiyen saat döngüsünden etkilendiğini ve bu mekanizmanın altında temel olarak gün ışığında meydana gelen değişimlerin olduğu hipotezini 1936 yılında ortaya koymuştur [60]. Bu hipotez doğrultusunda böcek fizyolojisi, metabolizması ve davranışsal olaylarının fotoperiyottan nasıl etkilendiğini açıklamaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır.

Reprodüktif diyapoz *Drosophila*'da sıcaklık, fotoperiyot ve hormonal regülasyonla kontrol edilmektedir. Diyapozun ortaya çıkmasında sıcaklık ve fotoperiyotun etkisi *Drosophila* türlerinde farklılık göstermektedir. Örneğin, *D. robusta* dişileri görece daha sıcak koşullar altında diyapoza girmektedir ve bu tür için fotoperiyotta meydana gelen değişimlerin diyapozun görülmesindeki temel mekanizma olduğu ortaya konmuştur [44]. Japonya'da endemik bir tür olan *D. lummei* gün uzunluğu 17 saatten daha az olduğunda diyapoza girmektedir [36]. Aynı bölgede bulunan *D. triauraria*'nın diyapoza girmesi için gerekli gün uzunluğu ise 10-12 saattir [45]. Bu türün diyapoz süresi kuzey populasyonlarında güneydeki populasyonlarına göre daha uzundur ve bu türde kendileşmiş soylarla yapılan

çalışmada diyapoz için gerekli kritik gün uzunluğu ile diyapoz süresinin orantılı olmasından dolayı diyapoz ile kritik gün uzunluğunun enlemsel klin gösterdiği ortaya konmuştur [61]. Genellikle kuzey enlemlerde bulunan populasyonlar, güneyde bulunan populasyonlara göre daha uzun kritik gün uzunluğunda diyapoza girmektedir. *D. littoralis*'in doğal populasyonlarında reproduktif diyapoz için gerekli kritik gün uzunluğunun 12-20 saat arasında değiştiği ve bu türün kritik gün uzunluğunun enlemsel klin gösterdiği, ayrıca kuzey enlemlerde bulunan populasyonlarının daha uzun kritik gün uzunluğu altında reproduktif diyapoza girdiği gözlenmiştir [62]. Aynı şekilde, kuzey enlemlerde bulunan *D. montana*'da da enlem ile kritik gün uzunluğu arasında bir ilişki olduğu ortaya konmuştur [63].

D. melanogaster'de diyapozu fotoperiyot ve sıcaklığın [47] birlikte mi etkilediği veya yalnızca düşük sıcaklığın mı [29] diyapoza girmede etkili olduğu tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan deneylerde *D. melanogaster*'in diyapoza girebilmesi için gerekli kritik gün uzunluğunun 14°C'de 14 saatten az olduğu bulunmuştur [47]. Sıcaklık düştükçe fotoperiyotun önemi kalmamış ve dişilerin uzun gün uzunluğu altında olmalarına rağmen (16 saat aydınlık / 8 saat karanlık) 10°C'de diyapoza girdikleri gözlenmiştir [47]. Emerson ve arkadaşlarının [55] *D. melanogaster*'in Kuzeydoğu Amerika populasyonlarıyla (Florida-27°K ve Maine-44°K) yaptığı çalışmada, farklı sıcaklıklarda ve farklı fotoperiyotlarda deney düzenekleri kurulmuş ve bu deneyin sonucunda, reproduktif diyapozda sıcaklığın daha baskın bir etken olduğu gösterilmiştir. Kuzey Amerika populasyonlarında sıcaklığın 12°C'den 10°C'ye düşmesi sonucunda diyapoz görülme oranının %20'den %80'e artış gösterdiği belirlenmiştir [55]. Benzer şekilde, Avustralya populasyonlarında da önerilen sıcaklıklarda (11-12°C) ve kısa gün uzunluğunda (10 saat aydınlık/14 saat karanlık) diyapoz oranının oldukça düşük olduğu, sıcaklık 10°C'ye düşürüldüğünde daha yüksek diyapoz oranı görüldüğü ortaya konmuştur [5].

2.3.1.2. Sirkadiyan Osilatör ve Dış Yolaklar

Reproduktif diyapoz fotoperiyotta meydana gelen döngüsel değişimlerle ilişkili olmasından dolayı, sirkadiyen döngülerin ve bu döngülerde rol oynayan, sirkadiyen osilatör olarak görev alan zaman genlerinin (*clock genes*) *Drosophila*'daki reproduktif diyapozla ilişkisini araştıran birçok çalışma vardır. Konopka ve arkadaşlarının [65] *Drosophila*'da *period (per)* geni mutantlarını keşfetmesiyle bu genin sirkadiyen saatten sorumlu bir gen olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışmadan sonra sirkadiyen saat döngüsünde rol oynayan birçok gen keşfedilmiştir. Bunlar zaman gen ailesinden olan *clock (clk)*, *cycle*

(*cyc*), *timeless* (*tim*), *doubletime* (*dbt*), *shaggy* (*sgg*) ve *cryptochrome* (*cry*) genleridir. Sirkadiyen ritimleri düzenleyen *per* geni ve fotoperiyodu düzenleyen *tim* (*Timeless*) geni arasındaki ilişki *Drosophila*'da sirkadiyen ritim ve fotoperiyodu düzenleyen mekanizmanın merkezinde yer alır [66].

per geni, sirkadiyen döngünün düzenlenmesini sağlasa da reproduktif diyapoz ile arasında zayıf bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [47, 67]. Saunders ve arkadaşlarının [47] sirkadiyen döngü göstermeyen (aritmik) *per* geni mutantları ile yaptığı çalışmada, sirkadiyen döngüyü düzenlemek için *per* geni aktif olmasa da, dişilerin reproduktif diyapoza girdiği görülmüştür. Ayrıca, yapılan çalışmalarda *D. melanogaster*'de *per* geninde tekrar eden bölgelerin bulunduğu ve bu bölgelerde baskın olarak Treonin-Glisin (Thr-Gly) aminoasitleri kodlandığı gözlenmiştir [68]. Bu aminoasitlerin kısa alel - (Thr-Gly) 17 ve uzun alel - (Thr-Gly) 20 olarak polimorfizm gösterdiği ve Avrupa ile Kuzey Afrika'da enlemsel klin oluşturduğu bulunmuştur [69, 70]. Benzer şekilde reproduktif diyapoz da enlemsel klin göstermektedir. Bu nedenle, bu alellerde görülen varyasyonun diyapoz fenotipiyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Fakat, yapılan çalışmalarda böyle bir ilişkiye rastlanmamıştır [36].

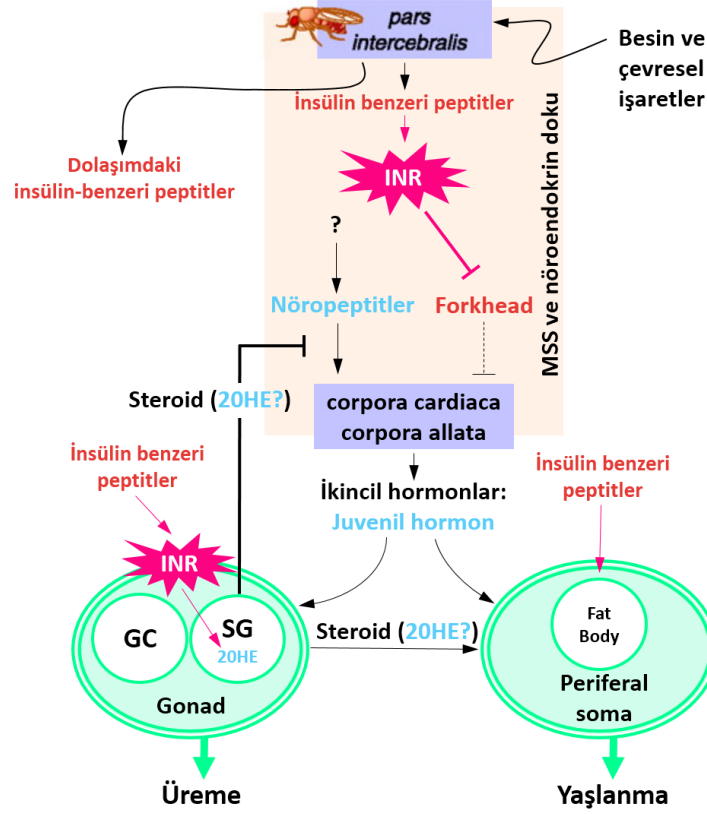
tim geninin ışığa karşı duyarlı bir gen olması nedeniyle, fotoperiyodu düzenlemede ve diyapoz fenotipinin ortaya çıkmasında etkili bir gen olduğu düşünülmektedir [71]. *tim* geninde tek nükleotitte meydana gelen delesyon ile atasal *S-tim* aleline karşılık *LS-tim* aleli oluşmuştur ve bu alelden uzun form L-Tim₁₄₂₁ ve kısa form S-Tim₁₃₉₈ olmak üzere iki farklı protein sentezlenmektedir [72]. Tauber ve arkadaşlarının [71] *D.melanogaster*'in Avrupa popülasyonlarıyla yaptığı çalışmada, *ls-tim* aleline sahip dişilerin, *s-tim* aleline sahip dişilere göre daha fazla diyapoz fenotipi gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca *ls-tim* alelinin enlemsel klin gösterdiği, Avrupa'nın güney popülasyonlarında frekansı yüksekken (İtalya'da en yüksek), kuzey enlemlere gidildikçe frekansında düşüş olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, *s-tim* aleline sahip dişilerden, kuzey enlemdeki dişilerde güney enlemlerdekine göre daha yüksek oranda diyapoz görüldüğü ortaya konmuştur [71].

2.3.2. Hormonal Regülasyon

Böceklerde de omurgalılarda olduğu gibi sahip oldukları sinir ve endokrin doku çok çeşitli fizyolojik fonksiyonları ve yaşam öyküsü karakterlerini kontrol eder (Şekil 2.3). Böceklerde, salgı yaparak fizyolojik fonksiyonları düzenleyen dokular, endokrin bezlerinden, larval ektisteroitleri salgılayan protoraks bezlerinden ve lipit benzeri juvenil hormon (JH) salgılayan corpora allatadan oluşur. Ergin dişi bireylerde ektisteroitler

ovaryumdaki folikül hücrelerinden salgılanır [73]. Bunların yanı sıra, diyapoz ışık şiddetindeki değişimlere hassas olan bir karakter olduğu için, sinyal iletimi gözlerden başlayarak pars intercerebralis, pars lateralis ve beyindeki diğer salgı yapan bölgeleri uyarır. Omurgalılarıdaki hipotalamus ve hipofiz bezinin etkileşimine benzer şekilde, pars intercerebralisteki nörosalgı hücrelerinden salgılanan uyarıcı veya inhibe edici nöropeptitler salgı yoluyla endokrin bezlerinin salgısını kontrol eder. Pars intercerebralis, *D. melanogaster*'de insülin benzeri peptitlerin ana salgılanma yeridir. İnsülin benzeri peptitler pars intercerebraliste salgılandıktan sonra protocerebruma oradan corpora cardiaca sonra da hemolenfe geçer. Böcek juvenil hormonunun sentezi nöropeptitlerle kontrol altındadır ve insülin sinyal yolağı direkt olarak nöropeptitlerin salgısını kontrol eder veya insülin benzeri peptitler direkt olarak JH salgılanmasını sağlar. Her iki yolda da insülin ligandı veya reseptöründe meydana gelen inhibisyon JH sentezini azaltabilmektedir [74].

Böceklerde juvenil hormon, üreme ve gelişim gibi fizyolojik olaylarda rol oynayan en önemli hormondur ve bu nedenle yaşam öyküsü karakterlerini düzenlemektedir [75]. Fotoperiyot, nem ve sıcaklık gibi birçok diğer faktörün yanında, üreme diyapozunun juvenil hormonun miktarındaki düşüşle ilgili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [76, 77]. Reprodüktif diyapozdaki dişilerde Yolk proteinlerinin (YP) hemolenfte, ovaryumlarında olduğundan daha fazla miktarda bulunduğu gözlenmiştir [64]. Uzun gün uzunluğunda olan diyapoza girmeyen dişiler ile, kısa gün uzunluğunda diyapoz koşulları sağlanmış, ancak sıcaklıkta yapılan değişimler sonucu (12°C'den 25°C'ye geçilmesi) diyapoza girmesi engellenen dişilerin ovaryumlarında YP miktarının arttığı bulunmuştur [36]. Ayrıca, bu dişilerde diyapozda olan dişilere göre dört kat daha fazla JH üretimi görüldüğü gözlenmiştir [78]. *D. melanogaster*'de corpora allata tarafından sentezi kontrol edilen JH hormonunun miktarının artması YP'nin ovaryumda artmasına neden olmaktadır [78]. Corpora allatası çıkarılan (allatektomi) böceklerde juvenil hormonun salgısının durmasına bağlı olarak birçok böcek türünde organizmanın diyapoza girdiği ve bunun yanında ömür uzunluğunda artış olduğu görülmüştür [79]. Allatektomi uygulaması yapılan böceklerde diyapozu tetiklemeyen normal koşullarda böceklerin üreme durgunluğuna girdikleri ve yaşam süresinin uzadığı, allatektomi yapılan erginlere juvenil hormon verildiğinde ise, üremenin uyarıldığı ve yaşam süresinin azaldığı görülmüştür [79].



Şekil 2.3. *D. melanogaster*'de diyapozun hormonal kontrolünün şematik gösterimi (Tatar ve arkadaşlarından [74] alınmıştır).

Reproduktif diyapozu düzenleyen temel mekanizma insülin sinyal yolağıdır. Diyapoz, juvenil hormondaki düşüş ile ortaya çıkmakta ve bunun insülin sinyal yolağının down-regülasyonu (azalarak düzenlenmesiyle) ilişkili olduğu bilinmektedir. İnsülin sinyal yolağının üreme ve yaşlanmada da önemli rol oynadığı bilinmektedir [74, 75]. Diyapoza giren bireylerde stres direncindeki artış yine insülin sinyaliyle ilişkilidir [74]. Birçok çalışmada reproduktif diyapozun insülin sinyal yolundaki, juvenil hormondaki ve ektizon hormonundaki düşüşle ilişkili olduğu gösterilmiştir. İnsülin benzeri sinyal reseptöründe (Insulin-like receptor - *InR*) ve insülin reseptör substratını kodlayan gende (*chico*) meydana gelen mutasyonların *D. melanogaster* erginlerinin ömür uzunluğunu arttırdığı gösterilmiştir [34, 35, 74]. *InR* mutantlarının diyapoz fenotipine benzer şekilde, stres direncinde ve ömür uzunluğunda artış ve ovaryum gelişiminde azalma olduğu görülmüştür [51]. İnsülin reseptör substrat proteininin yokluğunda ise, ovaryum gelişiminde azalma veya stres direncinde artış olmaksızın ömür uzunluğunun arttığı bulunmuştur [80]. Bununla birlikte, *InR* mutantlarında juvenil hormon miktarında değişiklik olmadığı gözlenmiştir [81].

D. melanogaster'deki reprodüktif diyapoza benzer şekilde *C. pipiens*'te de reprodüktif diyapoz gözlenmektedir. Sim ve Denlinger'in yaptıkları çalışmada [82], *InR* gen ekspresyonu olmayan *C. pipiens* dişilerinin reprodüktif diyapoza girdiği, ayrıca diyapoza giren bu dişilere JH uygulandığında ise diyapozun bozulduğu gözlenmiştir.

Tatar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [29], diyapoza giren dişilere juvenil hormon verilmiş ve bunun sonucunda diyapozun durduğu ve oosit gelişiminin uyarıldığı gösterilmiştir. Bir başka çalışma, seminal sıvıda bulunan seks peptidinin juvenil hormon sentezini uyardığı, bu nedenle çiftleşmiş dişilerin diyapoza girmesinin daha zor olduğunu göstermiştir [83].

Juvenil hormonun diyapoz üzerindeki etkisi fazla olsa da, diyapoza etki eden başka hormonlar da vardır. Richard ve arkadaşları [84] vitellogenozin juvenil hormon olmaksızın da gerçekleşebileceğini, fakat 20-Hidroksipektizon (20E) olmadan gerçekleşemediğini bulmuşlardır. Ergin dişilerde ektizonun aktif formu olan 20E yumurtanın folikül hücrelerinde sentezlenmektedir [85]. Ayrıca 20E'nin diyapozu durdurabildiğini ve juvenil hormondan daha etkili olabileceğini göstermişlerdir. Diyapozda olan *D. melanogaster* dişileri diyapoza girdikleri sıcaklıktan 25°C'ye alındıklarında diyapoz durmakta ve 8-12 saat sonra da vitellogenoz başlanmaktadır. Bu deney sırasında 25°C'ye alınan dişilerde 20E'nin seviyesinin arttığı gözlenmiştir [86].

Ektizon da juvenil hormon gibi ergin bireyde yolk proteininin oluşumunda görevlidir. Juvenil hormon ve 20E kompleksinin regülasyonu tam olarak anlaşılamamıştır ve oogenezin farklı aşamalarında farklı şekilde ifade oldukları düşünülmektedir [87]. Gelişim aşamasının 8. ve 9. evrelerinde olan oositler, 20E miktarının artışıyla birlikte apoptoza uğramakta ve bu *BR-C* gibi ektizon erken cevap genleriyle kontrol edilmektedir [88, 89]. Bu olay canlının besin maddesine ulaşılabilirliğine göre yumurta üretmesiyle ilgilidir [88]. Dişiler besin kısıtlamasıyla karşılaştıklarında insülin sinyali down-regüle olmakta ve JH miktarında düşüş meydana gelmektedir [35]. Ayrıca JH, 20E'nin 9. evredeki oositin apoptozunu durdurmaktadır [89].

2.4. Diyapoza Etki Eden Genetik Faktörler

Diyapoz fenotipinin altında yatan genetik etmenler, böceklerde oldukça kompleks olmakla birlikte birçok farklı yolağın etkileşim içinde olduğu ve her türde farklılık gösterdiği bilinmektedir [90]. Yapılan önceki çalışmalarda *timeless (tim)*, *couch potato (cpo)* ve *dp110* gibi birçok gen diyapoz için aday gen olarak belirlenmiştir [19]. Ayrıca iki temel yolak olan sirkadiyen saat ve insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü sinyal

(insulin/insulin-like growth factor signaling – IIS) yolağının diyapozun ifadesini düzenlediği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [51, 71].

Schmidt ve arkadaşları [91], diyapozun genetik kontrolünün üçüncü kromozomda bulunan bir veya daha fazla genden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Ayrıca, QTL haritalama, linkaj eşitsizliği (linkaj disequilibrium) ilişkileri ve tamamlayıcı analizler sonucunda RNA bağlayıcı protein kodlayan gen (RNA binding protein encoding gene) olan *cpo*'nun, *D. melanogaster*'in Kuzey Amerika populasyonlarında reproduktif diyapozu etkileyen 'temel gen' olduğunu ortaya koymuşlardır [91]. *D. melanogaster*'de *cpo* geni yaklaşık 84 kb uzunluğunda olmakla birlikte, yedi farklı transkripti vardır ve bunların ekspresyonu embriyo, larva ve erginde, periferik ve merkezi sinir sisteminde gerçekleşmektedir [92]. Schmidt ve arkadaşları [91], *cpo* geninin yedi transkriptinin birinde 5. ekzonun 3' sonunda, 356. aminoasitte (C/T, *cpo*^{Ala356Val}) SNP'e rastlanmış ve bu Ala/Val değişimine neden olan polimorfizmin enlemsel klin gösterdiği ayrıca Valin aminoasitini kodlayan alelinin yüksek diyapoz gösteren bireylerde daha yaygın olduğunu belirlemiştir. 462. aminoasitte meydana gelen (T/A, *cpo*^{Ile462Lys}) SNP polimorfizmin ise, diyapoz ile daha yüksek bir ilişki içerisinde olduğu ve yüksek diyapoz gösteren bireylerde bu değişimin daha sık görüldüğü gözlenmiştir. Ayrıca, bu çalışma *cpo* geninin ekspresyon düzeyinin diyapoz fenotipini etkilediğini, artan ekspresyonun düşük diyapoz oranıyla, ekspresyonun düşmesinin ise, yüksek diyapoz oranıyla sonuçlandığını ortaya koymuştur [91]. Bu gende 462. aminoasitte meydana gelen polimorfizmin 12 *Drosophila* genomunda yüksek çeşitlilik gösterdiği, ayrıca *D. melanogaster*'in kardeş (sibling) türü olan *D. simulans*'ta gözlenen düşük diyapoz oranının bu türde bu bölgenin olmamasıyla ilişkili olduğu öne sürülmüştür [91]. Ayrıca, *cpo*'nun insülin sinyal yolu ile diyapozun hormonal kontrolü arasındaki bağlantı olduğu düşünülmektedir [90].

Alel frekansında gözlenen klinal varyasyonun yeni ortama adaptasyonla ilişkisini doğrulamanın bir yolu, gözlenen klinal varyasyonun farklı zamanlarda varlığını değerlendirmektir. Ayrıca, aynı klinal örüntülerin farklı kıtalardaki varlığı, polimorfizmin adaptif bir role sahip olma olasılığını desteklemektedir [93]. Cogni ve arkadaşları [8], Florida - Kanada arasında 3 yıl boyunca farklı enlemlerden toplanan *D. melanogaster*'in 20 populasyonu ile yaptıkları çalışmada, Schmidt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçlarına benzer sonuçlara ulaşmışlardır. Ayrıca, Schmidt ve arkadaşlarının [50] 1997 yılında toplanan Pensilvanya populasyonlarıyla yaptıkları çalışmaya benzer şekilde 2009-2010 yılında toplanan populasyonlarda da aynı SNP'ler gözlenmiştir [8]. Buna ek olarak,

yaz mevsiminde diyapoza neden olan genlerin alel frekanslarındaki düşüşle diyapoz görülme oranındaki düşüşün ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Lee ve arkadaşlarının [5] Avustralya'nın doğusundaki populasyonlarla yaptıkları çalışmada ise, *cpo*^{48034(A/T)} alelinin frekansının enlemle birlikte artış gösterdiğini, fakat diyapoz fenotipini büyük oranda etkilediği düşünülen bu alelin, Avustralya populasyonlarında diyapoz ile ilişkisinin olmadığını ortaya koymuşlardır.

Diyapoz ile ilişkili *cpo* ve *InR* gibi gen bölgeleri, üçüncü kromozomun sağ kolunda (3R) bulunmaktadır ve 3. kromozomda görülen *In(3R)Payne* inversiyonu ile ilişkilidirler [91]. Ömür uzunluğu, stres toleransı gibi canlının uyum başarısına etki eden karakterler birçok canlı grubunda insülin yolağındaki mekanizmalarla düzenlenmektedir. *In(3R)Payne* inversiyonu içerisinde bulunan ve diyapoz ile ilişkisi ortaya konmuş bir diğer aday gen, insülin ile düzenlenen *PI3K* (İnsülin-regulated phosphatidylinositol 3 kinase – *dp110*)'dır. Williams ve arkadaşları [94] yaptıkları çalışmada, ayrılma analizleri ile *dp110* geninin diyapoz ile ilişkili aday gen olduğunu öne sürmüşler ve bu gen bölgesi bakımından delesyon içeren mutantlarla yaptıkları çalışmada, *dp110* geninin ifadesindeki düşüşün, diyapoz görülme oranını arttırdığını bulmuşlardır. Fakat, doğal olarak meydana gelmiş herhangi bir aminoasit varyasyonu bu gende gözlenmemiştir. *Dp110* geninin *D. melanogaster*'de insülin sinyal yolağını düzenleyerek diyapoza etki ettiği düşünülmektedir [82].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla diyapoz fenotipinin global transkripsiyon profili çıkarılmaya çalışılmıştır. Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışma [19], *D. melanogaster*'de diyapozun, binlerce genin regülasyonu ile düzenlendiğini ortaya koymuştur. Diyapoz gösteren ve göstermeyen bireylerde birçok genin farklı şekilde ekspresyon gösterdiği, ayrıca nöroendokrin ve endokrin sistem ile ilişkili olan beyin ve ovaryumdaki genlerin de bu iki farklı vücut bölgesinde farklı olarak ekspresyonunun gerçekleştiği yine aynı çalışmada gözlenmiştir. Başka çalışmalarda çeşitli yaşam öyküsü karakterleri için aday genler olarak belirlenen bazı insülin yolağı genlerinin de diyapoza girmiş dişilerin beyin ve ovaryumlarında farklı şekilde ekspresyonunun olduğu bulunmuştur [19]. Bu genlerden *dock*, *foxo*, *InR*, *Pdk1*, *Ptn* ve *RpL8*'in beyinde, *chico*, *dock*, *melt*, *Pdk1*, *Pi3K21B* ve *Pi3K92E* (*Dp110*)'nin de ovaryumlarda farklı transkripsiyon gösterdiği de ortaya konmuştur. Bahsedilen insülin yolağı genlerinin diyapoz gösteren ve göstermeyen dişilerde farklı transkripsiyon profili göstermelerinden dolayı bu genlerin diyapozun kontrolünde rol oynayan aday genler olabileceği önerilmiştir [19].

İnsülin sinyal yolağındaki herhangi bir lokus hangi pozisyonda bulunduğuna bakılmaksızın önemli doğal genetik varyasyona neden olmaktadır [26]. İnsülin sinyal yolağı *Drosophila*'da temelde, omurgalı insülin/insülin benzeri büyüme faktörlerinin (IGFs – insulin/insulin-like growth factors) homologu olan sekiz insülin benzeri peptit (DILP1-DILP8 - insulin-like peptides), transkripsiyon faktörü (dFOXO - Forkhead box O transcription factor), insülin benzeri reseptör (InR - insulin-like receptor) ve memeli ortoloğu olan insülin reseptör substratından (CHICO - insulin receptor substrate) oluşmaktadır [95]. Bu insülin yolağındaki genlerden *chico*'nun vücut büyüklüğü, lipid depolama ve ömür uzunluğu ile ilişkili olduğu, ayrıca *dFoxo*'nunda ömür uzunluğuyla ilişkili olduğu bilinmektedir [30, 96].

Kubrak ve arkadaşları [48], DILP2-3-5'in diyapoz üzerindeki etkisini ortaya koymuşlardır. Bu üç DILP'nin beyinde insülin üreten hücrelerde (IPCs – insulin-producing cells) ifade edilmekte ve stres toleransı, yumurta verimi, metabolik homeostasis ve ömür uzunluğunun düzenlenmesinde etkilidir [48]. Yaptıkları çalışmada, diyapoz fenotipi gösteren *D. melanogaster* dişilerinde besin alımında azalma görüldüğü ve karbonhidrat dolaşımında ve depolanmasında değişim gözlemlendiği, ayrıca DILP'lerin, adipokinetik hormonun (AKH) ve iki bağışıklık geninin transkripsiyonunda up-regüle olduğu ortaya konmuştur. Bunlara ek olarak, insülin sinyal yolağında *dilp5*, *dilp2* veya *dilp3* genlerini içermeyen mutantlarla yapılan çalışmalarda, diyapoz görülme oranında artış gözlenmiştir. Ayrıca *dilp*'lerin ekspresyonunda değişimler olmasına rağmen, *InR*'nin mRNA miktarının 9 haftalık diyapoz süresince ve sonrasında, diyapoza girmeyen ve yeni pupadan çıkan bireylerde eşit miktarda olduğu ortaya konmuştur [48].

İnsülin sinyal yolağındaki gen mutantlarıyla yapılan çalışmalar ve bu genlerin pleiotropik etkileşimleri arasında gözlenen korelasyonların, doğal populasyonlarda yaşam öyküsü karakterlerinde gözlenen varyasyonlara neden olabileceği düşünülmektedir [26]. İnsülin sinyal yolağında up-stream element olan *InR* geninin de yaşam öyküsü karakterlerinde gözlenen varyasyonlara katkı yaptığı bilinmektedir [26].

2.4.1. İnsülin Reseptörü – *InR*

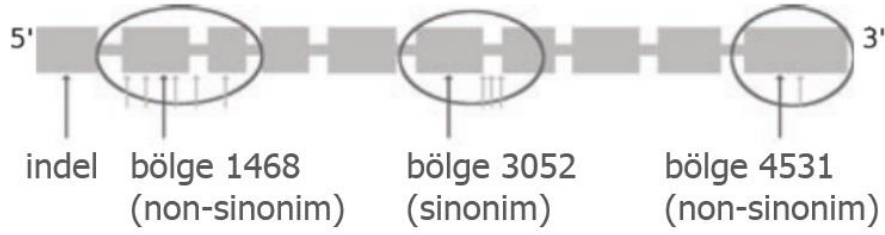
İnsülin sinyal yolağı evrimsel olarak korunmuş bir yolak olması nedeniyle insülin yolağı bileşenleri canlılarda benzerlik göstermektedir. *Drosophila* insülin reseptörü (dINR) memelilerde olduğu gibi tetramer yapıdadır ve alfa₂ ve beta₂ olmak üzere iki ekstrasellüler insülin bağlanma ünitesinden ve ligand ile aktive olan tirozin kinazdan oluşur [97]. *Drosophila*'daki *InR* gen bölgesi, NH₂ ucu ve COOH ucundaki yaklaşık 300 aminoasitin

fazla olması nedeniyle memeli insülin reseptör geninden daha büyüktür [97]. Ayrıca dINR'nin 10 ekzonu, 9 intronu ve dört farklı transkripti bulunmaktadır [98].

Biyokimyasal yollar metabolik, transkripsiyonel düzenleyici ve sinyal iletim yolları olarak üç farklı kategoriye ayrılabilir. Sinyal yolları, hücrenin dışındaki sinyalleri ligand-reseptör etkileşimi ile alır ve bu etkileşim bir dizi biyokimyasal reaksiyonu (genellikle protein fosforilasyonu ve defosforilasyonu yoluyla) tetikler [99]. Sonuç olarak, alınan sinyal cevaba aracılık etmekten sorumlu olan, sinyal yolağının diğer elemanlarını harekete geçirir. *InR* gen bölgesi de insülin sinyal yolağındaki, hücre dışından sinyali alan ilk basamak olmasından dolayı bu sinyal yolağındaki diğer birçok gen ile ilişkili olup, insülin sinyal yolağının düzenlenmesinde etkilidir. *InR* geni ayrıca insülin sinyal yolağının düzenlenmesini sağladığından canlıların çeşitli yaşam öyküsü karakterleriyle ilişkili olduğu bulunmuştur [100].

InR geni mutantlarıyla yapılan çalışmalarda mutant bireylerin gelişimlerinin durakladığı, küçük vücutlu ve kısır bireyler gözlemlendiği, bu negatif etkilere karşı mutant bireylerin ömür uzunluklarında artış olduğu gösterilmiştir [101]. Ayrıca *InR* geninin farklı mutasyon kombinasyonlarıyla yapılan bir başka çalışmada da, mutant dişilerde kısırlığa bağlı olarak 25°C'de yumurta gelişiminin previtellogenik olarak kaldığı ve ömür uzunluğunda %85 oranında artış olduğu belirlenmiştir [81].

Paaby ve arkadaşları [26], *Drosophila*'da *InR* genindeki polimorfizmlerin çeşitli yaşam öyküsü karakterlerini nasıl etkilediğini Kuzey Amerika ve Avustralya populasyonlarıyla kapsamlı olarak çalışmışlardır. Yaptıkları çalışma ile *InR* geninin birinci ekzonunda bir insersiyon-delesyon (indel) polimorfizmi olduğu ve bu indel polimorfizminin glutamin-histidin aminoasit tekrarlarını bozarak farklı aminoasit kombinasyonlarının ortaya çıkmasına neden olduğu bulunmuştur. Buna ek olarak çalışılan *InR* gen bölgesinde toplam 177 SNP olduğu ve bunlardan 12 tanesinin enlemsel bir trend gösterdiği yine bu çalışma ile ortaya konmuştur. Şekil 2.4'te görüldüğü gibi *InR* geninde klinal örüntü gösteren 12 farklı SNP, *InR* geni üzerinde üç farklı küme oluşturacak şekilde bulunmakta ve bu SNP'lerin birbirleri ve 1. ekzondaki indel ile linkaj eşitsizliği göstermediği görülmektedir.



Şekil 2.4. *InR* geninin şematik gösterimi ve *InR* geninde gözlenen SNP'ler. Gri kutular ekzonları, gri kutuların arasında kalan alanlar ise intronları temsil etmektedir.

Ayrıca aynı çalışmada Kuzey Amerika ve Avustralya'da yaygın olarak görülen iki alelin frekansının (alel 248 ve alel 254) enlemle değişkenlik gösterdiği, 248 alelinin yüksek enlemlere doğru gidildikçe frekansının arttığı, 254 alelinin ise düşük enlemlerde daha yaygın olarak görüldüğü ve yüksek enlemlere gidildikçe frekansının düştüğü bulunmuştur. Buna ek olarak, yüksek enlemlerde yüksek frekansta bulunan 248 aleli bakımından homozigot olan sineklerin 254 aleline göre, oksidatif strese ve soğuk stresine daha dayanıklı olduğu, buna karşın 254 aleline sahip dişilerde 248 aleline göre yumurta veriminin daha fazla olduğu gözlenmiştir [26]. Bu sonuçlar, *InR* mutantlarıyla yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. *InR* mutantlarında insülin sinyalinin düşmesine bağlı olarak stres toleransında artış ve yumurta veriminde düşüş gözlenmiştir [81].

248 aleline sahip bireylerin stres koşullarına daha dayanıklı olması, buna karşın yumurta veriminde düşüş olması üreme başarısının pleiotropik maaliyetinden dolayı negatif seçilim gösterme örüntüsüyle uyumaktadır [26]. *InR* genindeki polimorfizmler bakımından paralel klin gösteren Kuzey Amerika ve Avustralya'da yapılan nötralite testinden elde edilen sonuçta bu polimorfizmin doğal olarak iki kıtada da birbirinden bağımsız, fakat benzer seçilim baskılarına yanıt verdiğini ortaya koymaktadır [26].

Paaby ve arkadaşlarının [102] 2014 yılında yaptıkları çalışmayla ise, daha önce buldukları [26] *InR* geni polimorfizmlerinin aradan geçen yaklaşık 5 yıllık zaman diliminde nasıl değiştiğini ve bu polimorfizmlerin mevsimsellik ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmaya göre, yüksek enlemlerde frekansı yüksek olan 248 alelinin (*InR^{short}*) frekansının ilkbaharda yüksekken, sonbaharda düştüğünü, buna ek olarak indel polimorfizmi ile ilişkili veya bu polimorfizmin yakınında bulunan 8 ayrı SNP'in ise yüksek oranda mevsimsellik gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca daha önce yaptıkları çalışmada [26], Kuzey Amerika ve Avustralya kıtasında zayıf bir klinal örüntü gösteren 251 aleli ile ilişkili 2 SNP'in, yüksek mevsimsellik göstermelerine rağmen düşük enlemsellik gösterdikleri ortaya konmuş ve bunun nedeninin mevsimsel ve coğrafi koşulların iklimsel

olarak benzer örüntüler göstermelerine rağmen farklı seçim baskılarına maruz kalmaları sebebiyle olduğu düşünülmektedir [1, 102].

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, *InR* geni çeşitli yaşam öyküsü karakterleriyle ilişkilidir ve bu ilişkinin temelinde insülin sinyal yolağının düzenlemesi yatmaktadır [102]. Bir yaşam öyküsü karakteri olan diyapozun da insülin yolağıyla birlikte düzenlendiği, dolayısıyla *InR* geninin reproduktif diyapozun düzenlenmesindeki aday gen olabileceği öne sürülmektedir [19].

2.4.2. İnsersiyon – Delesyon (İndel) Polimorfizmleri

Son yıllarda yeni sekans tekniklerinin gelişmesiyle, evrimsel adaptasyon çalışmalarında özellikle fenotiplere etki eden genlerin protein kodlayan bölgelerinde meydana gelen nükleotit polimorfizmleri ve genin yapısını değiştiren polimorfizmleri çalışmak, adaptasyonun altında yatan genetik etmenler hakkında fikir vermektedir. Genlerin baz dizilimine nükleotit eklenmesi ile oluşan insersiyon ve gen dizilimindeki nükleotitlerin kaybı ile oluşan delesyonlara (indel) sıkça rastlanılmaktadır. Kreitman [103], *D. melanogaster*'in 5 farklı popülasyonu ile yaptığı çalışmada, alkol dehidrojenaz geninde (*Adh*) toplamda 11 farklı alel bulmuş ve bu farklılıkların temelinde indel polimorfizmlerinin yattığını ortaya çıkarmıştır. Yine bu çalışmada, *Adh* geninde bulunan indellerin boyutlarının 21 baz ile 10.2 kilobaz arasında değiştiğini ve meydana gelen indellerin genin protein kodlayan bölgesinden uzakta olduğu bulunmuştur. Ayrıca, 250 bazdan oluşan insersiyonların transpozlardan meydana geldiğini göstermiştir [104].

İndeller genlerin protein kodlayan bölgelerinde meydana geldiklerinde genin yapısını değiştirerek aminoasit değişimlerine ve dolayısıyla protein değişimlerine neden olabilmektedir. Böyle indeller çoğu zaman protein işlevlerinin bozulmasına bağlı olarak canlıda zararlı etkilere yol açabilir, bu nedenle birçok indel polimorfizmi doğal seleksiyona uğrayarak yok olmaktadır. İnsan genetik hastalıklarıyla ilişkili germline indeller, İnsan Geni Mutasyon Veri Tabanı'ndaki toplam mutasyonların yaklaşık %23.7'sini oluşturmaktadır [105, 106]. Böyle zararlı etkilere neden olan indeller popülasyon içerisindeki polimorfizme çok az katkıda bulunmaktadırlar. Diğer taraftan küçük boyutlu, nötral mutasyonlar olarak oluşan ve genetik sürüklenme ile seçilen indeller türleşmenin oluşmasında etkilidir [105]. İndeller zararlı olabileceği gibi, bazen canlıların uyum başarısını arttırmaktadır. Örneğin, Paaby ve arkadaşlarının [26, 102] *InR* geninin birinci ekzonunda buldukları indel polimorfizmi aminoasit değişikliğine neden olsa bile, doğal

seçilim ile seçilen ve canlının yaşam öyküsü karakterlerinde önemli bir avantaja neden olduğu düşünülen bir polimorfizmdir.

2.5. *Wolbachia* Enfeksiyonu

Bütün diğer canlılar gibi, böceklerin de yerleşik bir mikrobiyoma sahip oldukları ve bu mikroorganizmaların aktiviteleri ile birçok fenotipik karakteri etkiledikleri bilinmektedir. Mikrobiyotanın etkilediği karakterler arasında eş seçimi, termal stres direnci, vücut renklenmesi, besin seçimi ve üreme özellikleri sayılabilir [107].

D. melanogaster'in doğal populasyonlarında sık görülen *Wolbachia* birçok böcek türünü de enfekte eden ve enfeksiyona bağlı çeşitli üreme uyumsuzluklarına sebep olan endosimbiont bir bakteri türüdür [108]. *Drosophila*'da yaygın olan bu bakterinin enfeksiyonu, doğadan toplanan bireylerin önemli bir kısmında bulunur ve müdahale edilmedikçe kuşaktan kuşağa aktarılır [109].

Wolbachia ile yapılan çalışmalar, bu enfeksiyonun *Drosophila*'da birçok yaşam öyküsü karakterini etkileyebildiği yönündedir. *Wolbachia* frekansı birçok popülasyonda ya da kline varyasyon göstermekle birlikte, yapılan çalışmalar *Wolbachia* görülme sıklıkları ile bazı reproduktif karakterler arasında bir korelasyonun varlığına işaret etmektedir. Örneğin, Kriesner ve arkadaşları [110] yaptıkları bir çalışmada *Wolbachia* ile enfekte bireylerin uzun süreli soğuk koşullara maruz kaldıklarında fekundite ve yaşayabilirliklerinin önemli oranda azaldığını ve bu azalmanın *Wolbachia* frekansının Avustralya'nın ılıman bölgelerinde düşük olmasına sebep olduğunu, erkek bireyler tarafından indüklenen sitoplazmik uyumsuzluğun (cytoplasmic incompatibility-CI) ise tropikal bölgelerdeki yüksek *Wolbachia* frekansına katkı sağladığını ortaya koymuştur. Yine aynı çalışmada, non-diyapoz koşullar tekrar oluştuğunda reproduktif diyapoz periyodu sonrası hayatta kalan *D. melanogaster* dişilerinden *Wolbachia* enfeksiyonu taşıyanların enfeksiyon taşımayan dişilere göre toplamda daha az yumurta ürettiği, yavru döl yaşayabilirliğinin azaldığı ve canlı kalabilen yumurta hücresi oranında azalma olduğu belirlenmiştir.

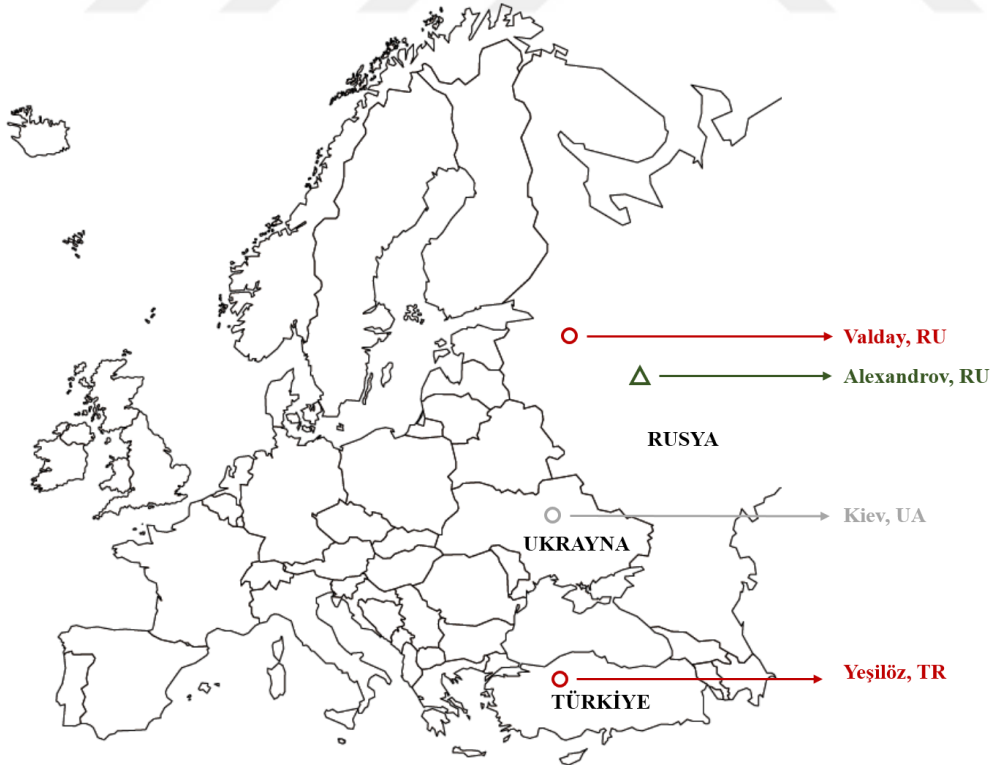
Wolbachia enfeksiyonunun *InR* mutantlarıyla ilişkili olduğu Ikeya ve arkadaşlarının [108] yaptığı çalışma ile ortaya konmuştur. Bu çalışmaya göre *Wolbachia* enfeksiyonunun tetrasiklin antibiyotik tedavisiyle ortadan kaldırılması *InR*'nin dominant bir alellinin fazla ekspresyonuna bağlı olarak *D. melanogaster* bireylerinde yumurta veriminin azalmasına ve dişi ömür uzunluğunun artışına sebep olmaktadır. *Wolbachia* varlığında ise ömür uzunluğunun kısalmasına ve kısırılığa yol açtığı saptanmıştır [108].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Arazi Çalışmaları

3.1.1. Çalışma Alanları

Drosophila melanogaster türünün Türkiye popülasyonlarından deneylerde kullanılacak kendileşmiş soy hatlarını oluşturmak üzere 2014 ve 2015 yıllarında Mayıs ayından Ekim ayına kadar, her ay bir kez olmak üzere, toplam 12 arazi çalışması yapılmıştır. Türkiye popülasyonunun örneklem noktası olarak Ankara'ya yaklaşık 100 km uzaklıktaki Gündül ilçesine bağlı Yeşilöz (40°30'K, 32°34'D) kasabasında bulunan bir meyve bahçesi seçilmiştir. Rusya popülasyonu, Moskova'nın 400 km kuzeybatısında bulunan Valday'den (57°58'K, 33°14'D) 2014 yılının Ekim ayında, Ukrayna popülasyonu ise Kiev'den (50°27'K, 30°31'D) meyve bahçelerinden 2014 yılının Ekim ayında toplanmıştır. Bu örneklem noktalarına ek olarak deneyler sonucunda popülasyonlarda görülecek farklılıkların enlemsel farklılıklardan mı yoksa popülasyonlar arasında oluşan varyasyonlardan mı kaynaklandığını sınavabilmek için Rusya'dan aynı enlemde bulunan ikinci bir popülasyon kullanılmıştır. "Replika popülasyon" olarak adlandırılan ikinci popülasyon, 2014 yılının Ağustos ayında Moskova yakınlarındaki Alexandrov'dan (56°24'K, 38°44'D) toplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kullanılan doğal popülasyonların toplanma noktalarının harita üzerinde gösterimi (RU: Rusya, UA: Ukrayna, TR: Türkiye).

Populasyonların toplandığı bölgelere ait coğrafi ve iklimsel parametreler “www.worldweatheronline.com” sitesinden alınmıştır (Çizelge 3.1). En düşük 40° kuzey enlemi ile en yüksek 57° kuzey enlemi arasında yaklaşık 17°'lik bir enlemsel aralıktan elde edilen toplam dört populasyon toplanmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan bu lokasyonlardan populasyonların toplandığı aylara ait sıcaklık ve nem değerleri Çizelge 3.2’de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Kullanılan doğal populasyonların toplandığı bölgelere ait iklimsel ve coğrafi parametreler [111].

Coğrafi Konum	Enlem (Kuzey)	Boylam (Doğu)	Rakım (m)	Yıl	Yıllık Ort. Sıcaklık (°C)	Yıllık Min. Sıcaklık (°C)	Yıllık Maks. Sıcaklık (°C)	Yıllık Ort. Nem (%)
Yeşilöz, Türkiye	40°30’	32°34’	682	2014	19	14	21	55
				2015	18	14	21	56
Kiev, Ukrayna	50°27’	30°31’	179	2014	8	4	11	80
Alexandrov, Rusya	56°24’	38°44’	190	2014	7	2	10	77
Valday, Rusya	57°58’	33°14’	218	2014	6	2	10	79

Çizelge 3.2. Populasyonların toplandığı yıl ve aya ait sıcaklık ve nem değerleri [111].

Örneklem Yeri	Yıl	Aylar	En Düşük Sıcaklık (°C)	En Yüksek Sıcaklık (°C)	Ortalama Sıcaklık (°C)	Yüzde Nem (%)
Yeşilöz	2014	Haziran	22	29	26	51
		Temmuz	27	34	31	39
		Ağustos	27	34	32	38
		Eylül	21	27	25	46
		Ekim	15	21	19	56
	2015	Mayıs	20	26	24	48
		Haziran	21	28	25	59
		Temmuz	26	34	31	38
		Ağustos	27	34	31	39
		Eylül	25	30	32	38
Kiev	2014	Ekim	7	14	11	63
Alexandrov	2014	Ağustos	14	26	21	50
Valday	2014	Ekim	0	6	3	84

3.1.2 Soyların Toplanması ve Çoğaltılması

Populasyonların örneklenmesi için standart *Drosophila* tuzakları hazırlanmıştır. Bunun için pet şişelere fermente olmuş muz ve maya karışımı konularak besin tuzağı hazırlanmıştır. Besin tuzakları başka böcek ve hayvanların gelmesini engellemek için bir tel yardımı ile

boy hizasında ağaçlara asılmıştır. Öğle saatlerinde bırakılan tuzaklardan, bir kez akşamüstü güneş batmadan ve bir kez de sabah erken saatlerde olmak üzere günde iki kez canlı sinekler toplanmıştır.

Tuzak içerisindeki *Drosophila* bireyleri besiyeri içeren tüplere alınarak Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Genetik laboratuvarına getirilmiştir. Laboratuvarda tür teşhisi yapıldıktan sonra dişi *D. melanogaster* bireyleri her tüpte bir birey olacak şekilde besiyeri içeren tüplere aktarılacak izosoy hatları (isofemale lines - tek dişiden meydana gelen soy hatları) oluşturulmuştur. Oluşturulan bu soy hatları laboratuvarımızda standardize edilmiş olan *Drosophila* besiyeri (Çizelge 3.3) [112] içeren tüplerde 25°C sıcaklık, %55-60 nem ve 12/12 saat (aydınlık/karanlık) fotoperiyodunda iklim dolabında tutulmuştur. Her bir dişiden gelen izosoy hatları 20 kuşak boyunca Bölüm 3.2.1’de ayrıntılı şekilde anlatılan tam kardeş eşleşmesi (full-sibling mating) yapılarak kendileştirilmiştir. Kendileşme sürecini tamamlayan soy hatları deneye alınmıştır.

Çizelge 3.3. Kullanılan standart besiyeri bileşen ve miktarları (Güler ve arkadaşlarından [112] uyarlanarak kullanılmıştır.).

<u>Standart Besiyeri</u>	
Su	1000 ml
Mısır Unu (Karbonhidrat, vitamin, mineral kaynağı)	50 g
Şeker (Karbonhidrat kaynağı)	50 g
Maya (Protein kaynağı)	35 g
Agar (Katılaştırıcı)	10 g
Propiyonik Asit (Koruyucu)	5 ml
Metil Paraben/Ethanol (Koruyucu)	1,4 g/7 ml

Kendileşmesi tamamlanmış soy hatları Çizelge 3.3’te verilen besiyeri ortamında kültüre edilmiştir. Besiyeri hazırlanırken mısır unu, şeker, maya ve agar su ile karıştırılarak pişirilir. Tüplere dökmeden önce antifungal olarak kullanılan metil paraben alkol içerisinde çözündürülerek ve antibakteriyel olarak kullanılan propiyonik asit besiyerine ilave edilir.

D. melanogaster holometabol, tam başkalaşım geçiren bir Dipterdir. Yaşam döngüsü standart koşullar altında (25°C sıcaklık, 12/12 saat aydınlık/karanlık ışık periyodu ve %55-60 nem) 1 gün yumurta, 1 gün birinci larval evre (L1), 1 gün ikinci larval evre (L2), 2 gün üçüncü larval evre (L3) ve 5 gün pupal evre sonrası ergin birey oluşumu ile toplamda 10 günde tamamlanmaktadır. Bu nedenle stok şeklinde saklanan soy hatları 14 günde bir yeni

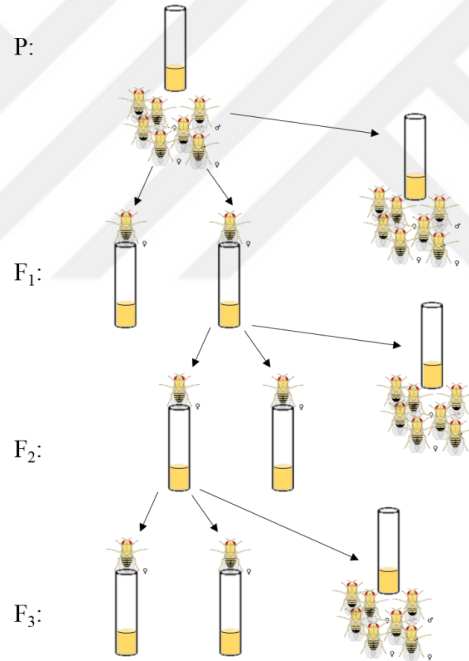
besiyeri ortamına alınmış, ergin bireylerin 3 gün yumurta bırakmaları sağlandıktan sonra besiyeri ortamından uzaklaştırılmışlardır. Böylece kuşakların birbiri ile çakışmaları engellenmiştir.

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1. Kendileşmiş Soy Hatlarının Oluşturulması

Doğadan toplanarak ilk olarak tek dişiden oluşturulan soy (izosoy) hatları tam kardeş eşleşmesi yöntemi ile kendileştirilmiştir. Kendileşmiş soy hatları (inbred lines) kullanılarak tasarlanan çalışmalar *Drosophila*'da sıkça kullanılmaktadır. Bu yöntem ile soyların, taşıdıkları tüm aleller bakımından homozigot olması sağlanmış ve her bir soy hattının o popülasyondaki bir genotipi temsil ettiği kabulü ile deneyler tasarlanmıştır [113].

Kendileşme süreci, Şekil 3.2'de şematize edilmiş olan "Full-sib" kendileşme yöntemi ile Türkiye, Rusya ve Ukrayna'dan toplanan tüm soy hatları için gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Kardeş eşleşmesi ile tek bir dişisi kullanarak bir sonraki kuşağın kurulması prensibine dayanan "Full-sib" kendileşme yönteminin şematik gösterimi [113].

Kendileştirme sürecinde tek dişiden oluşturulan soy hatlarının her birinden, çiftleştiği kabul edilen iki dişisi ayrı ayrı besiyeri içeren tüplere alınmış ve geri kalanlar "mass" (kitle) popülasyon şeklinde ana stok olarak saklanmıştır. Her bir kuşak oluşturulurken ayrı ayrı tüplere alınan iki dişiden üreme olan tüpten tekrar iki dişisi alınarak kuşak devam ettirilmiştir. Eğer iki tüpte de üreme varsa en iyi durumdaki tüpten tekrar, çiftleştiği kabul edilen iki dişisi birey seçilerek ikinci kuşak oluşturulmuştur. Böylece yeni kuşaklar tek bir soy hattını devam ettirmekte ve kendileşme süreci hızlanmaktadır. Her kuşakta alınan

dişilere ek olarak o kuşağa ait “mass” populasyon saklanmış bir önceki kuşağa ait “mass” populasyon iptal edilmiştir. Yeni kurulan kuşakta iki dişinin de yavru döl vermediği durumlarda “mass” olarak saklanan ana stoktan birer dişi alınarak bir önceki soydan kuşak tekrar oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu şekilde en az 20 kuşak gerçekleştirilen kardeş eşleşmesi sonucunda kendileşme katsayısı F’in 1’e yakın olduğu, yani bireylerin tüm aleller için %99 oranında homozigot olduğu kabul edilmiştir [113].

3.3. Reprodüktif Diyapoz Deneyi

Reprodüktif diyapozda, enlemsel ve mevsimsel varyasyonları belirlemek amacıyla, Yeşilöz’den 2014-2015 yıllarında Mayıs-Ekim ayları arasında her ay toplanan ve laboratuvar ortamında 20 kuşak boyunca kendileşmesi sağlanan soylardan her ay için 10 soy hattı (Temmuz 2014 için 6, Eylül 2015 için 9 soy hattı) toplamda 105 kendileşmiş soy hattı, Valday ve Alexandrov’dan 2014 yıllarında sırasıyla Ağustos ve Ekim aylarından toplam 36 kendileşmiş soy hattı ile Kiev’den 2014 yılının Ekim ayından 2 kendileşmiş soy hattı kullanmıştır (Çizelge 3.4). Deney koşullarının doğruluğunu teyit etmek amacıyla, doğadan toplandıktan sonra uzun yıllar boyunca laboratuvar koşullarına uyum sağlamış bir soy olan *Canton-S* soyu dişileri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda, *Canton-S* dişilerinin 10/14 saat (aydınlık/karanlık) fotoperiyodunda ve 12°C’lik diyapoz koşullarında 28 gün sonunda tamamının diyapozda olduğu bilinmektedir [47]. Benzer şekilde bu çalışmada, *Canton-S* dişilerinin diyapoz deneyi için sağlanan aynı deney koşullarında 28 günün sonunda tamamının diyapozda oldukları belirlenmiş ve böylece deney koşullarının doğruluğu test edilmiştir.

Çizelge 3.4. Örneklem yapılan lokasyonlar, örneklem yılları ve deneylere alınan soy sayıları.

Örneklem Yapılan Lokasyon	Örneklem Yılı	Deneylere Alınan Soy Sayısı
Valday	2014	33
Alexandrov	2014	8
Kiev	2014	2
Yeşilöz	2014	46
	2015	59

Çiftleşmiş dişi bireylerde sperm ile uyarılan juvenil hormonu, dişi bireyin ovaryum diyapozuna girmesini engellediğinden ovaryum diyapozu deneyi için çiftleşmemiş (virjin) dişi bireyler kullanılmıştır.

Soy hatları deneye alınmadan önce 50 ml standart besiyeri içeren şişelerde her soy hattı için 4'er replika olacak şekilde çoğaltılmış, bu sayede her soy hattından en fazla sayıda dişi birey elde etmek amaçlanmıştır. Her replika için 20 dişi ve 20 erkek birey 50 ml besiyeri içeren şişelere alınmış ve 2 gün boyunca yumurta bırakmaları sağlanmıştır. Larval yoğunluğun her soy hattı için benzer olmasını sağlamak amacıyla bireyler 2 gün sonunda besiyeri ortamından uzaklaştırılmıştır. Gelişimini tamamlayıp pupadan çıkan erginlerden çiftleşmemiş dişiler toplanmıştır. Bu işlem sırasında ergin bireyler CO₂ ile bayıltılmış ve diseksiyon mikroskobu ile eşey ayrımı gerçekleştirilmiştir. Belirgin eşeyssel dimorfizm gösteren *D. melanogaster*'de erkek bireyler dişilerden daha küçük vücutludur ve ön bacaklarının tarsal segmentinde yan yana dizilmiş ortalama 10 kıldan oluşan eşey tarağı vardır. Eşey tarağı eşey ayrımında kullanılan en güvenilir morfolojik karakterdir. Ayrıca erkeklerin abdomenleri son abdomen segmentleri birleştiği için daha koyu renkte görülmektedir. Bu özellikler kullanılarak eşey ayrımı yapılmış ve toplanan dişi bireyler, her tüpte 10 birey ve her soy hattı için 5'er replika olacak şekilde, toplam 50 dişi standart besiyeri içeren tüplere alınmıştır. Tüm deneyler standart laboratuvar koşullarında gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Reprodüktif Diyapoz İçin Gerekli Çevresel Koşulların Oluşturulması

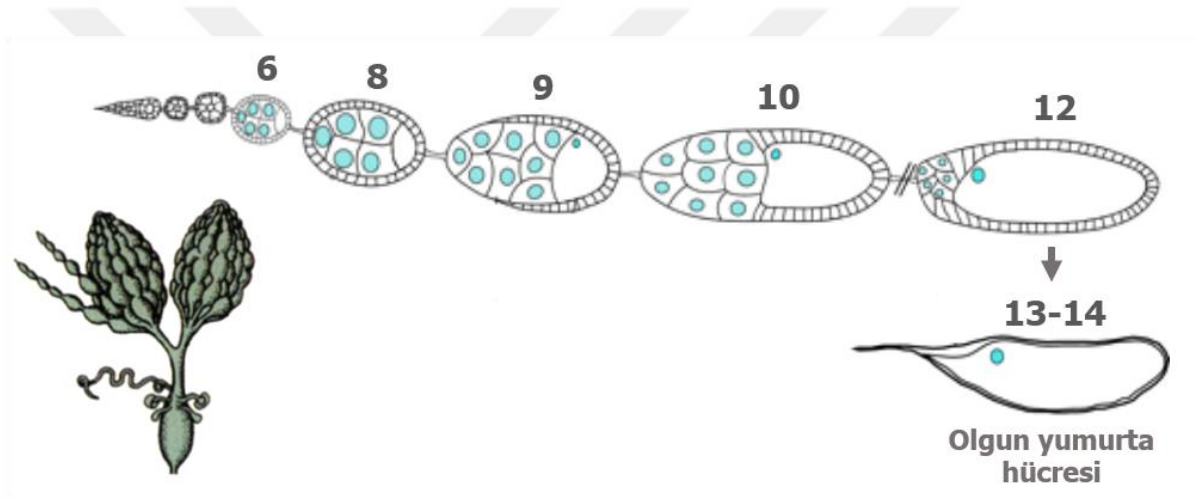
Reprodüktif diyapoz deneyi için çiftleşmeden toplanan dişi bireyler, 11±1°C sıcaklık ve 10/14 saat (aydınlık/karanlık) fotoperiyodu koşullarındaki soğutmalı etüve konulmuştur. Gün uzunluğu için ılıman bölge koşullarındaki ışık periyoduna denklik göstermesi nedeniyle 10/14 saat (aydınlık/karanlık) fotoperiyodu kullanılmıştır [47]. Dişiler 11±1°C'de 28 gün tutulduktan sonra ovaryum diyapozuna girme oranlarının belirlenmesi için ovaryum diseksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Daha önce Yeşilöz, Valday, Aleksandrov ve Kiev soy hatlarından rastgele seçilerek belirlenen soy hatları ile yapılan ön denelemelerde 10/14 saat (aydınlık/karanlık) fotoperiyodunda ve 11±1°C'de 2 hafta (15-18. gün) boyunca tutulan dişiler bu süre sonunda deney ortamından alınarak ovaryum diseksiyonu yapılmış ve ovaryum diseksiyonları yapılan soy hatlarının tümünde dişilerin reprodüktif diyapozda olduğu görülmüştür. Bütün bireylerin 2 haftalık deney sürecinde reprodüktif diyapozda olması nedeniyle herhangi bir varyasyonu ölçmek olanaksız olduğundan ve literatürde yapılan deneylerde dişilerin 6-8 hafta arasında diyapozdan çıktığı gösterildiğinden [47, 71] ideal deney süresi 28 gün olarak belirlenmiştir.

3.3.2. Ovaryum Diseksiyonu

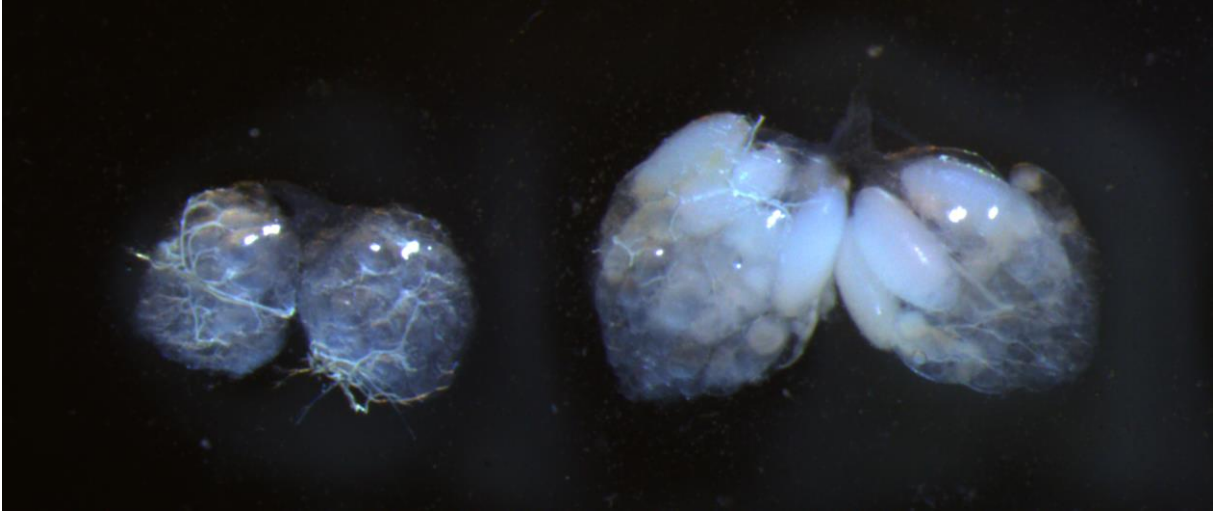
Yirmisekiz günün sonunda 11°C’de tutularak her soy hattı için 5 replika olarak deneye alınan 50 bireyden rastgele seçilen 30 dişinin ovaryumları Fosfat Tamponu içerisinde pens ve sivri uçlu diseksiyon iğnesi kullanılarak Leica marka stereo mikroskopunda disekte edilmiştir.

Disekte edilen ovaryumların gelişimleri King [114]’in önerdiği aşamalara göre değerlendirilmiştir. Bu aşamalar toplam 14 evreden oluşmaktadır (Şekil 3.3) ve ovaryumda folikül hücrelerinde oosit gelişimi en fazla 8. evrede olan dişi bireyler diyapozda kabul edilmektedir [114]. Bu evreden sonra vitellogenez devam eder ve ovaryumlarda yolk proteini birikmeye başlar. 13 ve 14. evrelerde ise ovaryumda olgun yumurta hücresi oluşur [114].



Şekil 3.3. *Drosophila* ovaryumlarındaki folikül hücrelerinde yumurta gelişiminin evreleri [114].

Buna göre, disekte edilen bireylerin %95’inden fazlasında en gelişmiş oosit vitellogenezin başlangıç evresinde (en gelişmiş oosit 8. evre veya öncesi) bulunuyorsa, soy hattı ‘diyapozda (D)’, eğer oositte viteliogeneze başlamış ve bireylerin %95’inde oosit 9-14. evreler arasında ise ‘diyapozda değil (ND)’ şeklinde kabul edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Diapoz fenotipi gösteren (solda) ve göstermeyen (sağda) dişilere ait ovaryum görüntüleri.

3.4. Moleküler Çalışmalar

3.4.1. DNA İzolasyonu

Kendileşen 2014-2015 Türkiye ve 2014 Rusya soylarına ait onar erkek bireyin DNA izolasyonu DNA izolasyon kiti (PureLink Geneomic DNA isolation kit – İnvitrogene) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem ile Yeşilöz'den toplanan ve bu çalışmada kullanılan 2014 yılına ait 46 kendileşmiş soy hattı ve 2015 yılına ait 59 kendileşmiş soy hattı ile 2014 Rusya Valday'den toplanan 33 kendileşmiş soy hattı ve 2014 Rusya Alexandrov'dan toplanan 8 kendileşmiş soy hattının ve Kiev'den 2014 yılında toplanan 2 soy hattının DNA izolasyonları yapılmıştır (Çizelge 3.4).

DNA izolasyonu için ilk olarak %98'lik alkolde, -20°C'de muhafaza edilen erkek bireyler, 180 µl tampon (PureLink Genomic Digestion Buffer) içerisinde ezilerek homojenize edilmiştir. Hücrelerin lizise uğraması için 20 µl Proteinaz K eklenmiş ve enzimin aktif olması için homojenize edilen örnekler bir gece boyunca 55°C sıcaklıktaki etüvde bekletilmiştir. Örneklerin süpernatanı mikropipet yardımı ile yeni steril mikrosantrifüj tüplerine transfer edilmiştir. Daha sonra ortamda bulunan RNA ve protein karakterindeki molekülleri uzaklaştırmak için örneklere 20 µl RNaz A eklenerek vorteks yardımıyla karıştırılmış ve 2 dakika oda ısında bekletilmiştir. Bekletilen örneklere 200 µl liziz/bağlama tamponu (PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer) eklenerek vortekslenmiştir. Daha sonra %96-100'lük etanol eklenip 5 saniye vortekslenerek alkolün iyice karışması sağlanmıştır. Örneklerden DNA pürifikasyonu için, kit içerisinde bulunan spin-kolum tüplerine ~640 µl örnek aktararak 10,000 × G'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj edildikten sonra toplama tüpleri uzaklaştırılmış, spin-kolumlar yeni toplama tüplerine aktarılmış ve 450 µl yıkama tamponu 1 (Wash Buffer 1) eklenerek 10,000 × G'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra toplama tüpleri atılmış ve spin-kolumlar tekrar yeni toplama tüplerine aktarılmıştır. Spin-kolum üzerine 450 µl yıkama tamponu 2 (Wash Buffer 2) eklenerek 3 dakika 14,000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Bu işlemi takiben toplama tüpleri uzaklaştırıldıktan sonra spin-kolumlar 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır ve kolumdan DNA yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 100 µl elüsyon tamponu (PureLink Genomic Elution Buffer) eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve son olarak 14,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA'lar nanospektrofotometre ile gerçekleştirilen ölçümler sonucu DNA konsantrasyonu ve saflığı ölçülmüştür. Tüm DNA konsantrasyonları yüksek ve temiz olduğu için ilave olarak herhangi bir işlem gerçekleştirilmemiştir.

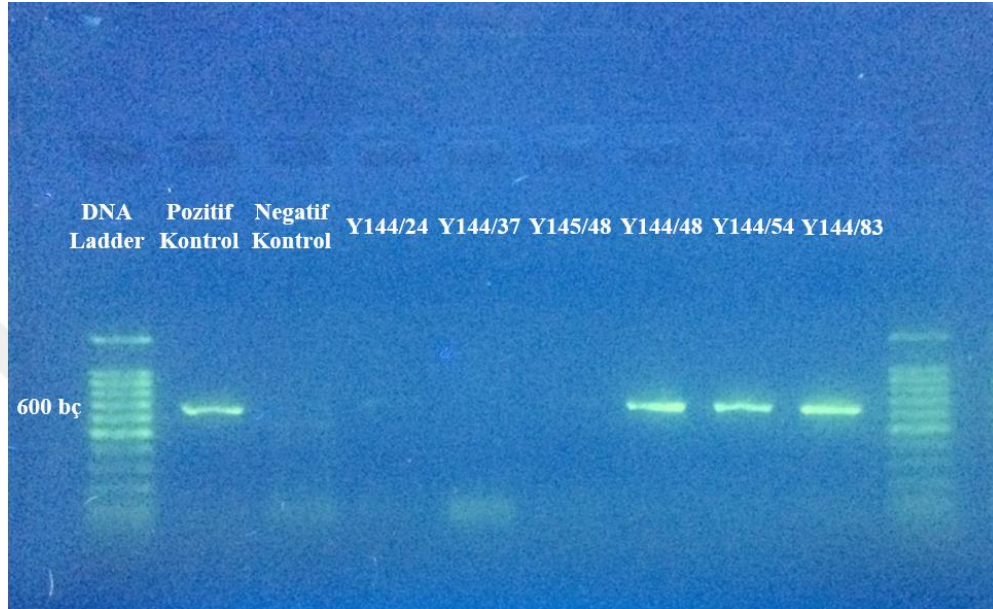
3.4.2. Soylarda Bulunan *Wolbachia* Enfeksiyonlarının Tespiti

Wolbachia, böceklerde yaygın olarak görülen ve enfekte ettiği canlıların yaşam öyküsü karakterlerini etkileyerek uyum başarısını azaltan bir enfeksiyondur. *Wolbachia* enfeksiyonu bireyler arasında hızlıca yayıldığından tüm popülasyonu enfekte edebilmektedir. Bu nedenle soyların *Wolbachia* enfeksiyonunu taşıyıp taşımadığını bilmek önem taşımaktadır.

Wolbachia taraması 2014 Türkiye, Rusya ve Ukrayna soyları için başka bir çalışma kapsamında yapılmıştı. 2015 yılında Yeşilöz'den toplanan 59 soy hattında, *Wolbachia* enfeksiyonunu tanımlamak için *Wolbachia*'ya özgün olan *wsp* (*Wolbachia* surface protein) gen bölgesi kullanılmıştır.

Wolbachia enfeksiyonunu tanımlamak için yaygın olarak kullanılan *wsp* gen bölgesinin amplifiye eden primer dizileri (81f: 5'-TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC-3', ve 691r: 5'-AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA-3') kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR – PCR) amplifikasyonu 20 µl stok çözelti ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre çözelti için 0,5 µl dNTP (2,5mM), 2 µl MgCl₂ (25mM), 0,25 µl Taq Polimeraz, 10x 2 µl tampon, 0,5 µl ileri (5') primer, 0,5 µl geri (3') primer, 13,25 µl distile su ve 1 µl DNA kullanılmıştır. Amplifikasyon yapılan ön denemeler sonucu oluşturulan protokole göre 1 dakika 94°C'de denatürasyonu takiben, 30 saniye 94°C, 30 saniye 60°C ve 1 dakika 72°C olacak şekilde toplam 10 siklus ve 30 saniye 94°C, 30 saniye 53°C ve 1 dakika 72°C toplam 25 siklus, finalde 5 dakika 72°C şeklinde yapılmıştır. Elde edilen 10 µl

amplifikasyon ürünü, 1 µl yükleme boyası ile karıştırılarak, 100 bç DNA markörü ve pozitif kontrol ile %1'lik jele yüklenerek yürütülmüş ve yaklaşık olarak 600 bç'de bant veren örnekler *Wolbachia* enfeksiyonu taşıyan (w+), bant vermeyen örnekler ise *Wolbachia* enfeksiyonu taşımayan (w-) olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.5). Bant vermeyen ve (w-) olarak kaydedilen soy hatlarına ait PZR'ler ikinci kez yapıp negatiflikleri teyit edilmiştir.



Şekil 3.5. *Wolbachia* enfeksiyonunun tespitinde kullanılan *wsp* gen bölgesinin jel görüntüsü.

3.4.3. *InR* Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Sekanslanması

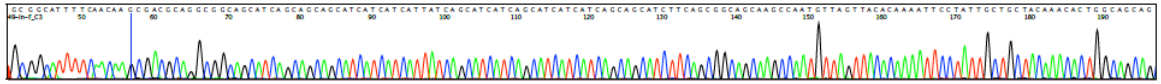
InR gen bölgesindeki indel polimorfizmini ortaya koymak için önerilen [26] ve 1. ekzonu amplifiye eden primer dizileri (f: 5'-CAA TAT CTT TAG CAA CTG TCA C-3', ve r: 5'-TTT AGG GCT TAA ACT CAG TC-3') kullanılmıştır (Şekil 3.6).

InR gen polimorfizmlerini belirlemek amacıyla örneklem yapılan populasyonlardan Yeşilöz'den 2014 yılına ait kendileşmiş 39 soy hattı, 2015 yılına ait kendileşmiş 55 soy hattı, Valday'den 2014 yılına ait kendileşmiş 27 soy hattı, Alexandrov'dan 2014 yılına ait kendileşmiş 8 soy hattı ve Kiev'den 2014 yılına ait kendileşmiş 2 soy hattı kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir.

ttttcagcttgagaactgaaaactaatttgacattctgctttctcgttacagTTGCAAC
GGCGGAACAAATAGAAGAAAAATTGCATTCCAAGTGAAGTGAATATTTGTTGCGCTTTT
CGGCTGCAACAGAGTGTGAGAGCGGGACGAAAGATGATTACCTAGCGGGGTGAGAGAGA
CCCCAAAAGCGAAAGCAGAACTCGTGGAAAGCTGAAAATTTGAGGAAACAAATTCATAAT
ACGAATAGAAACACCGCAATATGTTCAATATGCCACGGGGAGTGACAAAAAGTAAATCCA
AGCGTGGGAAAATTAAGATGGAAAACGATATGGCAGCAGCAGCAACAACACAGCCTGCA
CGCTTGGACACATTTGTGTTTTGTGCCGGCAAGAAATGTTGCTGGATACATGTTGCTGCC
GGCAAGCAGTAGAAGCAGTTGACAGCCCCGCAAGCAGTGAAGAAGCGTATAGCAGTAGCA
ACAGCAGCAGCTGTCAAGCAAGCAGTGAAATCAGTGCGGAGGAGGTCTGGTTTCTCAGTC
ATGATGATATCGTACTGTGCCGACAGCCAAAATTTGACGAAGTGGAGACGACGGGTAAAA
AGAGGGACGTTAAATGCAGCGGGCATCAGTGCAGCAATGAATGCGACGATGGCAGCAGCA
AAAACAATCGACAACAGCGCGAAAACCTTCAATATCTTTAGCAACTGTCACAATATTTTGC
GAACATTGCAATCGCTGCTGCTGCTCATGTTCAATTGCGGCATTTTCAACAAGCGACGCA
GGCGGCAGCATCAGCAGCAGCATCATCATATTATCAGCATCATCATCAGCAGCATCATC
AGCAGCATCATCAGCGGCAGCAAGCCAATGTTAGTTACACAAAATTCCTATTGCTGCTAC
AAACTGCGCAGCAGCAACCACAAACTGAGTTTAAGCCCTAAAAACTACAAAACAACAC
AACAACTACAGCATAACCAACAGCTGCCACGTGCCACACCGCAACAAAAGCAACAAGAGA
AAGATAGGCATAAGTGCTTTTCACTACAAGCACAATTACTCTTACTCGCCTGGCATTAGCC
TTCTACTCTTTATCTACTGGCCAACACATTGGCCATCCAAGCGGTCTGTTGCCAGCAC
ATCAGCAGCACCTGCTGCACAATGATATAGCCGATGGACTGGATAAAAACAGCGCTTTCGG
TGTCGGGGACGCAATCGCGATGGACAAGGAGCGAATCAAACCAACAATGCGACTGTCA
AAAATGTAAAACgtatgtattacattatgatctaccttgcaagttaaaggaacattcccat
ttgcacgagactgacagataactaataagctttttccattaacaccttatagCTTGCAAATCC
ATGGACATCAGGAACATGGTGTGCACTTCAATCAGCTGGAGAACTGCACGGTCATCGAG
GGCTTCCTGCTGATCGATTTGATAAACGACGCCAGCCCTCTGAACAGAAGCTTTCCAAAA
CTGACCGAGGTCACAGATTATATCATAATCTACCGTGTGACTGGATTGCACTCGCTGTCA
AAGATCTTTCCCAATCTGAGCGTCATTAGGGGAAACAAGCTGTTGACGGATATGCCTTG
GTCGCTACTCTGAATTCGACCTCATGGATTGCGGACTTCAAGCTACGATCCATAACC
AGAGGCGGTGTGCGGATTGAGAAGAATCATAAGCTGTGCTATGATAGGACCATCGATTGG
CTGGAAATCTGGCGGAAAACGAAACCAACTGGTGGTGTGACAGAGAACGGCAAGGAG
AAGGAGTGCAGGCTTTCCAAGTGCCCGGGGGAGATCAGAATTGAGGAGGGGCAGGATACC
ACGGCTATTGAGGGAGAGCTTAATGCCAGTTGTGAGCTGCACAATAATAGGCGCTGTGC
TGGAAACAGCAAACTCTGCCAGACGAgtaggttgccggtgtaaagttataacggttttctt
attaacatttttcgcttttttttcttct

Şekil 3.6. *D. melanogaster* 3. kromozomun sağ kolunda bulunan *InR* gen bölgesinin bir kısmının görünümü ve 1.ekzon indel polimorfimini belirlemek için kullanılan primerlerin gösterimi.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR – PCR) amplifikasyonu 50 µl stok çözelti ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre çözelti için 2 µl dNTP (2,5mM), 2 µl MgCl₂ (25mM), 0,25 µl Taq Polimeraz, 10X 5 µl tampon, 1 µl ileri (5') primer, 1 µl geri (3') primer, 34,75 µl distile su ve 2 µl DNA kullanılmıştır. Amplifikasyon yapılan ön denemeler sonucu oluşturulan protokole göre 2 dakika 94°C denatürasyonu takiben, 30 saniye 94°C, 30 saniye 51.1°C ve 1 dakika 72°C toplam 30 siklus annealing-birleşme ve finalde 10 dakika 72°C şeklinde yapılmıştır. Elde edilen 6 µl amplifikasyon ürünü 0,8 µl yükleme boyası ile karıştırılarak 100 bç DNA markörü ile %1,5'lik jele yüklenip yürütülerek yaklaşık olarak 300 bç'de parlak bant veren örneklerin amplifikasyonlarının başarılı olduğu kabul edilip sekans için hazırlanmıştır. Hizmet alımı olarak gerçekleştirilen sekanslar Mega7 programı kullanılarak hizalanmıştır. Yine aynı program ile amino asit dizileri analiz edilmiş ve her soy hattının kullandığı indel polimorfizmleri belirlenmiştir.



Şekil 3.7. Sanger sekansı sonrası elde edilen InR geni dizilerinden birinin kromatogram görüntüsü.

3.5. İstatistiksel Analizler

Diyapoz deneyinde üç farklı lokasyondan toplanan toplam 143 soy hatından deneye alınan toplam 4290 dişinin ovaryum diseksiyonları gerçekleştirilerek, her bir bireyin gösterdiği diyapoz fenotipi diyapoz gösteren (D) ve diyapoz göstermeyen (ND) olarak iki şekilde kaydedilmiş ve her soy hattında gözlenen ortalama diyapoz frekansları belirlenmiştir.

Diyapoz deneyine alınan her soy hattının diyapoz frekanslarının aritmetik ortalamaları, ortalamaların standart hataları SPSS 23 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Deneye alınan tüm populasyonların gösterdikleri diyapoz fenotipleri nitel veriler (diyapoz gösteren (D) ve göstermeyen (ND) şeklinde elde edildiğinden, soyların diyapoz fenotipi ile lokasyon, aylar, iklimsel parametreler, *InR* alelleri, *Wolbachia* enfeksiyonu gibi değişkenler arasındaki farkların belirlenmesi için “Ki-Kare Testi” kullanılmıştır.

Tüm populasyonlardaki soy hatlarının diyapoz frekansları ile farklı değişkenlerin anlamlılığı test etmek amacıyla varyans analizi (ANOVA) kullanılmış ve uygun *post hoc* testleri ile karşılaştırılmıştır.

Sekanslar Clustal W ile hizalanmıştır. *InR* alel frekansları ile lokasyon ve aydan aya değişim örüntüleri arasındaki farkların belirlenmesi için Ki-Kare Testi kullanılmıştır. Ayrıca *InR* gen bölgesinin adaptif bir protein evrimi geçirip geçirmediği McDonald-Kreitman test [115] ile analiz edilmiş ve bu gen bölgesi üzerindeki seçilim baskılarını belirlemek amacıyla ortalama nükleotit çeşitliliği (π), ayrışma bölgelerinin sayısı (S), Watterson nükleotit çeşitliliği (θ), haplotip sayısı (nHap) ve çeşitliliği (H_d) ile nötralite testi için Tajima D değeri DnaSP 5.10 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Diyapoz frekansı, *InR* alel frekansı ve *Wolbachia* enfeksiyonunun iklimsel parametreler ile karşılaştırılması için *Pearson korelasyon* katsayıları hesaplanmış ve bu değişkenler arası karşılaştırmalar yapılmıştır.

Alél frekansı - Enlem ve Diyapoz Frekansı – Enlem grafikleri Microsof Excel 2013 programı kullanılarak oluşturulmuştur.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1. *InR* Gen Polimorfizmi ve Coğrafi Örüntüler

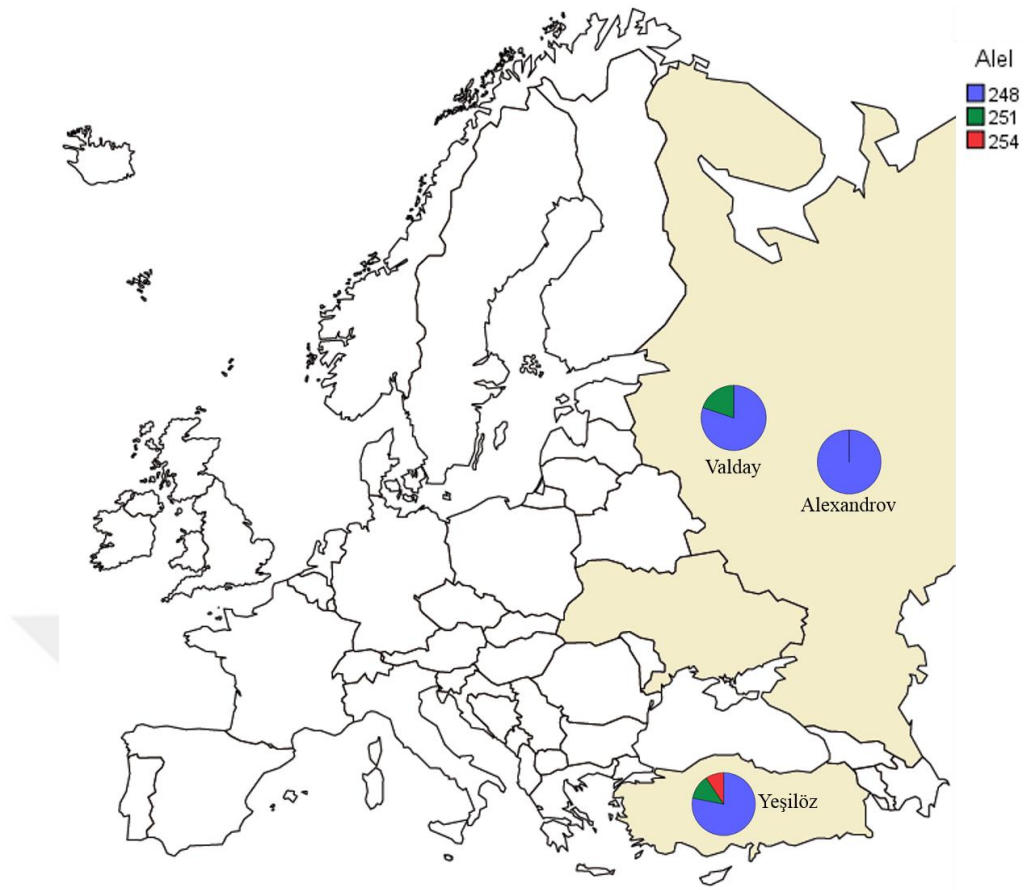
Elde edilen sekans verileri 1. ekzonda bulunan amino asit insersiyon-delesyon (indel) polimorfizimleri göstermiştir. İndel polimorfizmi glutamin ve histidin tekrarlarını bozmaktadır ve Şekil 4.1’de gösterilen altı farklı alelden üç tanesi Türkiye ve Rusya popülasyonlarında gözlenmiştir. Bunlar, (en yaygın olarak) 248, 251 ve 254 alelleridir (Çizelge 4.1) (Ek-1).

RRRRQHQQQHHH-YQH-----HHQQHLQRQQANVSYT-KK	236
RRRRQHQQQHHH-YQH-----HQHHHQHLQRQQANVSYT-KF	245
RRRRQHQQQHHHHYQHH-----QHHHQHHQRQQANVSYT-KF	248
RRRRQHQQQHHHHYQHH-----QQHHQQHHQRQQANVSYT-KF	251
RRRRQHQQQHHH-YQHHQH---HQHHHQHLQRQQANVSYT-KF	254
RRRRQHQQQHHH-YQHHQHHQHHQHHHQHLQRQQANVSYT-KF	263

Şekil 4.1. *D. melanogaster*’de görülen *InR* geninin amino asit dizilerinde görülen indel polimorfizimleri. Yaygın olarak bulunan alellerden bu çalışmada görülenler koyu renk, başka çalışmalarda tespit edilenler açık renk ile gösterilmiştir.

Türkiye ve Rusya popülasyonlarında amino asit dizilerinde gözlenen indel polimorfizm frekansları incelenmiştir. Rusya ve Türkiye’de en sık rastlanan 248 aleli %79 oranında görülmektedir. Bunu %15 ile 251 aleli ve %6 ile 254 aleli izlemektedir. Tüm lokasyonlarda 248 alelinin benzer frekansta görülmektedir. Bu alelin dağılımı için önceki çalışmalarda önerilene benzer [26, 102], yani yüksek enlemlere çıkıldıkça artan bir frekans örüntüsü gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra 254 aleli Türkiye’de literatüre benzer şekilde daha yaygın görülmüştür (Şekil 4.2).

Paaby ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [26], 248 aleli yüksek enlemlerde fazla bulunurken, bu aleli taşıyan bireylerin soğuk ve oksidatif strese karşı daha dirençli oldukları bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan popülasyonların yüksek (40°-57°) enlemlerde bulunmaları 248 alelinin daha yaygın görülmesini açıklayabilir.



Şekil 4.2. Lokasyonlara bağlı alel frekansları dağılımının harita üzerinde gösterimi.

InR alel frekanslarının örneklem yapılan lokasyonlara bağlı değişim örüntülerinin istatistiksel olarak anlamlılığı “ki-kare testi” ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda alel frekanslarının lokasyonlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir varyasyon göstermemiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Lokasyonlara ait *InR* alel frekansları ve ki kare analizi sonucu (sd: Serbestlik Derecesi).

<i>InR</i> Alel	Lokasyon				sd	Ki Kare	p
	Valday	Alexandrov	Yeşilöz	Σ			
248	21 (0.78)	8 (1.0)	73 (0.78)	102 (0.79)	4	2.919	0.572
251	5 (0.18)	0	14 (0.15)	19 (0.15)			
254	1 (0.04)	0	7 (0.07)	8 (0.06)			
Σ	27	8	94	129			

InR alel frekanslarının aydan aya değişim örüntüleri “ki-kare testi” ile analiz edilmiştir. Aylara göre alel frekanslarındaki değişimi incelemek için sadece Yeşilöz popülasyonu kullanılmıştır. 248 aleli Haziran ve Ekim ayları arasında %78 – 86 arasında gözlenmiştir. Analiz sonucunda alel frekanslarının aydan aya istatistiksel olarak anlamlı bir varyasyon göstermediği saptanmıştır (Çizelge 4.2). Veriler erken yaz (Mayıs-Haziran), yaz (Temmuz-Ağustos) ve sonbahar (Eylül-Ekim) olarak ayrıldığında yine gözlenen alel frekansları bakımından farklılık göstermediği bulunmuştur. *InR* alel frekansının 2014 ve 2015 arasında da anlamlı bir şekilde değişmediği görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar farklı aylarda ve yıllarda toplanan soy hatlarının sahip oldukları *InR* genotipi açısından benzer olduklarını ve popülasyonun *InR* alel frekansının değişmediği göstermektedir.

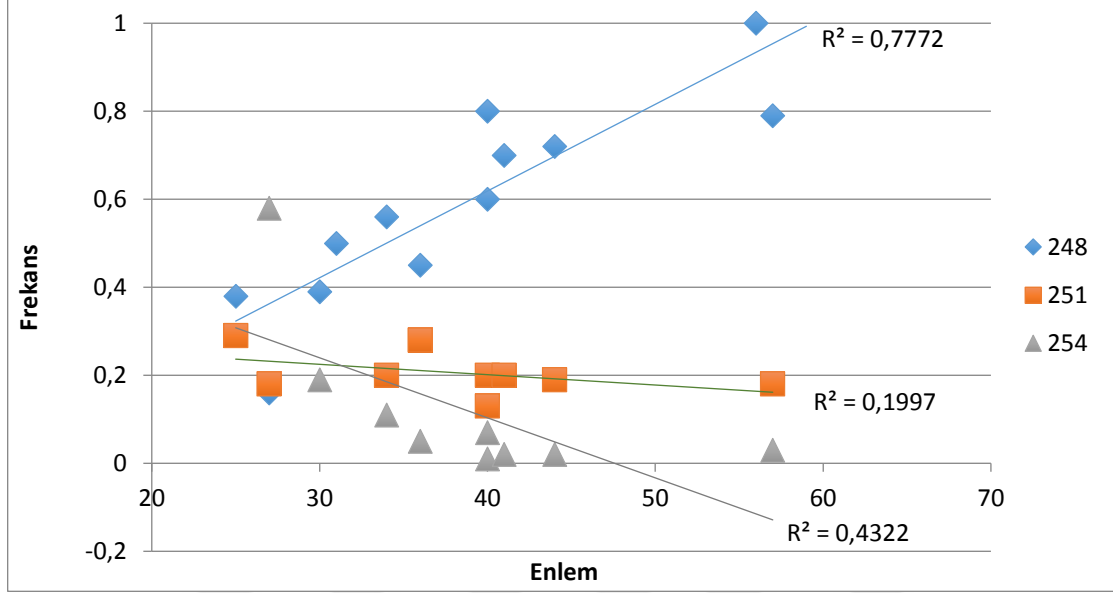
Çizelge 4.2. *InR* alellerinin aydan aya değişimlerini gösteren ki kare analizi (sd: Serbestlik Derecesi).

<i>InR</i> Alel	Aylar						Σ	sd	Ki Kare	p
	May	Haz	Tem	Ağu	Eyl	Eki				
248	6 (0.60)	14 (0.78)	12 (0.86)	15 (0.79)	16 (0.80)	11 (0.79)	74	10	5.974	0.817
251	2 (0.20)	3 (0.17)	1 (0.07)	4 (0.21)	2 (0.10)	2 (0.14)	14			
254	2 (0.20)	1 (0.05)	1 (0.07)	0	2 (0.10)	1 (0.07)	7			
Σ	10	18	14	19	20	14	95			

Paaby ve arkadaşları [102], *InR* geni alel frekanslarının mevsimsel olarak değiştiğini, 248 alelinin frekansının ilkbaharda yüksekken, sonbaharda düştüğünü, buna ek olarak indel polimorfizmi ile ilişkili veya bu polimorfizmin yakınında bulunan 8 ayrı SNP’in ise yüksek oranda mevsimsellik gösterdiğini bulmuşlardır. Literatürdeki bilginin tersine bu çalışmada bu alel frekansları bakımından aydan aya veya yıllar arasında bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuçlar farklı popülasyonların farklı seçim baskıları altında olmasıyla ilişkili olabilir.

InR gen bölgesinde bulunan ve coğrafi örüntü gösterdiği hem Avustralya hem de Kuzey Amerika popülasyonlarında ortaya konulan indel polimorfizminin iki kıtada paralel klin göstermesine rağmen görece geniş bir enlemsel aralığı (40° - 57° kuzey enlemleri) tarayan bu çalışmamızda bulunmamış olması şaşırtıcı olmuştur. Bu noktadan yola çıkarak elimizdeki enlemsel gradiyenti Kuzey Amerika’da yapılan çalışmalardan alınan lokasyon/alel frekansları ile genişlettik. Şekil 4.3’te görüldüğü üzere 45° enleme kadar dağılım gösteren mevcut verilere Türkiye ve Rusya verileri eklendiğinde enleme bağlı

ilişkinin korunduğu görülmektedir. Burada 248 aleli 25°'den başlayarak 57° Valday'e kadar artmaktadır ve enleme bağlı bu liner artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($R^2=0.77$, $p<0,001$). Diğer taraftan 254 alelinin düşük enlemlerde yüksek frekansa sahip olduğu ve bu ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($R^2=0.43$, $p<0,05$) görülmektedir.



Şekil 4.3. Kuzey Amerika verileri ile birleştirilerek Türkiye ve Rusya'da gözlenen *InR* indel polimorfizminin üç alelinin frekanslarının gösterimi.

İndel polimorfizmleri açısından populasyonlarda gözlenen bu güçlü klinal örüntü, fonksiyonel polimorfizm bakımından bu varyasyonları güçlü bir aday konumuna getirmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda *InR* geni alellerinin çeşitli yaşam öykü karakterleri ile ilişkili olduğu ve insülin sinyal yolağının diyapozu düzenleyen bir yolak olması nedeniyle bu genin diyapozla ilişkili aday gen olabileceği ileri sürülmüştür [19, 102]. Bu çalışmada tüm populasyonlar kullanılarak soy hatlarının diyapoz frekansları ile sahip oldukları aleller arasındaki ilişkinin anlamlılığı test etmek için varyans analizi (ANOVA) yapıldığında *InR* alelleri ile diyapoz arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Fakat alellere göre diyapoz frekansı ortalamalarına bakıldığında en yüksek diyapoz frekansın 254 alellinde olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Populasyonlara ait soy hatlarının sayısı (N), alellere göre diyapoz frekansı (DF) ortalamaları, ortalamaların standart sapma (S.S.) değerleri.

<i>InR</i> Alel	N	Ortalama DF	S. S.
248	102	0,2876	0,3210
251	19	0,2878	0,3279
254	8	0,3625	0,3822
Σ	129	0,2923	0,3237

Literatüre göre 254 aleli düşük enlemlerde ve sıcak bölgelerde yüksek frekansta gözlenmekte ve bu alele sahip bireylerin yumurta verimlerinin yüksek olduğu bilinmektedir [26]. Bu alelin yumurta verimi gibi üremeyi arttırıcı bir karakterle ilişkili olmasına rağmen, yumurta gelişiminin duraklamasına neden olan yüksek diyapoz frekansı ile ilişkili çıkması karışıklık yaratmaktadır. En yüksek diyapoz frekansının bu alelde olması, 254 alelinin deneye alınan populasyonlarda çok az sayıda soy hattında bulunması ile ilişkili olabilir. Bu çalışmada kullanılan populasyonlara ek olarak bu populasyonlarla aynı boylam üzerinde daha düşük enlemlerden, Türkiye'nin güneyinden ve Zambiya gibi bir Afrika ülkesinden yapılacak örneklemeler ile bu çalışmanın genişletilmesi, bu *InR* alellerinin klinal örüntülerini ve bu alellerin diyapoz ile ilişkisini ortaya çıkarmak açısından önemli olabilir. Yapılan bu çalışmada diyapoz ile *InR* alelleri ile ilişki bulunamamıştır fakat, bu genin alellerinin farklı yaşam öyküsü karakterleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir [26, 102]. Bu aleller stres direnci, yumurta verimi, trigliserol oranı veya vücut büyüklüğü gibi farklı yaşam öyküsü karakterleriyle ilişkili olabilir.

Ayrıca deneylerde kullanılan populasyonların yüksek enlemlerde bulunması nedeniyle 248 alelinin daha yaygın olarak görülmesi ve tüm populasyonlarda yüksek oranda ND fenotipinde bireylerin olması, bu bireylerin yüksek enlemlerde bulunmasına bağlı olarak soğuk dirençlerinin fazla olması nedeniyle diyapozdan erken çıkmaları ile ilişkili olabilir. Çünkü yüksek enlemlerde iklimsel koşulların uygun olduğu zaman dilimi çok dardır ve bu canlıların kuşaklanması için çok kısa bir zamanı vardır.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar uzun zaman boyunca laboratuvar koşullarına uyum sağlamış doğal populasyonlarla yapılmıştır ve bu nedenle bu populasyonların doğal ortamlardaki diyapoz davranışları tam olarak bilinmemektedir. Doğadan toplanan ve laboratuvar adaptasyonu kazanmamış populasyonlar ile yapılacak çalışmalar lokal iklimsel değişkenlerin diyapoz fenotipi üzerindeki etkisi hakkında daha farklı bilgiler verebilir.

Nötralite ve seleksiyon testi:

McDonald-Kreitman [115] analizi ile *InR* gen bölgesinin adaptif bir protein evrimi geçirip geçirmediğini *D. melanogaster* ile ortak ataya sahip, 2 milyon yıl önce ayrılmış olan *D. simulans* kullanılarak incelenmiştir. Test için sadece indel polimorfizmin olduğu bölge değil sekanslanan 288 bç'ne sahip bölgenin tamamı kullanılmıştır. İki türün bu gen bölgesi bakımından ayrılmasını gösteren analiz sonucu Çizelge 4.4'te verilmektedir.

Çizelge 4.4. *InR* gen bölgesi için McDonald-Kreitman ayrılma testi sonucu. (S: sinonim, NS: non-sinonim.)

Polimorfizm			
<i>InR</i>	S	NS	p^1
	2	8	0.454

¹ p değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır.

InR 1. ekzonun tamamını kapsayan bölge için yapılan ayrılma testi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Literatürde Kuzey Amerika ve Avustralya populasyonlarında *InR* geninin tamamını kapsayan ayrılma testinde ortalama 88 sinonim, 15 non-sinonim polimorfizm tespit edilmiş ve *D. simulans* ile anlamlı şekilde ayrıştığı bulunmuştur [26]. Bu çalışmada bu oranın düşük olmasının temelde iki sebebi olabilir. Paaby ve arkadaşları [26] yaptıkları çalışmada populasyonları, enlemsel klin gösteren ve yaşam öyküsü karakterlerini etkileyen 3. kromozomda bulunan *In(3R)Payne* inversiyonu taşıyıp taşımadığına göre ayırmışlardır. Analiz, standart (*Payne* inversiyonu taşımayan) ve inversiyonu taşıyan kromozomlarla yapıldığında bu gen bölgesi için ayrılmanın sadece inversiyon taşıyan populasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bulunmuştur. *Payne* inversiyonu içermeyen populasyonlarda bu gen bölgesi için ayrılma istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. *In(3R)P* inversiyonu ise enlem arttıkça frekansı azalan bir inversiyondur [116, 117, 118]. Literatürde bu inversiyon için çalışılan coğrafi gradientlerin çalışmamızın olduğu enlemlerden düşük olduğu göz önünde bulundurulursa, çalıştığımız populasyonlarda bu inversiyon frekansının düşük olma olasılığı vardır. Bu durum, bu gen bölgesi için ayrılmanın istatistiksel olarak neden anlamlı olmadığını” açıklayabilir. Çalışmamızda kullanılan populasyonlarda yapılacak ileriki çalışmalar ile bu inversiyona ait frekansların belirlenmesi bu soruya daha kesin cevap verebilir. İkinci neden ise kullanılan gen bölgesinin oldukça küçük olması olabilir.

InR gen bölgesi üzerindeki pozitif seleksiyonu test etmek amacıyla bir populasyon genetiği analizi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.5'te görüleceği üzere nükleotit çeşitliliği en yüksek Yeşilöz populasyonunda bulunmuştur. Tajima's D değeri her üç populasyon için negatif

bulunmuştur, ancak sadece Yeşilöz popülasyonunda anlamlıdır (Çizelge 4.5). Negatif bir Tajima D değeri negatif seçilimden kaynaklanabilen nadir varyantların fazla olduğunu gösterebildiği gibi, popülasyonun bu gen bölgesi için uzun süreli pozitif veya negatif seçilime uğradığının bir sonucu da olabilir. Bununla birlikte, popülasyon genişlemesi, uzun süreli popülasyon darboğazı gibi demografik faktörlerde benzer bir sonuç oluşturabilir. Bu çalışmada Yeşilöz popülasyonunda negatif Tajima D değeri ile birlikte, diğer popülasyonlara oranla nükleotit (π) ve haplotip çeşitliliğinin (Hd) düşük olması, bu popülasyonun bu gen bölgesi bakımından seçici süpürme (selective sweep) gibi popülasyondaki genetik çeşitliliği azaltan seçilimsel etkilere maruz kaldığını veya bu popülasyonun yakın zaman içerisinde popülasyon büyüklüğünü arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Paaby ve arkadaşlarının [26] yaptığı çalışmada, yapılan nötralite testlerinde, *InR* gen bölgesi bakımından Tajima D değerinin negatif olduğu ve nükleotit çeşitliliğininde *D. melanogaster*'de bu gen bölgesi için kabul edilen değerler ($\pi=0.0049$) içerisinde olduğu bulunmuştur. Ayrıca negatif Tajima D değerinin bu gen bölgesinin enlemle ters korelasyon göstermesi ve dengelenmiş seçilim altında olması nedeniyle ve bu gen bölgesindeki indel polimorfizmiyle linkaj gösteren başka polimorfizmlerin etkisiyle olduğu önerilmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada bulunan negatif Tajima D değerleri, Paaby ve arkadaşlarının [26] önerdiği benzer etkiler nedeniyle bulunmuş olabilir.

Çizelge 4.5. *InR* gen bölgesinin istatistiksel özeti.

Popülasyon	n	S	θ	π	TajD	nHap	Hd.
Valday	32	11	0.011	0.009	- 0.58	12	0.845
Alexandrov	9	3	0.004	0.003	- 0.94	3	0.556
Yeşilöz	95	18	0.016	0.003	- 2.48*	12	0.473

n,sekans sayısı; S, ayrılma bölgeleri sayısı; θ , Watterson'ın [119] nükleotit çeşitliliği değeri; π , ortalama nükleotit çeşitliliği [120]; TajD, Tajima D değeri [120]; nHap, haplotip sayısı; Hd, haplotip çeşitliliği. *p < 0.01

4.2. Diyapoz Fenotipi

4.2.1. Enleme Bağlı Diyapoz Frekansları

InR polimorfizminin diyapoza etkisini araştırmak ve diyapoz fenotipinin enlem ile ilişkisini sorgulamak üzere yine Yeşilöz, Ukrayna, Valday ve Alexsandov'dan elde edilen popülasyonlara ait kendileşmiş soy hatları kullanılmıştır.

Rusya'dan Valday ve Alexandrov olmak üzere iki lokaliteden toplam 36 soy hattı, Ukrayna Kiev'den 2 soy hattı ve Türkiye'de Yeşilöz'den toplanan 105 soy hattı deneye alınmıştır. Soğuk ve kısa gün koşullarında deneye alınan dişilerin 28. günde ovaryum

diseksiyonları yapılmıştır. Dişiler diyapoz gösteren (D), ve diyapoz göstermeyen (ND) olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.4).

Farklı enlemlerden toplanan soy hatlarının diyapoz frekanslarının ortalamaları Çizelge 4.6'da verilmektedir. Diyapoz frekansı Kiev hariç, en yüksek Alexandrov populasyonunda gözlenirken en düşük Valday'de gözlenmektedir. Ortalamalar arası farkın anlamlılığını test etmek için yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçlarına göre ise populasyonlar arasında sadece Kiev - Yeşilöz ($p=0.038$) ve Kiev – Valday ($p=0.036$) ile anlamlı fark göstermiştir. Ancak, Kiev populasyonu sadece 2 soy hattı ile temsil edildiğinden bu sonucu dikkate almak yanıltıcı olabilir. Bu nedenle populasyonlarda gözlenen diyapoz frekansının enlemsel olarak bir varyasyon göstermediği söylenebilir.

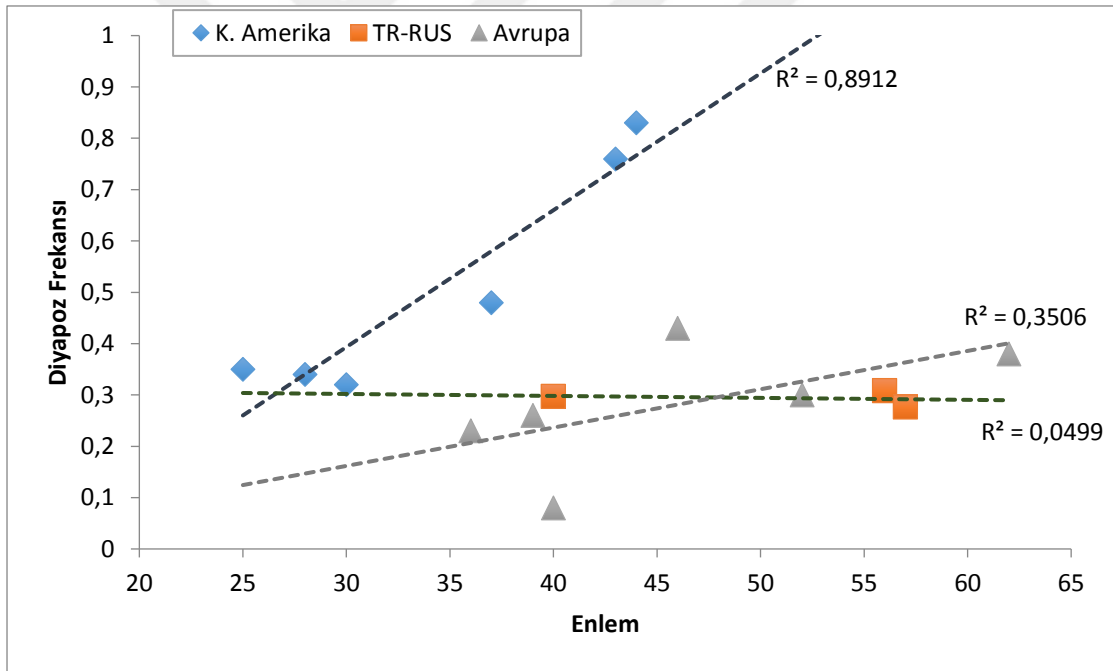
Çizelge 4.6. Populasyonlara ait soy hatlarının sayısı (N), diyapoz gösteren soyların frekans ortalamaları (DF), ortalamaların standart sapma (S.S) değerleri.

Lokasyon	N	Ortalama DF	S.S.
Valday	28	0,2762	0,3634
Alexandrov	8	0,3084	0,3499
Kiev	2	0,9500	0,0707
Yeşilöz	105	0,2972	0,3206
Σ	143	0,3028	0,3354

Yirmisekiz gün boyunca 11°C sıcaklık, 10 saat aydınlık - 14 saat karanlık koşulunda tutularak reproduktif diyapoza girmesi sağlanan dişiler, bu sürenin sonunda disekte edilmiştir. Diseksiyon sonucu bazı bireylerin ovaryumlarında yumurta gelişimi saptanmıştır. Literatür, özellikle populasyonlar arasında diyapoz frekansı bakımından varyasyonları tespit etmek için sıcaklık ve ışık kadar, sürenin de önemine vurgu yapmaktadır. Bu koşullarda sürenin kısa tutulması tüm bireylerin diyapozda olduğu bir zamana, daha uzun bir sürede tutulması ise tüm bireylerin diyapozdan çıktığı bir zamana denk gelebilmektedir [49]. Bu nedenle eğer populasyonlar arasında diyapoz frekansı bakımından bir varyasyon gözlenmek isteniyorsa diyapoz indükleyici koşullarda 28 günlük süre metodolojik olarak uygun bir süre olarak kabul görmektedir. Populasyonlar Çizelge 4.6'da görüleceği üzere bir varyasyon göstermişlerdir. Ki-kare testi ile Kiev hariç olmak üzere populasyonların diyapoz frekansı ile enlem arasındaki ilişki $p=0.48$ değerinde anlamlı bulunmuştur. Ancak, değer marjinalde olduğu için bu sonuç arttırılacak örneklem sayısı veya tekrarı ile tekrar değerlendirilmelidir.

Kuzey Amerika 25° - 44° enlemleri arasında 6 lokaliteden toplanan populasyonlarda diyapoz klini önceki çalışmalarda bulunmuştur [15]. Pegoraro ve arkadaşları [49], İspanya,

36° ve Finlandiya, 62° boyunca farklı enlemlerden toplanan 6 popülasyona ait diyapoz frekansını belirlemiştir. Literatürde mevcut olan bu verilerin kendi verilerimiz ile birleştirilerek oluşturduğumuz karşılaştırma grafiği ve coğrafi gradiyentlere ait regresyon katsayıları Şekil 4.4'te verilmektedir. Bu ilişkilendirme grafiği incelendiğinde Kuzey Amerika popülasyonlarına ait güçlü enlemsel ilişki Avrupa ve Türkiye-Rusya popülasyonlarında yoktur. Diyapoz düşük sıcaklık ve kısa gün uzunluğu ile uyarılan bir karakter olması nedeniyle daha düşük sıcaklık ve daha kısa gün uzunluğunun olduğu yüksek enlemlerde diyapoz frekansının fazla, düşük enlemlerde ise diyapoz frekansının az olması beklenilmektedir. Bu sonuçlar diyapoz klininin sadece Amerika'da [15] ve Avustralya'da [5] paralel olduğu, Avrupa ve bu çalışmada konu olan coğrafi kesitte paralel klin oluşturmadığı, bu nedenle diyapoz karakterinin coğrafi varyasyonunu sadece iklimsel değişkenlere bağlı ortaya çıkan adaptif bir karakter olmadığı yönünde güçlü kanıtlar sunmaktadır.



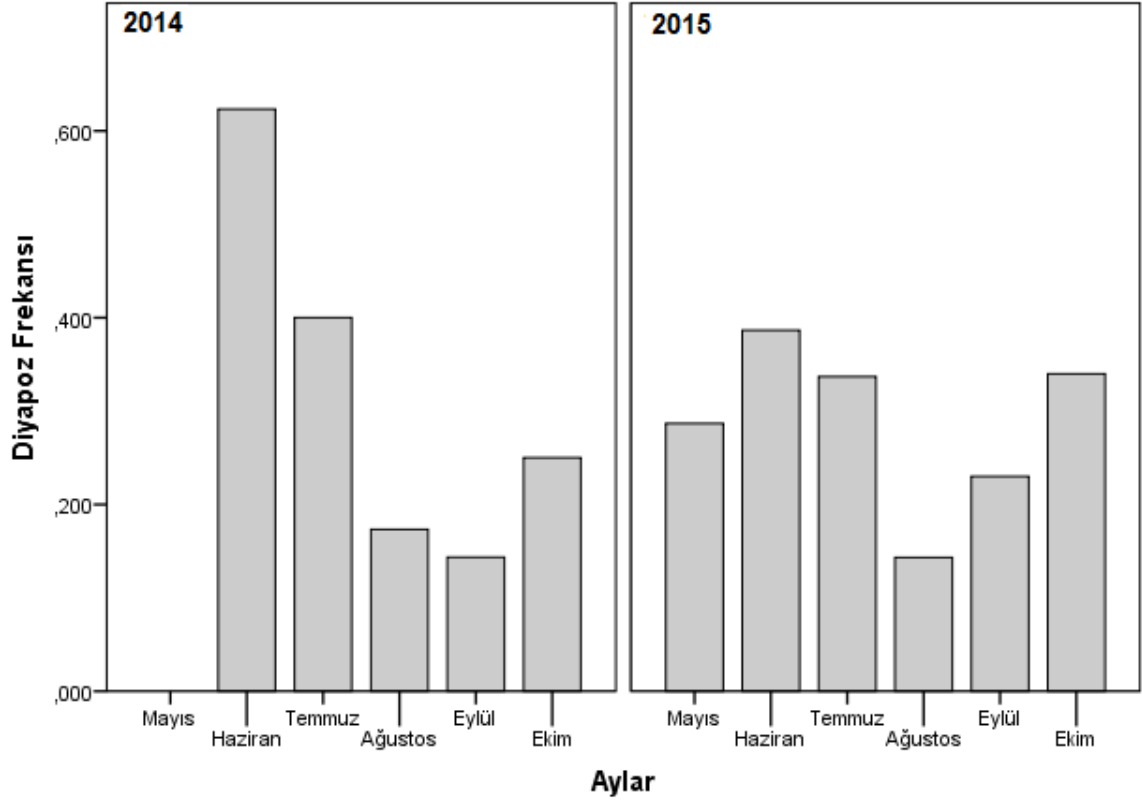
Şekil 4.4. Kuzey Amerika popülasyonları diyapoz klini ile Avrupa popülasyonları diyapoz frekanslarının Türkiye ve Rusya Popülasyonlarına ait ortalama diyapoz frekansları ile karşılaştırılması (* $p < 0.001$).

Avrupa popülasyonlarıyla yapılan çalışmalarda enleme bağlı güçlü bir klin bulunamasa da, fotoperiyotla ilişkili zaman gen ailesinden olan *timeless* geninin farklı alellerinin enlemsel olarak varyasyon gösterdiği ve bu varyasyonların diyapoz oranıyla ilişkili olduğu ortaya konmuştur [71]. Bu çalışmada kullanılan popülasyonlarda diyapoz fenotipinin fotoperiyot

ile ilişkisinin araştırılması, diyapoz fenotipi altındaki mekanizmaların ortaya çıkarılması açısından önemli olabilir.

4.2.2. Yıla ve Mevsime Bağlı Diyapoz Frekansları

İki yıla ait ve aya bağlı, erken yaz – yaz ve sonbahar verisi sadece Yeşilöz’den olduğu için mevsime ve yıla bağlı farklılıklar sadece Yeşilöz popülasyonuna ait soy hatlarında incelenmiştir.



Şekil 4.5. Yeşilöz popülasyonuna ait soyların 2014 ve 2015 yılları aya bağlı diyapoz frekanslarının bar grafik olarak gösterimi.

Buna göre, Şekil 4.5 incelendiğinde farklı aylarda toplanan soy hatlarının diyapoz frekansları görülmektedir. 2014 yılı Mayıs ayına ait veri olmadığından karşılaştırma yapılamamıştır. Haziran ayında diyapoz frekansının 2015 yılının aynı ayına göre çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Onun dışındaki aylarda ise yıldan yıla belirgin bir fark yoktur, ancak örüntü benzerdir. Yani erken yazda (Mayıs-Haziran) diyapoz fenotipi yüksekken yaz dönemi (Temmuz – Ağustos) düşüş eğilimi göstermekte ve sonbahar döneminde (Eylül – Ekim) yine yükselme eğiliminde olduğu görülmektedir. Çizelge 4.7’de her bir ay için iki yılın ortalama verileri betimlenmektedir. Buna göre diyapoz frekansı en

yüksek Haziran ayında toplanan soy hatlarında gözlenirken, en düşük diyapoz frekansı Ağustos ayında toplanan soy hatlarında görülmüştür.

Çizelge 4.7. Yeşilöz popülasyonundaki soy hatlarında gözlenen diyapoz frekanslarının (DF) aydan aya değişimlerinin soy hattı sayıları (N), ortalamaları, ortalamaların standart sapma (S.S.) değerleri.

Aylar	N	Ortalama DF	S.S.
Mayıs	10	0,2868	0,1381
Haziran	20	0,5050	0,3361
Temmuz	15	0,3622	0,4067
Ağustos	20	0,1583	0,2133
Eylül	20	0,1867	0,2123
Ekim	20	0,2950	0,3821

Yeşilöz popülasyonunda farklı aylara ait diyapoz fenotipi gösteren her soy hattının diyapoz frekansları (DF) belirlenmiş ve aylar arasında diyapoz frekansları bakımından fark “iki yönlü varyans analizi” (two-way ANOVA) ile test edilmiştir. Diyapoz frekanslarının aylar arası farklılıklarının anlam derecelerini belirlemek amacıyla yapılan *Post Hoc* testleri sonucunda, sadece en yüksek diyapoz frekansını gösteren Haziran ayında toplanmış olan soy hatlarının diyapoz frekansları ile en düşük diyapoz frekansına sahip Ağustos ($p = 0,006$) ve Eylül ($p = 0,013$) ayındaki soyların diyapoz frekansları ile anlamlı farklılık gösterdiği, diğer ikili karşılaştırmalarda ise diyapoz frekansı bakımından anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır.

İki yıla ait D ve ND fenotipler açısından ki-kare testi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuş ($p=0.137$), yani yıla bağlı diyapoz fenotipinde anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. İki yılın toplam verisi kullanılarak diyapoz fenotipi ve aylık farklılıklar ise ki-kare testi ile anlamlı ($p<0.0001$) bulunmuştur (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Diyapoz gösteren ve göstermeyen birey sayıları, frekansları (parantez içerisinde verilmektedir) ve diyapoz fenotipinin aydan aya değişimlerini ve bu değişimin önemini gösteren ki kare analiz sonucu.

Aylar										
	May	Haz	Tem	Ağu	Eyl	Eki	Σ	sd	Ki Kare	p
D	86 (0.29)	303 (0.51)	163 (0.36)	95 (0.16)	112 (0.19)	177 (0.30)	936 (0.30)	5	223.837	<0.0001
ND	214 (0.71)	297 (0.49)	287 (0.64)	505 (0.84)	488 (0.81)	423 (0.70)	2214 (0.70)			
Σ	300	600	450	600	600	600	3150			

Literatüre bakıldığında erken yazda diyapoz frekansının yüksek, yazın düşük ve sonbaharda tekrar yüksek olması [21] bu çalışmada elde edilen sonuçlarla uyumaktadır. Mevsimsel döngülerin olduğu ılıman kuşaklarda, diyapoz kış koşullarında hayatta kalabilirliği arttırdığından diyapoz frekansının görülme sıklığı kışın artmakta, üremenin ve besine ulaşabilmenin daha elverişli olduğu yaz koşullarında ise beklenildiği üzere azalmaktadır.

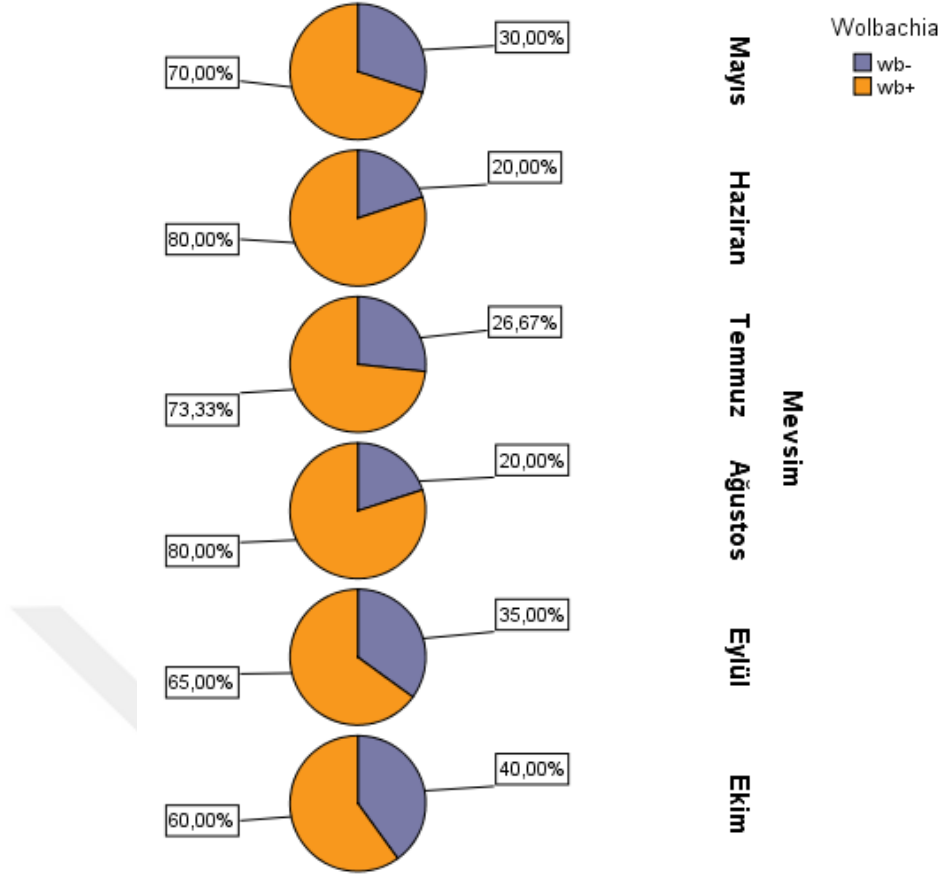
Elde edilen sonuçlarda Mayıs ayında diyapoz frekansının diğer aylara göre düşük olması ilginç bulgulardan biridir. Araziden Mayıs ayında toplanan sineklerin doğal habitatlarında diyapozdan daha erken çıkmaları ve çevresel stres koşullarına daha dayanıklı bireyler olmaları bu etkiye neden olmuş olabilir. Fakat, Mayıs ayından sadece 2015 yılında toplanan soy hatları deneye alınabildiğinden daha sağlıklı bir tartışma yapabilmek için Mayıs ayında farklı yıllarda toplanan soy hatları ile diyapoz frekanslarının karşılaştırılması gerekmektedir.

Literatürde diyapoz ve farklı yaşam öyküsü karakterleri için mevsimsellik ile ilişkili SNP'ler olduğu bilinmektedir [1, 19, 102]. Diyapozda görülen bu mevsimselliğin nedeninin bu karakterle ilişkili çeşitli genlerin ve bu genlerin ekspresyonlarında oluşan değişimler nedeniyle ortaya çıkmış olabilir. Bu çalışma ileriye alınarak görülen mevsimsel örüntünün ilişkili olabileceği genetik mekanizmalar ortaya çıkarılabilir.

4.3. *Wolbachia* Enfeksiyonu ve Diyapoz

Böcekleri ve bazı nematotları enfekte eden gram-negatif *Wolbachia* spp. bakterisinin konukçu ile etkileşim içerisinde olduğu ve enfekte ettiği konukçusunun özellikle yaşam öyküsü karakterleri üzerinde etkili olduğu bilinmektedir [108, 110]. Bu tezde kullanılan tüm soy hatları için tespit edilen *Wolbachia* spp. enfeksiyonları Ek-1'de verilmektedir. Ancak, araziden toplandıktan birkaç kuşak sonra Rusya ve Ukrayna popülasyonları tetrasiklin antibiyotik uygulaması ile iyileştirildiklerinden *Wolbachia* taşımamaktadırlar. Bu popülasyonların tamamı Wb (-) bireyler olduğundan analizlere dahil edilmemiştir.

Sadece Yeşilöz popülasyonları ile yapılan analizde diyapoz fenotipi gösteren 105 soy hattından 75 tanesi *Wolbachia* enfeksiyonu taşımakta diğerleri taşımamaktadır. Diyapoz frekansı ve *Wolbachia* enfeksiyonu arasındaki ilişkiyi test etmek için yapılan ki-kare analizi istatistiksel olarak anlamsızdır.



Şekil 4.6. Yeşilöz popülasyonuna ait soylarının aydan aya *Wolbachia* enfeksiyonu yüzdelik dilimleri.

Yeşilöz popülasyonundaki soy hatlarının *Wolbachia* enfeksiyonunun aylara göre dağılımları Şekil 4.6’da görülmektedir. Genel olarak enfeksiyon tüm aylardaki soy hatlarında yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak bu oran erken yaz ve yaz döneminde toplanan soy hatlarında *Wolbachia* enfeksiyonunu daha yüksek olduğu görülmektedir. Enfeksiyonun artan sıcaklık ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ancak aylara bağlı *Wolbachia* enfeksiyonu ve diyapoz frekansı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. *Wolbachia* enfeksiyonu ile reproduktif diyapoz arasındaki ilişkiyle ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. *Wolbachia* enfeksiyonunun insülin yolağı ile ilişkisinin olduğu bilinmektedir. Ancak, *Wolbachia* enfeksiyonunun diyapoz fenotipini direkt etkilediği yönünde bir bilgi olmamasına rağmen, reproduktif diyapoz giren dişi bireylerin non-diyapoz koşullara alındığında enfeksiyon taşıyan dişilerin enfeksiyon taşımayanlara göre yumurta veriminin ve yavru döl yaşayabilirliğinin azaldığı yönünde bulgulara rastlanmıştır [110].

4.4. İklimsel Parametrelerin Diyapoz ile İlişkisi

Diyapoz frekansları ile coğrafi, iklimsel ve genetik değişkenler arasındaki ilişkileri açıklayabilmek için basit korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu hesaplanan *Pearson* korelasyon katsayıları (r) ve önem dereceleri Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Tüm populasyonlar için coğrafi, iklimsel ve genetik değişkenler ile diyapoz frekansı, *InR* polimorfizmi ve *Wolbachia* enfeksiyonu arasındaki *Pearson* korelasyon katsayıları (r).

	Enlem	Yıl	Ay	Sıcaklık			Nem
				Maksimum	Minimum	Ortalama	
Diyapoz Frekansı	0.23	- 0.19	- 0.161 *	0.008	0.000	-0.001	0.037
<i>InR</i> Polimorfizmi	0.030	0.036	- 0.083	0.001	0.018	0.010	-0.047
<i>Wolbachia</i>	0.115	0.106	- 0.150*	0.148*	0.143*	0.143*	-0.102

* $p < 0.05$

Diyapoz frekansı iklimsel değişkenler ile anlamlı bir ilişki göstermemesine rağmen ‘ay’ değişkeni ile negatif ve anlamlı bir ilişki göstermiştir. Bu ilişki erken yaz ve yaz mevsiminde diyapoz frekansının daha yüksek olmasının istatistiksel anlamını göstermektedir (Çizelge 4.9). Reprodüktif diyapoz soğuk koşullarla indüklenen bir karakter olmasına rağmen, sıcaklık parametreleriyle anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bu ilişkinin bulunamaması ve diyapoz frekanslarının aydan aya değişim göstermesi, diyapoza sadece iklimsel parametrelerin etki etmediğini ve bu fenotipin altında güçlü genetik etkileşimlerin olabileceğini göstermektedir.

InR polimorfizmi hiç bir iklimsel, coğrafi değişken ile anlamlı bir ilişki göstermemiştir. *Wolbachia* enfeksiyonu ise tüm sıcaklık değişkenleri ile pozitif ve anlamlı bir ilişkinin yanı sıra ‘ay’ değişkeni ile yine anlamlı ancak negatif bir ilişki göstermiştir (Çizelge 4.9).

Wolbachia enfeksiyonunun bu çalışmada kullanılan populasyonlarda ay değişkeni ile anlamlı negatif korelasyon göstermesi ve sıcaklık parametreleri ile anlamlı pozitif korelasyon göstermesi bu enfeksiyonu etkileyen parametrenin sıcaklık olduğunu düşündürmektedir. Kriesner ve arkadaşlarının [110] yaptığı çalışmada Avustralya populasyonlarında 20 yıllık veri kullanılarak *Wolbachia* enfeksiyonu frekansının değişimi incelendiğinde, *Wolbachia* frekansının herhangi bir mevsimsellik göstermediği bulunmuştur. Öte yandan aynı çalışmada tropikal bölgelerde *Wolbachia* frekansının yüksekken güneye ılıman bölgelere inildikçe frekansın düştüğü ortaya konmuştur. Bu bulgu *Wolbachia*’nın sıcaklık ile ilişkili olduğunu destekler niteliktedir. Fakat bu çalışmada yüksek enlemlerde *Wolbachia* enfeksiyonu görülme sıklığının azalacağı

beklenirken, lokasyon değişkeni ile *Wolbachia* enfeksiyonu arasında herhangi anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca Valday popülasyonunda araziden toplandığında belirlenen *Wolbachia* enfeksiyonlarına bakıldığında, *Wolbachia* taşıyan soy hatlarının sayıca taşımayanlardan daha fazla olduğu görülmektedir. *Wolbachia* enfeksiyonu ile ilişkili daha doğru varyasyonlar yapabilmek için bu çalışmadaki popülasyonlara ek olarak daha güney enlemlerden toplanacak popülasyonlar ile bu çalışmanın genişletilmesi bu konudaki sorulara açıklık getirebilir.

Sonuç ve Öneriler:

Tüm sonuçları genel olarak toparlayacak olursak bu çalışmanın temelinde enlemsellik, mevsimsellik ve *InR* gen polimorfizmi ile diyapozun ilişkisini sorgulamak amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar bize diyapozun enlem ile güçlü bir ilişki içerisinde olmadığını, ancak mevsimsellik gösterdiğini göstermiştir. Diğer taraftan diyapoz ile ilişkili güçlü bir aday gen olarak önerilen *InR* geninin kendi örneklem grubumuz içerisinde diyapoz ile ilişkisine yönelik güçlü kanıtlar olmasa da, bulgular olası bir ilişkiye dönük işaretler vermiştir. Bu sonuç, çalışmanın arttırılacak popülasyonlar ile devamının önemini göstermektedir. Öte yandan, *InR* gen polimorfizmine ait literatürde ortaya konulan enlemsel klin, verilerimiz ile güçlenmiştir. Enlem arttıkça özellikle 248 alelinin frekansındaki artış, test ettiğimiz popülasyonlarda da kendini göstermiştir. Çalışma kapsamında sorulan bir diğer soru ise *Wolbachia* enfeksiyonu ile diyapoz ilişkisi olmuş ve bunların bir etkileşim içerisinde olmadığı bulunmuştur.

Oldukça kompleks bir özellik olan *Drosophila*'da reproduktif diyapozun mekanizması hakkında bilinenlere ve bilinmeyenlere katkı yapan bu çalışma yeni sorular oluşmasına neden olmuştur. Özellikle Amerika ve Avustralya'da elde edilen bulgulara ters düşen Avrupa popülasyonlarını daha geniş enlemsel ölçekte hem diyapoz frekansı hem de *InR* polimorfizimleri bakımından incelemek önemli olacaktır. Ayrıca, aynı laboratuvar koşullarında yapılacak çalışmalar popülasyonlar arası fenotipik farkı daha da karşılaştırılabilir hale getirebileceğinden, Kuzey Amerika ve Avustralya popülasyonları ile birlikte Avrupa ve bu çalışmada kullanılan popülasyonların aynı ortamda tekrarından elde edilecek veri daha bilgi verici olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Bergland, A.O., Tobler, R., Gonzalez, J., Schmidt, P., Petrov, D., Secondary contact and local adaptation contribute to genome-wide patterns of clinal variation in *Drosophila melanogaster*, *Molecular ecology*, **2015**.
- [2] Kawecki, T.J., Adaptation to marginal habitats, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39, 321-342, **2008**.
- [3] Richardson, J.L., Urban, M.C., Bolnick, D.I., Skelly, D.K., Microgeographic adaptation and the spatial scale of evolution, *Trends in Ecology & Evolution*, 29(3), 165-176, **2014**.
- [4] Bergman, C., Uber die Verhältnisse der Warmeökonomie der Thiere zu ihrer Grosse, *Gottinger Studien*, 3, 595-708, **1847**.
- [5] Lee, S.F., Sgro, C.M., Shirriffs, J., Wee, C.W., Rako, L., van Heerwaarden, B., Hoffmann, A.A., Polymorphism in the couch potato gene clines in eastern Australia but is not associated with ovarian dormancy in *Drosophila melanogaster*, *Molecular ecology*, 20(14), 2973-2984, **2011**.
- [6] David, J.R., Capy, P., Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations, *Trends in Genetics*, 4(4), 106-111, **1988**.
- [7] Lachaise, D., Silvain, J.F., How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: the *Drosophila melanogaster*-*D. simulans* palaeogeographic riddle, *Springer Netherlands*, 17-39, **2004**.
- [8] Cogni, R., Kuczynski, C., Koury, S., Lavington, E., Behrman, E.L., O'Brien, K.R., Eanes, W.F., The intensity of selection acting on the couch potato gene-spatial-temporal variation in a diapause cline, *Evolution*, 68(2), 538-548, **2014**.
- [9] David, J.R., Bocquet, C., Similarities and differences in latitudinal adaptation of two *Drosophila* sibling species, *Nature*, 257(5527), 588-590, **1975**.
- [10] Klepsatel, P., Gálíková, M., Huber, C.D., Flatt, T., Similarities and differences in altitudinal versus latitudinal variation for morphological traits in *Drosophila melanogaster*, *Evolution*, 68(5), 1385-1398, **2014**.
- [11] Azevedo, R.B.R., French, V., Partridge, L., Thermal Evolution of Egg Size in *Drosophila melanogaster*, *Evolution*, 50(6):2338–2345, **1996**.
- [12] Hoffmann, A.A., Anderson, A., Hallas, R., Opposing clines for high and low temperature resistance in *Drosophila melanogaster*, *Ecology Letters*, 5(5), 614-618, **2002**.
- [13] Cohan, F.M., Graf, J.D., Latitudinal cline in *Drosophila melanogaster* for knockdown resistance to ethanol fumes and for rates of response to selection for further resistance, *Evolution*, 278-293, **1985**.
- [14] Hoffmann, A.A., Parsons, P.A., An integrated approach to environmental stress tolerance and life-history variation: desiccation tolerance in *Drosophila*, *Biological Journal of the Linnean Society*, 37(1-2):117-136, **1989**.
- [15] Schmidt, P.S., Paaby, A.B., Heschel, M.S., Genetic variance for diapause expression and associated life histories in *Drosophila melanogaster*, *Evolution*, 59(12), 2616-2625, **2005**.

- [16] Sørensen, J.G., Norry, F.M., Scannapieco, A.C., Loeschcke, V., Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World, *Journal of evolutionary biology*, 18(4), 829-837, **2005**.
- [17] Collinge, J.E., Hoffmann, A.A., McKechnie, S.W., Altitudinal patterns for latitudinally varying traits and polymorphic markers in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia, *Journal of Evolutionary Biology*, 19(2):473–482, **2006**.
- [18] Ayhan, N., Güler, P., Onder, B.S., Altitudinal variation in lifespan of *Drosophila melanogaster* populations from the Firtina Valley, northeastern Turkey, *Journal of Thermal Biology*, 61, 91-97, **2016**.
- [19] Zhao, X., Bergland, A.O., Behrman, E.L., Gregory, B.D., Petrov, D.A., Schmidt, P.S., Global transcriptional profiling of diapause and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*, *Molecular biology and evolution*, 33(3), 707-720, **2016**.
- [20] Rajpurohit, S., Parkash, R., Ramniwas, S., Singh, S., Variations in body melanisation, ovariole number and fecundity in highland and lowland populations of *Drosophila melanogaster* from the Indian subcontinent, *Insect Science*, 15(6), 553-561, **2008**.
- [21] Schmidt, P.S., Matzkin, L., Ippolito, M., Eanes, W F., Geographic variation in diapause incidence, life-history traits, and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*, *Evolution*, 59(8), 1721-1732, **2005**.
- [22] Schmidt, P.S., Paaby, A.B., Reproductive diapause and life-history clines in north American populations of *Drosophila melanogaster*, *Evolution*, 62(5), 1204-1215, **2008**.
- [23] Adrion, J.R., Hahn, M.W., Cooper, B.S., Revisiting classic clines in *Drosophila melanogaster* in the age of genomics, *Trends in Genetics*, 31(8), 434-444, **2015**.
- [24] Mettler, L.E., Voelker, R.A., Mukai, T., Inversion clines in populations of *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, 87(1), 169-176, **1977**.
- [25] Sezgin, E., Duvernell, D.D., Matzkin, L.M., Duan, Y., Zhu, C.T., Verrelli, B.C., Eanes, W.F., Single-locus latitudinal clines and their relationship to temperate adaptation in metabolic genes and derived alleles in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, 168(2), 923-931, **2004**.
- [26] Paaby, A.B., Blacket, M.J., Hoffmann, A.A., Schmidt, P.S., Identification of a candidate adaptive polymorphism for *Drosophila* life history by parallel independent clines on two continents, *Molecular Ecology*, 19:760–74, **2010**.
- [27] Kapun, M., Schalkwyk, H., McAllister, B., Flatt, T., Schlötterer C., Inference of chromosomal inversion dynamics from Pool-Seq data in natural and laboratory populations of *Drosophila melanogaster*, *Molecular Ecology*, 23(7), 1813-1827, **2014**.
- [28] McKechnie, S.W., Blacket, M.J., Song, S.V., Rako, L., Carroll, X., Johnson, T.K., Hoffmann, A.A., A clinally varying promoter polymorphism associated with adaptive variation in wing size in *Drosophila*, *Molecular ecology*, 19(4), 775-784, **2010**.

- [29] Tatar, M., Chien, S.A., Priest, N.K., Negligible senescence during reproductive dormancy in *Drosophila melanogaster*, *The American Naturalist*, 158(3), 248-258, **2001**.
- [30] Flatt, T., Heyland, A., *Mechanisms of Life History Evolution: The Genetics and Physiology of Life History Traits and Trade-offs*, (eds: Flatt, T., Heyland, A.), Oxford University Press, Oxford, **2011**.
- [31] Bradshaw, A.D., Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants, *Advances in genetics*, 13, 115-155, **1965**.
- [32] Pigliucci, M., *Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture*, Johns Hopkins University Press, Baltimore, **2001**.
- [33] Vermeulen, C.J., Loeschcke, V., Longevity and the stress response in *Drosophila*, *Experimental gerontology*, 42(3), 153-159, **2007**.
- [34] Toivonen, J.M., Partridge, L., Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila*, *Molecular and cellular endocrinology*, 299(1), 39-50, **2009**.
- [35] Partridge, L., Gems, D., Withers, D.J., Sex and death: what is the connection?, *Cell*, 120(4), 461-472, **2005**.
- [36] Zhu, L., The Genetic Mapping of Reproductive Diapause in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), Doktora Tezi, Stony Brook University, USA, 2009.
- [37] Flatt, T., Survival costs of reproduction in *Drosophila*, *Experimental gerontology*, 46(5), 369-375, **2011**.
- [38] Bertani, G., Artificial “breaking” of the diapause in *Drosophila nitens*, *Nature*, 159(4035), 309-309, **1947**.
- [39] Sanburg, L.L., Larsen, J.R., Effect of photoperiod and temperature on ovarian development in *Culex pipiens pipiens*, *Journal of Insect Physiology*, 19(6), 1173-1181, **1973**.
- [40] Barker, J.F., Herman, W.S., Effect of photoperiod and temperature on reproduction of the monarch butterfly, *Danaus plexippus*, *Journal of Insect Physiology*, 22(12), 1565-1568, **1976**.
- [41] Middlekauff, W.W., Effects of photoperiod upon oögenesis in *Melanoplus devastator* Scudder (Orthoptera: Acrididae), *Journal of the Kansas Entomological Society*, 37(2), 163-168, **1964**.
- [42] Williams, P.D., Day, T., Fletcher, Q., Rowe, L., The shaping of senescence in the wild, *Trends in Ecology & Evolution*, 21(8), 458-463, **2006**.
- [43] Denlinger, D.L., Dormancy in tropical insects, *Annual review of entomology*, 31(1), 239-264, **1986**.
- [44] Stalker, H.D., Carson, H.L., An altitudinal transect of *Drosophila robusta* Sturtevant, *Evolution*, 295-305, **1948**.
- [45] Kimura, M.T., Beppu, K., Climatic adaptations in the *Drosophila immigrans* species group: seasonal migration and thermal tolerance, *Ecological Entomology*, 18(2), 141-149, **1993**.

- [46] Epling, C., Mitchell, D.F., Mattoni, R.H.T., Frequencies of inversion combinations in the third chromosome of wild males of *Drosophila pseudoobscura*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 41(11), 915-921, **1955**.
- [47] Saunders, D.S., Henrich, V.C., Gilbert, L.I., Induction of diapause in *Drosophila melanogaster*: photoperiodic regulation and the impact of arrhythmic clock mutations on time measurement, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(10), 3748-3752, **1989**.
- [48] Kubrak, O.I., Kučerová, L., Theopold, U., Nässel, D.R., The sleeping beauty: how reproductive diapause affects hormone signaling, metabolism, immune response and somatic maintenance in *Drosophila melanogaster*, *PLoS One*, 9(11), e113051, **2014**.
- [49] Pegoraro, M., Zonato, V., Tyler, E.R., Fedele, G., Kyriacou, C.P., Tauber, E., Geographical analysis of diapause inducibility in European *Drosophila melanogaster* populations, *Journal of Insect Physiology*, 98, 238-244, **2017**.
- [50] Schmidt, P.S., Conde, D.R., Environmental heterogeneity and the maintenance of genetic variation for reproductive diapause in *Drosophila melanogaster*, *Evolution*, 60(8), 1602-1611, **2006**.
- [51] Tatar, M., Yin, C.M., Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms, *Experimental gerontology*, 36(4), 723-738, **2001**.
- [52] Schiesari, L., Kyriacou, C.P., Costa, R., The hormonal and circadian basis for insect photoperiodic timing, *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 585(10), 1450-1460, **2011**.
- [53] Hodkova, M., Tissue signaling pathways in the regulation of life-span and reproduction in females of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*, *Journal of insect physiology*, 54(2), 508-517, **2008**.
- [54] Bell, G., Koufopanou, V., The cost of reproduction, *Oxford surveys in evolutionary biology*, 3, 83-131, **1986**.
- [55] Emerson, K.J., Uyemura, A.M., McDaniel, K.L., Schmidt, P.S., Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M., Environmental control of ovarian dormancy in natural populations of *Drosophila melanogaster*, *Journal of Comparative Physiology A*, 195(9), 825-829, **2009**.
- [56] Yu, W., Hardin, P.E., Circadian oscillators of *Drosophila* and mammals, *Journal of cell science*, 119(23), 4793-4795, **2006**.
- [57] Eskin, A., Identification and physiology of circadian pacemakers. Introduction, *In Federation proceedings*, Vol. 38, No. 12, pp. 2570-2572, **1979**.
- [58] Hardin, P.E., Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*, *Advances in genetics*, 74, 141, **2011**.
- [59] Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E., Thomas, T.L., Zoran, M.J., Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms, *Nature Reviews Genetics*, 6(7), 544-556, **2005**.
- [60] Bünning, E., Die endonome Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion, *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 54, 590-607, **1936**.

- [61] Kimura, M.T., Yoshida, T., A genetic analysis of photoperiodic reproductive diapause in *Drosophila triauraria*, *Physiological entomology*, 20(3), 253-256, **1995**.
- [62] Lumme, J., Oikarinen, A., The genetic basis of the geographically variable photoperiodic diapause in *Drosophila littoralis*, *Hereditas*, 86(1), 129-141, **1977**.
- [63] Tyukmaeva, V.I., Salminen, T.S., Kankare, M., Knott, K.E., Hoikkala, A., Adaptation to a seasonally varying environment: a strong latitudinal cline in reproductive diapause combined with high gene flow in *Drosophila montana*, *Ecology and evolution*, 1(2), 160-168, **2011**.
- [64] Saunders, D.S., Gilbert, L.I., Regulation of ovarian diapause in *Drosophila melanogaster* by photoperiod and moderately low temperature, *Journal of Insect Physiology*, 36(3), 195-200, **1990**.
- [65] Konopka, R.J., Benzer, S., Clock mutants of *Drosophila melanogaster*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(9), 2112-2116, **1971**.
- [66] Myers, M.P., Wager-Smith, K., Rothenfluh-Hilfiker, A., Young, M.W., Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock, *Science*, 271(5256), 1736, **1996**.
- [67] Saunders, D.S., The circadian basis of ovarian diapause regulation in *Drosophila melanogaster*: is the period gene causally involved in photoperiodic time measurement?, *Journal of biological rhythms*, 5(4), 315-331, **1990**.
- [68] Kyriacou, C.P., Sawyer, L.A., Piccin, A., Couchman, M.E., Chalmers, D., Evolution and population biology of theperiodgene, *In Seminars in Cell & developmental biology*, Academic Press, 7(6), 803-810, **1996**.
- [69] Costa, R., Peixoto, A.A., Barbuji, G., Kyriacou, C.P., A latitudinal cline in a *Drosophila* clock gene, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 250(1327), 43-49, **1992**.
- [70] Sawyer, L.A., Hennessy, J.M., Peixoto, A.A., Rosato, E., Parkinson, H., Costa, R., Kyriacou, C.P., Natural variation in a *Drosophila* clock gene and temperature compensation, *Science*, 278(5346), 2117-2120, **1997**.
- [71] Tauber, E., Zordan, M., Sandrelli, F., Pegoraro, M., Osterwalder, N., Breda, C., Rosato, E., Natural selection favors a newly derived timeless allele in *Drosophila melanogaster*, *Science*, 316(5833), 1895-1898, **2007**.
- [72] Sandrelli, F., Tauber, E., Pegoraro, M., Mazzotta, G., Cisotto, P., Landskron, J., Costa, R., A molecular basis for natural selection at the timeless locus in *Drosophila melanogaster*, *Science*, 316(5833), 1898-1900, **2007**.
- [73] Tu, M.P., Yin, C.M., Tatar, M., Impaired ovarian ecdysone synthesis of *Drosophila melanogaster* insulin receptor mutants, *Aging cell*, 1(2), 158-160, **2002**.
- [74] Tatar, M., Bartke, A., Antebi, A., The endocrine regulation of aging by insulin-like signals, *Science*, 299(5611), 1346-1351, **2003**.
- [75] Flatt, T., Tu, M.P., Tatar, M., Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history, *Bioessays*, 27(10), 999-1010, **2005**.

- [76] Denlinger, D.L., Regulation of diapause, *Annual review of entomology*, 47(1), 93-122, **2002**.
- [77] Saunders, D.S., *Insect Clocks*, Elsevier, **2002**.
- [78] Saunders, D.S., Insect circadian rhythms and photoperiodism, *Invertebrate Neuroscience*, 3(2), 155-164, **1997**.
- [79] Herman, W.S., Tatar, M., Juvenile hormone regulation of longevity in the migratory monarch butterfly, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268(1485), 2509-2514, **2001**.
- [80] Clancy, D.J., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Partridge, L., Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein, *Science*, 292(5514), 104-106, **2001**.
- [81] Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M., Garofalo, R.S., A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function, *Science*, 292(5514), 107-110, **2001**.
- [82] Sim, C., Denlinger, D.L., Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6777-6781, **2008**.
- [83] Moshitzky, P., Fleischmann, I., Chaimov, N., Saudan, P., Klauser, S., Kubli, E., Applebaum, S.W., Sex-peptide activates juvenile hormone biosynthesis in the *Drosophila melanogaster* corpus allatum, *Archives of insect biochemistry and physiology*, 32(3-4), 363-374, **1996**.
- [84] Richard, D.S., Jones, J.M., Barbarito, M.R., Cerula, S., Detweiler, J.P., Fisher, S.J., Scheswohl, D.M., Vitellogenesis in diapausing and mutant *Drosophila melanogaster*: further evidence for the relative roles of ecdysteroids and juvenile hormones, *Journal of Insect Physiology*, 47(8), 905-913, **2001**.
- [85] Delbeque, J.P., Weidner, K., Hoffmann, K.H., Alternative sites for ecdysteroid production in insects, *Invertebrate Reproduction & Development*, 18(1-2), 29-42, **1990**.
- [86] Richard, D.S., Watkins, N.L., Serafin, R.B., Gilbert, L.I., Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by *Drosophila melanogaster* oocytes, *Journal of Insect Physiology*, 44(7), 637-644, **1998**.
- [87] Gruntenko, N.E., Rauschenbach, I.Y., Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction, *Journal of insect physiology*, 54(6), 902-908, **2008**.
- [88] Terashima, J., Bownes, M., Translating available food into the number of eggs laid by *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, 167(4), 1711-1719, **2004**.
- [89] Terashima, J., Bownes, M., A microarray analysis of genes involved in relating egg production to nutritional intake in *Drosophila melanogaster*, *Cell Death & Differentiation*, 12(5), 429-440, **2005**.
- [90] Emerson, K.J., Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M., Complications of complexity: integrating environmental, genetic and hormonal control of insect diapause, *Trends in Genetics*, 25(5), 217-225, **2009**.

- [91] Schmidt, P.S., Zhu, C.T., Das, J., Batavia, M., Yang, L., Eanes, W.F., An amino acid polymorphism in the couch potato gene forms the basis for climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(42), 16207-16211, **2008**.
- [92] Bellen, H.J., Vaessin, H., Bier, E., Kolodkin, A., D'Evelyn, D., Kooyer, S., Jan, Y.N., The *Drosophila* couch potato gene: an essential gene required for normal adult behavior, *Genetics*, 131(2), 365-375, **1992**.
- [93] Zonato, V., Fedele, G., Kyriacou, C.P., An intronic polymorphism in couch potato is not distributed clinally in European *Drosophila melanogaster* populations nor does it affect diapause inducibility, *PloS one*, 11(9), e0162370, **2016**.
- [94] Williams, K.D., Busto, M., Suster, M.L., So, A.K.C., Ben-Shahar, Y., Leevers, S.J., Sokolowski, M.B., Natural variation in *Drosophila melanogaster* diapause due to the insulin-regulated PI3-kinase, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(43), 15911-15915, **2006**.
- [95] Rauschenbach, I.Y., Karpova, E.K., Alekseev, A.A., Adonyeva, N.V., Shumnaya, L.V., Gruntenko, N.E., Interplay of insulin and dopamine signaling pathways in the control of *Drosophila melanogaster* fitness, *Biochemistry and biophysics*, Springer Science & Business Media, 461(1), 135, **2015**.
- [96] Giannakou, M.E., Partridge, L., Role of insulin-like signalling in *Drosophila* lifespan, *Trends in biochemical sciences*, 32(4), 180-188, **2007**.
- [97] Yenush, L., Fernandez, R., Myers, M.G., Grammer, T.C., Sun, X.J., Blenis, J., White, M.F., The *Drosophila* insulin receptor activates multiple signaling pathways but requires insulin receptor substrate proteins for DNA synthesis, *Molecular and cellular biology*, 16(5), 2509-2517, **1996**.
- [98] Ruan, Y., Chen, C., Cao, Y., Garofalo, R.S., The *Drosophila* insulin receptor contains a novel carboxyl-terminal extension likely to play an important role in signal transduction, *Journal of Biological Chemistry*, 270(9), 4236-4243, **1995**.
- [99] Alvarez-Ponce, D., Aguadé, M., Rozas, J., Network-level molecular evolutionary analysis of the insulin/TOR signal transduction pathway across 12 *Drosophila* genomes, *Genome research*, 19(2), 234-242, **2009**.
- [100] Tu, M.P., Yin, C.M., Tatar, M., Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster*, *General and comparative endocrinology*, 142(3), 347-356, **2005**.
- [101] Chen, C., Jack, J., Garofalo, R.S., The *Drosophila* insulin receptor is required for normal growth, *Endocrinology*, 137(3), 846-856, **1996**.
- [102] Paaby, A.B., Bergland, A.O., Behrman, E.L., Schmidt, P.S., A highly pleiotropic amino acid polymorphism in the *Drosophila* insulin receptor contributes to life-history adaptation, *Evolution*, 68(12), 3395-3409, **2014**.
- [103] Kreitman, M., Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*, *Nature*, 304, 4-12, **1983**.
- [104] Krimbas, C.B., Powell, J.R., *Drosophila Inversion Polymorphism*, CRC Press, **1992**.

- [105] Chong, Z., Zhai, W., Li, C., Gao, M., Gong, Q., Ruan, J., Wu, C.I., The evolution of small insertions and deletions in the coding genes of *Drosophila melanogaster*, *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2699-2708, **2013**.
- [106] Stenson, P.D., Mort, M., Ball, E.V., Howells, K., Phillips, A.D., Thomas, N.S., Cooper, D.N., The human gene mutation database: 2008 update, *Genome medicine*, 1(1), 13, **2009**.
- [107] Ridley, E.V., Wong, A.C.,nDouglas, A.E., Microbe-dependent and nonspecific effects of procedures to eliminate the resident microbiota from *Drosophila melanogaster*, *Applied and environmental microbiology*, 79(10), 3209-3214, **2013**.
- [108] Ikeya, T., Broughton, S., Alic, N., Grandison, R., Partridge, L., The endosymbiont *Wolbachia* increases insulin/IGF-like signalling in *Drosophila*, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276(1674), 3799-3807, **2009**.
- [109] Corby-Harris, V., Pontaroli, A.C., Shimkets, L.J., Bennetzen, J.L., Habel, K.E., Promislow, D.E., Geographical distribution and diversity of bacteria associated with natural populations of *Drosophila melanogaster*, *Applied and environmental microbiology*, 73(11), 3470-3479, **2007**.
- [110] Kriesner, P., Conner, W.R., Weeks, A.R., Turelli, M., Hoffmann, A.A., Persistence of a *Wolbachia* infection frequency cline in *Drosophila melanogaster* and the possible role of reproductive dormancy, *Evolution*, 70(5), 979-997, **2016**.
- [111] <https://www.worldweatheronline.com> (Haziran, **2017**).
- [112] Güler, P., Ayhan, N., Koşukçu, C., Önder, B.Ş., The effects of larval diet restriction on developmental time, preadult survival, and wing length in *Drosophila melanogaster*, *Turkish Journal of Zoology*, 39(3), 395-403, **2015**.
- [113] Falconer, D.S., Mackay, T.F., *Introduction to Quantitative Genetics*, 4th edition., Longman, New York, **1996**.
- [114] King, R.C., *Ovarian Development in Drosophila melanogaster*, New York: Academic Press, 227, **1970**.
- [115] McDonald, J.H., Kreitman, M., Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*, *Nature*, 351(6328), 652, **1991**.
- [116] Aulard, S., David, J.R., Lemeunier, F., Chromosomal inversion polymorphism in Afrotropical populations of *Drosophila melanogaster*, *Genetical research*, 79(01), 49-63, **2002**.
- [117] Pool, J E., Corbett-Detig, R.B., Sugino, R.P., Stevens, K.A., Cardeno, C.M., Crepeau, M.W., Langley, C.H., Population genomics of sub-Saharan *Drosophila melanogaster*: African diversity and non-African admixture, *PLoS Genet*, 8(12), e1003080, **2012**.
- [118] Kapun, M., Fabian, D.K., Goudet, J., Flatt, T., Genomic evidence for adaptive inversion clines in *Drosophila melanogaster*, *Molecular biology and evolution*, 33(5), 1317-1336, **2016**.
- [119] Watterson, G.A., On the number of segregating sites in genetical models without recombination, *Theoretical population biology*, 7(2), 256-276, **1975**.

- [120] Tajima, F., Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations, *Genetics*, 105(2), 437-460, **1983**.



EKLER

Ek-1. Soyların *InR* gen bölgesi 1. ekzonunda taşıdıkları indel polimorfizimleri, *Wolbachia* enfeksiyonu (Wb) ve diyapoz durumları.

Soy Hattı	InR amino asit sekansı			InR Alel	Wb	Diyapoz	
Yeşilöz							
Y142/2-06	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	D
Y142/2-13	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	D
Y142/2-14	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y142/2-15	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	D
Y142/2-16	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y142/4-01	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y143/1-01	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	D
Y143/2-04	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y143/2-08	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	D
Y143/2-09	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y143/2-11	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y144/24	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y144/37	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y144/48	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y144/54	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y144/83	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y144/88	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	H QHL H RQQANVSYTKF	248	w+	D
Y144/104	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y145/21	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	HHHH	H QHL H RQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y145/48	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y145/52	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y145/78	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y145/107	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y145/108	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y145/121	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y145/153	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y146/53	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y146/77	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y146/92	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQH H RQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y157/03	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y157/04	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y157/17	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y157/21	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y157/28	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y157/31	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y158/02	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y158/03	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	D
Y158/07	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y158/10	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y158/11	RRRRQHQQQHHHH	YQH HH HHH QH HH	QHHH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND

Y158/12	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y158/15	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y158/17	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y159/03	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y159/08	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y159/13	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y159/23	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y159/27	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	D
Y159/34	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y159/44	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1510/38	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1510/39	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1510/49	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y1510/51	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1510/60	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1510/61	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y1510/62	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH HH QRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1511/05	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1511/50	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y1511/81	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1511/85	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1511/87	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1511/99	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y1511/104	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1512/02	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	D
Y1512/04	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	D
Y1512/20	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1512/21	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y1512/23	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1512/24	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w-	ND
Y1512/39	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	ND
Y1512/40	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	248	w+	D
Y142/1-06	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	251	w+	ND
Y142/1-10	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH HH QRQQANVSYTKF	251	w-	D
Y142/2-12	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH HH QRQQANVSYTKF	251	w+	ND
Y143/2-10	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH HH QRQQANVSYTKF	251	w-	ND
Y144/57	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH HH QRQQANVSYTKF	251	w+	ND
Y144/70	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH HH QRQQANVSYTKF	251	w+	ND
Y157/13	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	251	w-	ND
Y157/26	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH HH QRQQANVSYTKF	251	w-	ND
Y1510/58	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH HH QRQQANVSYTKF	251	w+	ND
Y1510/59	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH HH QRQQANVSYTKF	251	w+	ND
Y1511/70	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH HH QRQQANVSYTKF	251	w-	ND
Y1511/103	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH HH QRQQANVSYTKF	251	w-	D
Y1512/25	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH HH QRQQANVSYTKF	251	w+	ND
Y1512/28	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVSYTKF	251	w-	ND

Y142/1-08	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H Q H H Q H H Q H H H	QQH H QRQQANVS YTKF	254	w-	D
Y145/98	RRRRQHQQQH H H H H	Y H H H H H Q H H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	254	w-	ND
Y146/23	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H Q H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	254	w-	ND
Y157/01	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H Q H Q H H Q H H H	Q H H LQRQQANVS YTKF	254	w+	ND
Y157/02	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H Q H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	254	w+	ND
Y159/45	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H Q H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	254	w+	D
Y1511/68	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H Q H H Q H H Q H H H	QQH H QRQQANVS YTKF	254	w+	ND
Y144/26					w+	ND
Y146/13					w-	ND
Y146/39					w+	ND
Y146/41					w+	D
Y146/56					w+	ND
Y146/75					w+	ND
Y146/87					w+	D
Y158/13					w+	D
Y158/16					w+	ND
Y159/18					w+	D
Y1510/54					w+	ND
Valday						
B14/1	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w-	ND
B14/3	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w+	D
B14/6	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w+	D
B14/9	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w-	ND
B14/11	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQ GQQANVS YTKF	248	w+	ND
B14/15	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w-	ND
B14/20	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w+	D
B14/29	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w+	ND
B14/31	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w+	ND
B14/37	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w+	ND
B14/38	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w+	ND
B14/40	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w+	ND
B14/41	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH H QRQQANVS YTKF	248	w+	ND
B14/42	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w+	ND
B14/44	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w+	ND
B14/49	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQ GQQANVS YTKF	248	w-	ND
B14/51	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w+	ND
B14/55	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w-	ND
B14/60	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w-	ND
B14/61	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	248	w+	ND
B14/10	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q Q H H	QQH H QRQQANVS YTKF	251	w-	ND
B14/23	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q Q H H	QQH H QRQQANVS YTKF	251	w+	ND
B14/43	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q Q H H	QQH H QRQQANVS YTKF	251	w-	ND
B14/45	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q Q H H	QQH H QRQQANVS YTKF	251	w-	D
B14/57	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H H H H Q H H Q Q H H	QQH H QRQQANVS YTKF	251	w-	D
B14/54	RRRRQHQQQH H H H H	YQH H Q H H Q H H Q H H H	QQH LQRQQANVS YTKF	254	w-	ND
B14/64	RRRRQHQQQH H H H H	Y H H H Q H H Q H H Q H H H	QQH H QRQQANVS YTKF	254	w-	ND

B14/36					w+	ND
Alexandrov						
A14/51	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVS Y TKF	248	w-	ND
A14/56	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVS Y TKF	248	w+	ND
A14/57	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVS Y TKF	248	w+	ND
A14/58	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH H QRQQANVS Y TKF	248	w+	ND
A14/69	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVS Y TKF	248	w-	D
A14/94	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH H QRQQANVS Y TKF	248	w+	ND
A14/124	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVS Y TKF	248	w+	ND
A14/125	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVS Y TKF	248	w+	D
Kiev						
K14.10/24	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQH H QRQQANVS Y TKF	248	w+	D
K14.10/93A	RRRRQHQQHHHH	YQH HHHH QH HH QH HH	QQHLQRQQANVS Y TKF	248	w+	D



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Bengisu Sezen SUBAŞI
Doğum Yeri : Yenimahalle
Medeni Hali : Bekar
E-posta : sezensubasi@gmail.com
Adresi : Yukarı Yurtçu Mh. – Ankara

Eğitim

Lise : Ömer Seyfettin Lisesi – Çankaya, Ankara
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2010-2015)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Ens. Biyoloji ABD (2015-)
Doktora :

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (İyi) – Almanca (Orta)

İş Deneyimi

Deneyim Alanları

Genetik, Populasyon Genetiği, Ekoloji, Evrim

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

1. TÜBİTAK, - RFBR İkili İşbirliği Projesi, Proje No: 214Z238, Banu Şebnem Önder & Elena G. Pasyukova (Yürütücü), Latitudinal, seasonal, and year-to-year changes in genome, transcriptome, and life history traits variation in *Drosophila melanogaster* populations.

Bütçesi: 344.00.-

2. TÜBİTAK, Kapsamlı Araştırma Projesi, Proje No: 116Z285, Banu Şebnem Önder (Yürütücü), Martin Kapun (Danışman), *Drosophila melanogaster*'de kromozom inversiyonlarının mevsimsel fenotipik varyasyonlara etkisi.

Bütçesi: 390.00.-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 13/06/2017

Tez Başlığı / Konusu: *Drosophila melanogaster*'de COĞRAFI VE MEVSİMSEL DİYAPOZ DEĞİŞİMİ VE İNSÜLİN-BENZERİ RESEPTÖR (*InR*) POLİMORFİZMİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

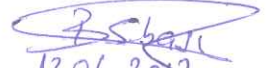
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 80 sayfalık kısmına ilişkin, 13/06/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.


13.06.2017
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Bengisu Sezen SUBAŞI
Öğrenci No: N14323748
Anabilim Dalı: BİYOLOJİ
Programı: GENEL BİYOLOJİ
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.


Yrd. Doç. Dr. Banu Şebnem ÖNDER
(Unvan, Ad Soyad, İmza)