

***Drosophila simulans* POPULASYONLARINDA KIŞLAMA İLE  
İLGİLİ GEN VE KARAKTERLERDE ENLEMSEL  
VARYASYONLARIN ARAŞTIRILMASI**

**STUDYING LATITUDINAL VARIATIONS OF WINTER  
RELATED GENE AND CHARACTERS IN  
*Drosophila simulans* POPULATIONS**

**NUR SEDA COŞKUN**

**DR. ÖĞR. ÜYESİ BANU ŞEBNEM ÖNDER**  
**Tez Danışmanı**

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

2020

***Kizuna***

## ÖZET

### ***Drosophila simulans* POPULASYONLARINDA KIŞLAMA İLE İLGİLİ GEN VE KARAKTERLERDE ENLEMSEL VARYASYONLARIN ARAŞTIRILMASI**

**Nur Seda COŞKUN**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Banu Şebnem ÖNDER**

**Eylül 2020, 118 sayfa**

Alel frekansları ve kantitatif karakterlerde görülen klinler adaptif evrimin kanıtı olarak görülmektedir. Klinal varyasyonların çalışılması ise lokal adaptasyonun anlaşılmasında oldukça önemlidir. Kozmopolit türlerin sahip olduğu yüksek adaptasyon yeteneği, bu türlerin farklı iklimsel ve coğrafi alanlara kolonize olabilmelerini sağlamaktadır. Geniş coğrafyalara yayılan kozmopolit türlerde görülen enlemsel klinler ise bu türleri adaptif evrim çalışmalarının merkezine koymaktadır. Kozmopolit bir tür olan *Drosophila simulans* lokal adaptasyon çalışmaları için siblingi *Drosophila melanogaster* kadar popüler bir tür olmadığından sahip olduğu adaptasyon mekanizmaları hakkındaki bilgi kısıtlıdır. *D. simulans*'ın nasıl kışladığı hakkında ise farklı teoriler mevcuttur. Çalışmamızda *D. simulans*'ın farklı enlemlerden toplanmış Kampala, Hayfa, Hatay, Ankara ve Napoli populasyonlarında kış adaptasyonunu anlamak için kışlama ile ilişkili ve *D. melanogaster* ile yapılan çalışmalarda enlemsel klin gösterdiği bilinen; reproduktif diyapoz frekansı, soğuk komasından kurtulma süresi ve kuru vücut ağırlığı karakterleri ve bu karakterler ile ilişkili olduğu düşünülen "*Insulin like receptor*" (*InR*) geni incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre populasyonlar, seçilen fenotipik karakterler ve *InR* gen bölgesi bakımından farklılaşmış ve populasyonlar arası varyasyon enlem ile ilişkili olabileceği bulunmuştur. Ayrıca *D. simulans*'ın farklı coğrafi bölgelerde iki karakter için aynı seçim baskısı altında olduğunu gösteren ve

bu tür için ilk defa ortaya konulan paralel klinler tanımlanmıştır. İncelenen karakterlerin ve *InR* gen bölgesinin, *D. simulans* populasyonlarının bulunduğu enlemde kış mevsimine gösterdiği lokal adaptasyonda rol alabileceği yönündeki bulgularımız populasyonların göç etmeksizin bulunduğu bölgede kışlayabileceği teorisini desteklemektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Drosophila simulans*, lokal adaptasyon, enlemsel klin, reproduktif diyapoz, soğuk komasından kurtulma süresi, kuru vücut ağırlığı, *InR*.

## **ABSTRACT**

### **STUDYING LATITUDINAL VARIATIONS OF WINTER RELATED GENE AND CHARACTERS IN *Drosophila simulans* POPULATIONS**

**Nur Seda COŞKUN**

**Master of Science, Department of Biology**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Banu Şebnem ÖNDER**

**September 2020, 118 pages**

Clines that are seen in allele frequency and quantitative characters are accepted as evidence of adaptive evolution. Studying the clinal variations is the key of understanding local adaptation. The high adaptation ability of cosmopolitan species enables them to be colonized in different climatic and geographical locations. Latitudinal clines that are seen in cosmopolitan species which spread over wider range of habitats put these species at the center of adaptive evolution studies. *Drosophila simulans*, which is a cosmopolitan species, is not as popular as *Drosophila melanogaster* for local adaptation studies, therefore knowledge about the adaptation mechanisms of this species is limited. There are different theories about how *D. simulans* overwintering. In this thesis, populations that were collected from different latitudes - Kampala, Haifa, Hatay, Ankara and Napoli - were studied in order to understand winter adaptation. For this purpose, we examined the frequency of reproductive diapause, chill coma recovery time and dry body weight characters which were associated with overwintering and the "*Insulin like receptor*" (*InR*) gene that was able to associated with these characters in *D. melanogaster*. Previous studies also showed clinal variation in these characters and overwintering in *D. melanogaster*. According to the results, populations differentiated in terms of

phenotypic characters and *InR* locus, and inter-population variation was found to be related with latitude. In addition, we showed that *D. simulans* is under the same selection pressure for two characters in different geographical regions; and these results provide strong evidence for parallel clines for the first time for this species. Results shows that these characters and the *InR* locus may play a role in the local adaptation of the *D. simulans* populations for overwintering in their local environment, and thus our study supports the theory that the populations can overwinter in their local region without migration.

**Keywords:** *Drosophila simulans*, local adaptation, latitudinal cline, reproductive diapause, chill coma recovery time, dry body mass, *InR*.

## TEŞEKKÜR

Bu tezin var olmasını sağlayan tez danışmanım değerli bilim insanı Dr. Öğr. Üyesi Banu Şebnem ÖNDER'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Hayallerimi gerçekleştirmem için bana şans ve cesaret verdi. Akademik olarak destekleyip yol gösterdi ve bu tezin yazılmasını için maddi ve manevi katkılarını hiçbir zaman esirgemedi. Her şeyden öte içinde yaşadığımız cinsiyetçi kodlar tarafından yönetilen dünyamızda, çocuk sahibi bir KADIN olarak neler yapılabileceği ile ilgili mükemmel bir model oldu.

Bana her zaman inanıp cesaret veren, ne zaman yardıma ihtiyaç duysam hiç sıkılmadan isteyebilme rahatlığını sağlayan çok sevgili değerli bilim insanı Prof. Dr. Utku PERKTAŞ'a çok teşekkür ederim.

Çalışma arkadaşlığından çok bir aileye dönüştüğümüz laboratuvarımızda, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, stres altında çalışırken sahip olduğum muhteşem huysuzluğuma ve sürekli stres altında çalışmamıza rağmen yanımda olan çok sevgili arkadaşlarım; Cansu Fidan AKSOY, Ekin DEMİR, Şenel Selin ŞENKAL, Ezgi ÇOBANOĞLU ve Doğuş CAN'a sonsuz teşekkürler. Lisans öğrencisi arkadaşlarımdan, ihtiyaç duyduğum her an hazır bulunan; Esin DURAL, Yaren SOYDAN ve Mine KAYA'ya yardımları ve arkadaşlıkları için teşekkür ederim.

İçinde bulunduğum koşullarla baş etmek tek başıma imkansız olduğunda, hiç tereddüt etmeden yardıma koşan sevgili kayınvalidem Mutlu COŞKUN'a çok teşekkür ederim. Bu tezin yazılmasının bu kadar gecikmesi ona duyduğum sevgi yüzünden olsa da bugün yazılmış olması yine ona duyduğum sevgi ve güven sayesinde olan, sevgilim, hayat arkadaşım Ramiz COŞKUN'a çok ama çok teşekkür ederim. Bana benden bile çok inanıp, sahip olduğum potansiyeli bir süper kahraman gücünde gören sevgili eşim yanımda olmasaydı bu noktada olamazdım.

On yıl sonra bu tezi yazmak için bana cesaret ve ilham veren, ona duyduğum sevgi ve onun için nasıl bir anne olmak istediğimdi. Doğduğu günden itibaren her gün daha iyi bir insan olmam için bana ilham veren, güzeller güzeli kızım Ayşegül COŞKUN'a dünyalar kadar çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
<b>1.GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİ .....</b>	<b>4</b>
2.1. Kozmopolit <i>Drosophila</i> 'da Çeşitlilik, Adaptasyon ve Klin .....	4
2.2. <i>Drosophila melanogaster</i> ve <i>Drosophila simulans</i> .....	6
2.2.1. Biyolojisi .....	6
2.2.2. Filocoğrafya.....	8
2.2.3. Dağılım .....	11
2.2.4.Stres Toleransı .....	12
2.2.5. Genetik Varyasyon .....	12
2.3. <i>Drosophila simulans</i> 'da Kışlama .....	14
2.3.1. Reprodüktif Diyapoz .....	16
2.3.2. Soğuk Komadan Kurtulma Süresi.....	22
2.3.3. Vücut Ağırlığı.....	23
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>25</b>
3.1. Arazi Çalışmaları .....	25
3.1.1 İzodişi Soy Hatları Oluşturulması.....	29
3.1.2. Soyların Kültüre Edilmesi .....	29
3.2 Reprodüktif Diyapoz .....	30
3.2.1. Deneyde Kullanılacak Bireylerin Toplanması .....	30
3.2.2. <i>D. simulans</i> için Belirlenen Reprodüktif Diyapoz Koşulları .....	31



3.2.3. Ovaryum Diseksiyonu.....	32
3.4. Soğuk Komadan Kurtulma Süresinin (SKKS) Ölçülmesi .....	34
3.4.1. Deneyde Kullanılacak Bireylerin Toplanması .....	34
3.4.2. Soğuk Komadan Kurtulma Süresinin Ölçülmesi .....	34
3.3. Vücut Ağırlığı .....	36
3.3.1. Deneyde Kullanılacak Bireylerin Toplanması .....	36
3.3.2. Vücut Ağırlığı Ölçümünün Gerçekleştirilmesi .....	37
3.5. Moleküler Analizler .....	38
3.5.1. DNA İzolasyonu.....	38
3.4.2. <i>InR</i> Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	39
3.5. İstatiksel Analizler.....	42
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>45</b>
4.1. Diyapoz .....	45
4.2. Soğuk Komadan Kurtulma Süresi.....	48
4.2.1. Dişilerin Soğuk Komadan Kurtulma Süresi .....	50
4.2.2. Erkeklerin Soğuk Komadan Kurtulma Süresi.....	51
4.3. Kuru Vücut Ağırlığı .....	53
4.3.1. Dişilerin Kuru Vücut Ağırlığı.....	54
4.3.2. Erkeklerin Kuru Vücut Ağırlığı .....	56
4.4. <i>InR</i> Gen Bölgesi .....	57
4.4.1. <i>InR</i> Alel Dağılımı.....	57
4.4.2. <i>InR</i> Gen Bölgesi Analizi.....	61
4.4. Regresyon ve Korelasyon Analizleri.....	62
4.4.1 Regresyon Analizi.....	63
4.4.2 Korelasyon Analizi .....	65
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>68</b>
<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>77</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2. 1.</b> <i>D. simulans</i> 'a ait yayılım haritası. İlgili bilgiler <a href="http://www.taxodros.uzh.ch">http://www.taxodros.uzh.ch</a> sitesinden alınmıştır.....	6
<b>Şekil 2. 2.</b> <i>D. simulans</i> (a) ve <i>D. melanogaster</i> (b-i) dişilerine ait abdomen görüntüleri [59'dan alınmıştır].....	7
<b>Şekil 2. 3.</b> <i>D. melanogaster</i> (1) ve <i>D. simulans</i> (2) genital ark yapısı. Genital arkın posterior kısmı "P" ve tarak yapısı ise "C" sembolü ile gösterilmiştir [60'dan alınmıştır]. .....	8
<b>Şekil 2. 4.</b> <i>Melanogaster</i> alt grubuna ait türleri gösteren filogenetik ağaç [69'dan alınmıştır].....	10
<b>Şekil 2. 5.</b> Böceklerde dormansinin sınıflandırması [108]. ....	17
<b>Şekil 2. 6.</b> <i>Drosophila</i> ovaryumlarında yumurta gelişimi ve diyapoz halindeyken duraklaması: [A] pupadan yeni çıkmış ve çiftleşmemiş bir dişide, yumurta gelişiminin henüz başlamadığı ovaryum. [B] eşeysel olgunluğa erişmiş, gelişmiş yumurtalara sahip ovaryum. [C] reproduktif diyapozda girmiş, yumurta gelişiminin tamamen durduğu ovaryum. [D] reproduktif diyapozdan çıkmış, yeniden yumurta üretiminin başladığı, iyileşme dönemindeki ovaryum [20'den alınmıştır] .....	18
<b>Şekil 2. 7.</b> <i>Drosophila</i> 'da diyapoz halindeki erginin abdomen hacminin gösterimi: [A] pupadan yeni çıkmış çiftleşmemiş bir dişi, [B] eşeysel olgunluğa erişmiş bir dişi, [C] diyapoz koşulları altında tutulmuş bir dişi, [D] reproduktif diyapozdan çıkmış, iyileşme döneminde bir dişi [20'den alınmıştır].....	19
<b>Şekil 2. 8.</b> Reproduktif diyapoz karakterinin hormonal kontrolü [134'den değiştirilerek alınmıştır].....	21
<b>Şekil 2. 9.</b> <i>D. melanogaster</i> 'in Kuzey Amerika, Türkiye ve Rusya populasyonlarında gözlenen InR indel polimorfizminin yaygın üç alelinin frekanslarının gösterimi [12'den değiştirilerek alınmıştır].....	22
<b>Şekil 3. 1.</b> Populasyonların toplandığı bölgeler. ....	27
<b>Şekil 3. 2.</b> <i>D. simulans</i> ve <i>D. melanogaster</i> dişi bireylerinin abdomenin son tergumundaki pigmentasyon farklılığı [146'dan alınmıştır].....	28
<b>Şekil 3. 3.</b> <i>D. simulans</i> erkek bireylerinde genital ark yapısı ve <i>D. melanogaster</i> bireylerinden farklılığı [147'den alınmıştır].....	29

<b>Şekil 3. 4.</b> <i>D. simulans</i> 'ın 25°C sıcaklıkta hayat döngüsü [168'den değiştirilerek alınmıştır].....	30
<b>Şekil 3. 5.</b> Ovaryum diseksiyonu gerçekleştirilmesi. Birey abdomenin anterior kısmından sıkıca tutulur. Pens ya da diseksiyon iğnesi yardımıyla abdomenin posterior ucundan tutulup nazikçe çekilir ve üreme organları vücut boşluğundan dışarı çekilir. Ovaryumların dışarı çıkmaması durumunda abdomene nazikçe bastırılarak tüm ovaryumların dışarı çıkarılması sağlanır.....	32
<b>Şekil 3. 6.</b> King'in belirlemiş <i>Drosophila</i> yumurtalarının gelişim aşamaları [150'den alınmıştır].....	33
<b>Şekil 3. 7.</b> Ovaryumların sınıflandırılması; A. diyapozda değil, B. arada ve C. diyapozda [20,151'den alınmıştır].....	34
<b>Şekil 3. 8.</b> Deneye alınan ergin bireylere soğuk uygulaması için kullanılan düzenek.	35
<b>Şekil 3. 9.</b> Soğuk komasından kurtulma sürelerini gözlemlemek için soğuk komasına giren bireylerin petri kaplarına aktarılması.....	35
<b>Şekil 3. 10.</b> Solda soğuk komasına girmiş baygın bir ergin, sağda ise soğuk komasından kurtularak 6 bacak üzerinde duran ergin <i>Drosophila</i> [152'den alınmıştır]. .....	36
<b>Şekil 3. 11.</b> Vücut ağırlığı ölçümleri düzeneği <b>a.</b> Bir soya ait bireylerin tartım için hazırlanması. <b>b.</b> Her bir tüpe tek bir bireyin yerleştirilmesi. ....	37
<b>Şekil 3. 12.</b> Vücut ağırlığı ölçümleri. <b>a.</b> Bireylerin transfer edilişi <b>b.</b> Bireylerin tartıya yerleştirilmesi <b>c.</b> Bireylerin ağırlıklarının ölçümü.....	38
<b>Şekil 3. 13.</b> Sarı ile işaretlenmiş primerlerin arasındaki yaklaşık 250 bç'lik bölge çoğaltılmıştır. ....	39
<b>Şekil 3. 14.</b> InR gen bölgesine ait PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.....	41
<b>Şekil 3. 15.</b> InR gen bölgesine ait sekans sonuçlarının kromatogram görüntüsü.....	41
<b>Şekil 3. 16.</b> InR gen bölgesine ait sekans sonuçlarının hizalanması.....	42
<b>Şekil 4. 1.</b> Populasyonların ortalama diyapoz frekansı $\pm$ Standart hata.....	46
<b>Şekil 4. 2.</b> Diyapoz frekanslarının populasyon dağılım ve yoğunluklarının viyolonsel grafiği.....	47
<b>Şekil 4. 3.</b> Ln tabanında dönüştürülmüş soğuk komasından kurtulma süresi (SKKS) verilerinin dağılımı. ....	49

<b>Şekil 4. 4.</b> SKKS'lerinin populasyon dağılım ve yoğunluklarının eşey ayrı viyolonsel grafiği. y eksenini salise olarak SKKS'ni vermektedir. Mor dişi, sarı erkeklere ait dağılımları göstermektedir. ....	50
<b>Şekil 4. 5.</b> Populasyonlara ait tüm soy hatlarının dişilerinin ortalama soğuk komasından kurtulma süreleri. Populasyonların Tukey <i>post-hoc</i> testi ile yapılan ikili karşılaştırma sonuçları x ekseninin altında verilmektedir. *: $p<0,05$ , ***: $p<0.001$ . ....	51
<b>Şekil 4. 6.</b> Populasyonlara ait tüm soy hatlarının erkeklerinin ortalama soğuk komasından kurtulma süreleri. Populasyonların Tukey <i>post-hoc</i> testi ile yapılan ikili karşılaştırma sonuçları x ekseninin altında verilmektedir. **: $p<0,01$ , ***: $p<0.001$ ....	52
<b>Şekil 4. 7.</b> KVA verilerinin populasyon dağılımlarının ve yoğunluğunun eşey ayrı viyolonsel grafiği. KVA mg cinsinden gösterilmektedir. Mor dişi, sarı erkeklere ait dağılımları göstermektedir. ....	54
<b>Şekil 4. 8.</b> Populasyonlara ait tüm soy hatlarının dişilerinin ortalama kuru vücut ağırlığı. Populasyonların Tukey <i>post-hoc</i> testi ile yapılan ikili karşılaştırma sonuçları x ekseninin altında verilmektedir. **: $p<0,01$ , ***: $p<0.001$ . ....	55
<b>Şekil 4. 9.</b> Populasyonlara ait tüm soy hatlarının erkeklerinin ortalama kuru vücut ağırlığı. Populasyonların Tukey <i>post-hoc</i> testi ile yapılan ikili karşılaştırma sonuçları x ekseninin altında verilmektedir. ***: $p<0.001$ . ....	56
<b>Şekil 4. 10.</b> Amplifiye edilen <i>InR</i> gen bölgesinin polimorfizm gösteren bölgeleri. <b>a.</b> Kampala populasyonuna ait soy hatları, <b>b.</b> Hayfa populasyonuna ait soy hatları, <b>c.</b> Hatay populasyonuna ait soy hatları, <b>d.</b> Ankara populasyonuna ait soy hatları, <b>e.</b> Napoli populasyonuna ait soy hatları.....	58
<b>Şekil 4. 11.</b> <i>InR</i> gen bölgesinin populasyonlara göre alel dağılımı.....	60
<b>Şekil 4. 12.</b> Fenotipik veriler ile enlem arasındaki regresyon eğrileri. <b>a.</b> KVA verilerinin enlem ile doğrusal olmayan ilişkisinin kübik regresyon eğrisi ile gösterimi <b>b.</b> SKKS verilerinin enlem ile doğrusal olmayan ilişkisinin kübik regresyon eğrisi ile gösterimi.	64

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3. 1.</b> Kullanılan populasyonların toplandıkları coğrafi bölgelerin çevresel koşullarını tanımlayan iklimsel ve coğrafi parametreler. İklimsel parametreler populasyonların toplandığı 2018 yılına ait ortalama değerlerdir. Veriler <a href="https://customweather.com/">https://customweather.com/</a> adresinden alınmıştır. ....	25
<b>Çizelge 3. 2.</b> 50 µl PZR çözeltisi içeriği ve miktarları. ....	40
<b>Çizelge 4. 1.</b> Populasyonlara ait ortalama diyapoz frekanslarına ait tanımlayıcı istatistikler.....	45
<b>Çizelge 4. 2.</b> Bireylerin 28 gün sonunda hayatta kalım istatistikleri.....	47
<b>Çizelge 4. 3.</b> Populasyonların ortalama soğuk komasından kurtulma sürelerine ait tanımlayıcı istatistikler (SKKS'ler salise olarak verilmiştir). ....	48
<b>Çizelge 4. 4.</b> Populasyonların ortalama kuru vücut ağırlığına ait tanımlayıcı istatistikler. ....	53
<b>Çizelge 4. 5.</b> <i>InR</i> gen bölgesine ait analiz sonuçları. ....	61
<b>Çizelge 4. 6.</b> <i>InR</i> gen bölgesi üzerinde bulunan indel polimorfizmine ait analiz sonuçları.....	61
<b>Çizelge 4. 7.</b> Populasyonlar arası $F_{ST}$ değerleri. ....	62
<b>Çizelge 4. 8.</b> Populasyonların toplandıkları lokasyonlara ait çevresel değişkenlerle ve elde edilen bulguların Pearson korelasyon katsayıları (üst matris) ve anlamlılık dereceleri (alt matris).....	67

## SİMGELER VE KISALTMALAR

InR	İnsulin like receptor gene (İnsülin benzeri reseptör geni)
SKKS	Soğuk komasından kurtulma süresi
KVA	Kuru vücut ağırlığı
DF	Diyapoz frekansı
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
İndel	İnsersiyon-delesyon polimorfizmi
F <sub>ST</sub>	Sabitlenme Endeksi

## 1.GİRİŞ

Üzerinde yaşadığımız dünya değişkendir ve heterojen çevre koşullarına popülasyonların nasıl tepkiler verdiklerini anlamak evrim çalışmalarının temelini oluşturur. *D. simulans* sibling türü olan *D. melanogaster* gibi dünya üzerinde geniş yayılım gösteren kozmopolit bir türdür [1]. Tropik Afrika kökenli bu iki tür, yaklaşık 2,5 milyon yıl önce ortak bir ataya sahiptir [2,3]. Kozmopolit türler atasal köken aldıkları çevreden uzaklaşıp yayılmaya başladıklarında, karşılaştıkları mekânsal ve zamansal değişkenler, türlerin adaptasyon stratejisini belirler. *D. simulans* ve *D. melanogaster*'in güçlü adaptasyon yetenekleri karşılaştıkları farklı çevresel koşullara uyum sağlamalarını ve böylece geniş bir habitata yayılmalarına olanak sağlamıştır [1].

Birbirinden uzak coğrafyalarda, bir türe ait popülasyonların seçici etkenlere karşı kademeli olarak değişen farklı fenotipik ve genetik örüntüler oluşturmaları klin olarak adlandırılır [4,5]. Bu nedenle geniş coğrafyalara yayılmış canlılarda enlemsel klinlere rastlanabilir. *D. melanogaster*'in hızlı uyum yeteneği ile içinde bulunduğu koşullara hızla adapte olduğu ve pek çok fenotipik karakter için güçlü enlemsel klin gösterdiği görülmüştür [5–12]. Öte yandan benzer habitatları paylaşan *D. simulans* ile yapılan çalışmalarda, seçilen karakterler açısından incelendiğinde farklı popülasyonların cevaplarının enlem ile ilişkisinin görece düşük olduğu gözlenmiştir [1,10,13–18]. Yüksek enlemlerde kış mevsimi, popülasyonlar üzerinde sınıyıcı koşullar yaratarak seçim baskısı oluşturur. Enlem ile ilişkisi tam olarak belirlenememiş kozmopolit *D. simulans* popülasyonlarının ılıman kuşakta nasıl bir kışlama adaptasyonuna sahip olduğu henüz bilinmemektedir.

Bazı türler kendileri için uygun olan iklimsel koşulları sağlayan mevsimlerde habitat sınırlarına yayılır ve ürer, koşulları kendisi için uygun olmayan mevsimlerde ise dormansi durumuna girip üremeyi durdurup ve tasarruf ettikleri enerjiyi, stres toleranslarını güçlendirmek için harcayabilirler [19]. Reprodüktif diyapoz, ılıman kuşakta bulunan bazı *Drosophila* türlerinin sıcaklığın düşmesi ve gün ışığı azalmasıyla birlikte, hayatta kalmak için gösterdiği adaptif bir yaşam öyküsü karakteridir [20,21]. *D. melanogaster*, kış koşullarında reprodüktif diyapoza girmektedir ve diyapozun fizyolojik mekanizması hakkında detaylı bilgi mevcuttur [9,20–23]. Öte yandan *D. simulans* için bu karakterin varlığı çok yakın zamana dek yapılan çalışmalara kadar fark edilmemiştir [19,21].



Canlıların soğuk toleransı mekanizmalarını çözmek kışlama adaptasyonlarını anlamak için önemli bir anahtardır [24]. *Drosophila* ile yapılan çalışmaları, düşük sıcaklıklara maruz bırakılan bireylerin, kısa süreli bir soğuk komasına girdiği görülmüştür [13,25]. Koma halindeki bireyler çevresel sıcaklık tekrar tercih edilen aralığa döndüğünde ise kısa bir süre sonra komadan kurtulur [13,25,26]. 1998 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, soğuk komasından kurtulma süresi için bir endeks oluşturulmuş ve bu endeksin soğuk toleransını ölçmek için ideal bir metot olduğu gösterilmiştir [25].

Kış koşulları, canlıların termal sınırlarını zorladığı gibi açlık toleransları için de seçici bir etkidir. Besin kaynaklarının olmadığı aylarca sürececek bir dönemde, canlılar hem soğuk koşullarda hayatta kalmak hem de açlık ve dolayısıyla susuzluk ile başa çıkmak zorundadır. *Drosophila* ile yapılmış çalışmalar, depolanan yağ miktarının açlık ve susuzluk toleransı ile pozitif bir ilişki içinde olduğunu göstermiştir [27–30]. Ayrıca farklı *Drosophila* türleri ile yapılan çalışmalarda, açlık toleransı ve vücut büyüklüğü gibi kışlama becerisi üzerine etkili özelliklerin enlemsel klin gösterdiğini bulunmuştur [7,30]. *Insulin like receptor (InR)* geni ile yapılan çalışmaların sonuçları üreme, vücut büyüklüğü, vücut yağ oranı, ömür uzunluğu ve stres toleransı karakterlerinin gendeki polimorfizimlerden doğrudan etkilendiğini göstermektedir [16,21]. *InR* geni *D. simulans* ve *D. melanogaster*'de ortolog olan ve *D. melanogaster*'de reproduktif diyapoz karakteri için öne çıkan bir genidir [12,16,20,31,32]. *D. melanogaster* ile yapılan çalışmalar Kuzey Amerika ve Doğu Avrupa'da *InR* geninin enlem ile güçlü ilişki içerisinde olduğunu göstermektedir [12,16,32]. Gen polimorfizmine ait gözlenen bu enlemsel klin *InR* genini lokal adaptasyon ile ilişkili güçlü bir aday gen yapmaktadır. Ancak, bu genin *D. simulans*'da lokal adaptasyon ile ilişkisi tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada farklı enlemlerden toplanmış *D. simulans* popülasyonlarının, yeni çevrelere adaptasyonda önemli bir karakter olan kışlama stratejileri araştırılmıştır. Afrika ve Avrasya kıtalarını kapsayan örneklem aralığını temsil eden Kampala, Hayfa, Hatay, Ankara ve Napoli popülasyonlarının her birinden yaklaşık 15 soy hattı seçilmiş ve toplamda 75 soy reproduktif diyapoz, soğuk komasından kurtulma süresi ve kuru vücut ağırlığı karakterleri çalışılmıştır. Seçilen fenotipik karakterler için *D. melanogaster*'de aday gösterilen ve alel frekansının enlemsel kline sahip olduğu bilinen, insülin-benzeri reseptör (*InR*) geninin bu popülasyonlardaki polimorfizimleri 77 soy hattında incelenmiş, alel frekansları tespit edilmiş ve enlemsel bir klinin varlığı araştırılmıştır. Fenotipik karakterlerinin ve *InR* geninin birbirleri ile ne oranda ilişki

gösterdiği açıklanmaya çalışılmış, ayrıca çevresel değişkenlerin bu karakterler üzerinde seçilimsel bir baskı oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, diyapoz frekansı populasyonlar arasında farklılaşarak, *D. simulans*'ın kışlama örüntüsü içinde önemli bir etkisi olduğu görülmüş, enlem ile de zayıf bir ilişki gözlenmiştir. Soğuk komasından kurtulma süresi karakteri, dişi bireylerde enlem ile istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki göstermiştir. Kuru vücut ağırlığı karakteri her iki eşeyde de enlem ile istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki göstermiştir. Soğuk komasından kurtulma süresi ve kuru vücut ağırlığı ile ilgili elde ettiğimiz veriler Avustralya kıtasındaki gerçekleştirilen ve 2008 yılında Arthur ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışma paralel klin göstermiştir [56]. *InR* gen bölgesi için dördü yaygın toplam dokuz alel belirlenmiştir. Yaygın görülen alellerden biri, enlem ile istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki göstermiştir. Ayrıca alel çeşitliliğinin enlem ile birlikte arttığı görülmüştür. *InR* gen bölgesi içinde tekrarlayan tek nükleotid polimorfizmleri incelendiğinde, 5'si enlem, 5'i iklimsel parametreler ile anlamlı bir ilişki içinde olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamız *InR* geninin *D. simulans* populasyonlarında polimorfik bir yapıda olup enlem ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bulgularımızın bütünü birlikte değerlendirildiğinde *D. simulans* populasyonlarında seçilen karakterlerin ve gen bölgesinin lokal adaptasyon ile ilişkili olduğu görülmüştür.

## 2.GENEL BİLGİ

### 2.1. Kozmopolit *Drosophila*'da Çeşitlilik, Adaptasyon ve Klin

Canlılar yaşadıkları çevreye uyum gösterme başarısına sahiptir. Dünya üzerinde birbirinden çok farklı çevre koşullarına (yüksek basınç, yüksek sıcaklık, düşük oksijen, düşük sıcaklık, kuraklık, yüksek tuzluluk, vb.) uyum sağlanmış ve hemen her noktayı kolonize etmiş canlılar vardır [33–36]. Uyum sağlamak için, her tür farklı yollar izler. Örneğin, *Drosophila sechellia*, *Crocus sieheanus* gibi endemik türler özel bir çevresel koşula adapte olup, sadece uyum başarılarının yüksek olduğu bu alanlarda yayılım gösterirken, *Drosophila melanogaster*, *Taraxacum officinale* gibi kozmopolit türler dünya üzerindeki farklı koşullara adapte olmayı ve hayatta kalmayı başarmışlardır [37–39]. Canlıların karşılaştığı çevresel farklılıklar; coğrafyaya bağlı olup o lokasyon için sabit kalabilir ya da zamansal olup mevsimler arasında değişkenlik gösterebilir. Türün adaptasyon stratejisini evrimsel süreçte karşılaştığı çevresel değişkenler ve bu değişkenlere karşı geliştirmiş oldukları cevaplar belirler.

Canlıların evrimsel süreçte geliştirdikleri uyum başarısını anlayabilmek için, kozmopolit canlı türlerinin adapte oldukları lokasyonlarda seçim baskısı yaratan koşullara karşı geliştirdikleri cevapları araştırmak, uzun yıllardır bilim insanlarının kullandığı bir yöntem olmuştur [40–44]. Farklı taksonlara ait olsalar dahi, kozmopolit türlerin ortak özelliği, buldukları çevresel koşullara daha hızlı adapte olabilmeye yetenekleridir. Kozmopolit olan türlerde adaptasyon mekanizmaları çok yönlü olup birbirine çok yakın türlerde dahi farklılıklar gösterebilirler [1,10,14,15,46,47].

Aynı türün birbirinden fiziken uzak coğrafyalarda hayatta kalma başarısı göstermesi, türe ait popülasyonların zamanla gen akışları azaldığında genetik olarak farklılaşmalarına neden olur. Birbirinden uzak coğrafyalarda bir türe ait popülasyonlar; farklı iklim koşulları, farklı predatörler, farklı besin kaynakları gibi seçici etkenlere karşı, kademeli olarak değişen farklı fenotipik ve genetik örüntüler oluştururlar, bu durum **klin** olarak adlandırılır [4,5]. Geniş coğrafyalara yayılmış canlılarda enlemsel klinler yaygın olarak görülürken, kozmopolit türlere ait farklı fenotipik özelliklerin ve genetik çeşitliliğin incelendiği pek çok çalışma vardır [8–10,40,46,48,49]. Kozmopolit yayılmış türlerle yapılan araştırmalarda, aynı türün farklı coğrafi bölgelerde aynı fenotipik ya da genetik özellik için paralel klinler gösterdikleri bulunmuştur [16,50–52]. Bu durum

organizmaların benzer seçim baskılarına, coğrafyadan bağımsız olarak benzer cevaplar oluşturduğu ile ilgili kanıtlar sunmaktadır. Enlemsel klinler lokal adaptasyonun ve dolayısıyla doğal seçilimin işleyişini anlamak için önemli anahtarlardır.

*Drosophila* cinsi içinde kozmopolit olarak yayılım gösteren birden fazla tür vardır. Bunlar arasında en bilinen ve yüzyılı aşkın süredir üzerine çalışılmış olan *D. melanogaster*'in, dünya üzerinde nasıl yayılım gösterdiği hakkından birbirinden farklı hipotezler bulunur. Ortak olan görüş, *D. melanogaster*'in insana bağlı olarak yayılım gösterdiği ve dünya üzerinde tamamen donmuş ya da çöl olan bölgeler dışında her bölgeye yayılarak olağanüstü bir adaptasyon yeteneği gösterdiğidir [2,53]. Thomas Hunt Morgan tarafından 1908 yılında kullanışlı bir model organizma olduğu fark edildiğinden beri, üzerinde sayısız çalışma yapılmış, populasyon genetiği, enlemsel klin ve adaptasyon çalışmaları için tercih edilen bir organizma olmuştur [1,10,14,16]. *D. melanogaster* gibi tüm dünya üzerinde hemen her bölgede yayılım gösteren (Şekil 2.1.), en yakın sibling türü olan ve yüzyıllık bir süreçte laboratuvarında kullanılan *Drosophila simulans* populasyon genetiği ve adaptasyon çalışmaları için siblingi kadar popüler bir organizma olmamıştır ve bu nedenle yapılan çalışma sayısı kısıtlıdır. Yapılan sınırlı sayıdaki klin çalışmalarında ise, *D. simulans*'ın klin gösterme frekansının *D. melanogaster*'e göre çok daha zayıf olduğu görülmüştür [10,14,15,18,54–56]. Bu durum *D. simulans*'ın lokal adaptasyon için izlediği yolun *D. melanogaster*'den farklı olduğunu düşündürmektedir. *D. simulans*, *D. melanogaster*'den farklı olarak, hızlı bir genetik uyum yeteneği olmaksızın, yüksek fenotipik plastisite yeteneği ile farklı çevresel koşullarda hayatta kalmayı başarıyor olabilir mi [55,57]? Ilıman bölgelerden toplanan doğal populasyonlarla gerçekleştirilen karşılaştırmalı çalışmalarda, vücut büyüklüğünün, düşük test sıcaklıklarında *D. simulans*'ın *D. melanogaster*'den daha fazla olduğu, standart sıcaklıkta ise durumun tersine döndüğü görülmüştür. Oysa çalışma tropik bölgelerden toplanan populasyonlarda gerçekleştirildiğinde sonuçlar aynı derece anlamlı bulunmamıştır [55]. Bu sonuçlar *D. simulans*'ta fenotipik plastisitenin adaptif olup olmadığını düşündürmektedir.

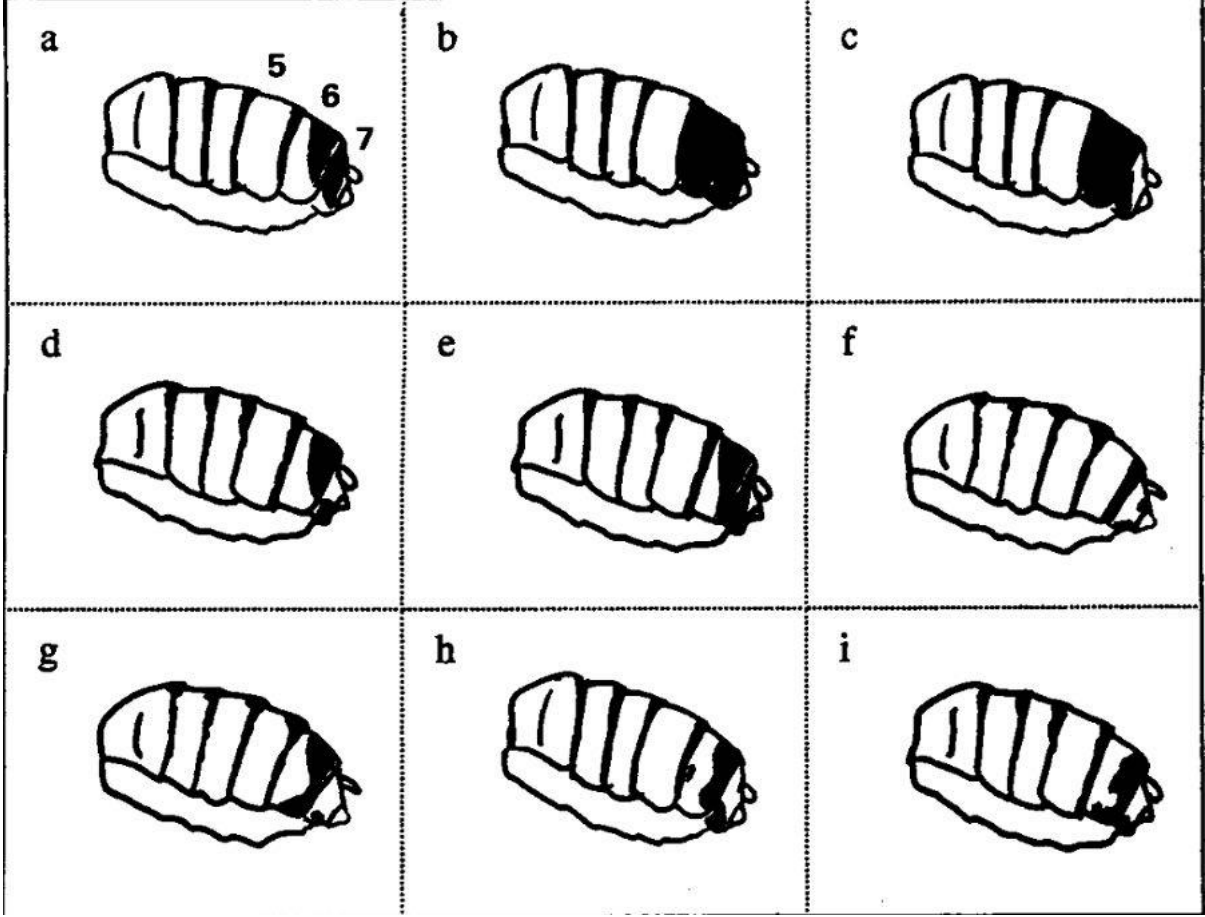


**Şekil 2. 1.** *D. simulans*'a ait yayılım haritası. İlgili bilgiler <http://www.taxodros.uzh.ch> sitesinden alınmıştır.

## **2.2. *Drosophila melanogaster* ve *Drosophila simulans***

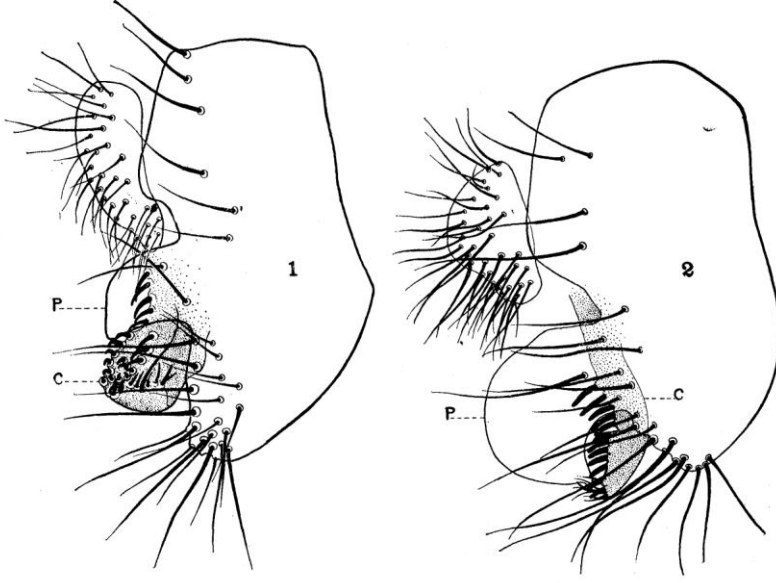
### **2.2.1. Biyolojisi**

*D. simulans*, *D. melanogaster*'in bilinen en yakın siblingi olan türdür. Yaklaşık 2 - 3 milyon yıl öncesine kadar ortak bir ata paylaşılan bu iki tür, çıplak gözle morfolojik olarak birbirinden ayırt edilemeyecek kadar benzerdir [1,38,58]. Mikroskop yardımı ile dişilerde abdomendeki altıncı tergitin lateralde gösterdiği pigmentasyon farkına bakılarak (Şekil 2.2.) tür tayini yapılabilir. Doğal populasyonlarda *D. simulans* dişilerinin abdomen pigmentasyonları monomorfik bir yapı gösterirken, *D. melanogaster* dişilerinde pigmentasyon polimorfiktir [59].



**Şekil 2. 2.** *D. simulans* (a) ve *D. melanogaster* (b-i) dişilerine ait abdomen görüntüleri [59'dan alınmıştır].

*D. simulans* için canlı olarak tür tayini yapmanın en sağlıklı yöntemi erkek bireylerde mümkün olmaktadır. *D. simulans*'ta görülen genital ark yapısı (Şekil 2.3.) posterior kısımda genişler ve mikroskop altında orak biçimli, tarak yapısı küçük olan kehribar renkli yapı kolayca göze çarpar. *D. melanogaster*'de ise genital ark posterior kısımda güdük, tarak yapısı ise daha büyüktür [60]. Tür tayini yapmak için yumurta yapısını incelemek de bir yoldur. *D. simulans* yumurtaları, anterior kısmında uçları bir noktaya sivrilen ve *D. melanogaster*'den daha uzun 2 filamente sahiptir [60].



**Şekil 2. 3.** *D. melanogaster* (1) ve *D. simulans* (2) genital ark yapısı. Genital arkın posterior kısmı “P” ve tarak yapısı ise “C” sembolü ile gösterilmiştir [60’dan alınmıştır].

*D. simulans* erkeği ve *D. melanogaster* dişi nadir de olsa hibritler oluşturabilir, ancak oluşan hibritlerin erkekleri embriyo ve pupa aşamasında ölürken hayatta kalabilenler kısır dişilerdir. Tersi bir çiftleşme sonucu *D. simulans* dişi ve *D. melanogaster* erkeği hibrit oluşturduklarında ise, bu kez dişiler larva ve pupa aşamasında ölürken kısır erkekler hayatta kalabilir [60,61].

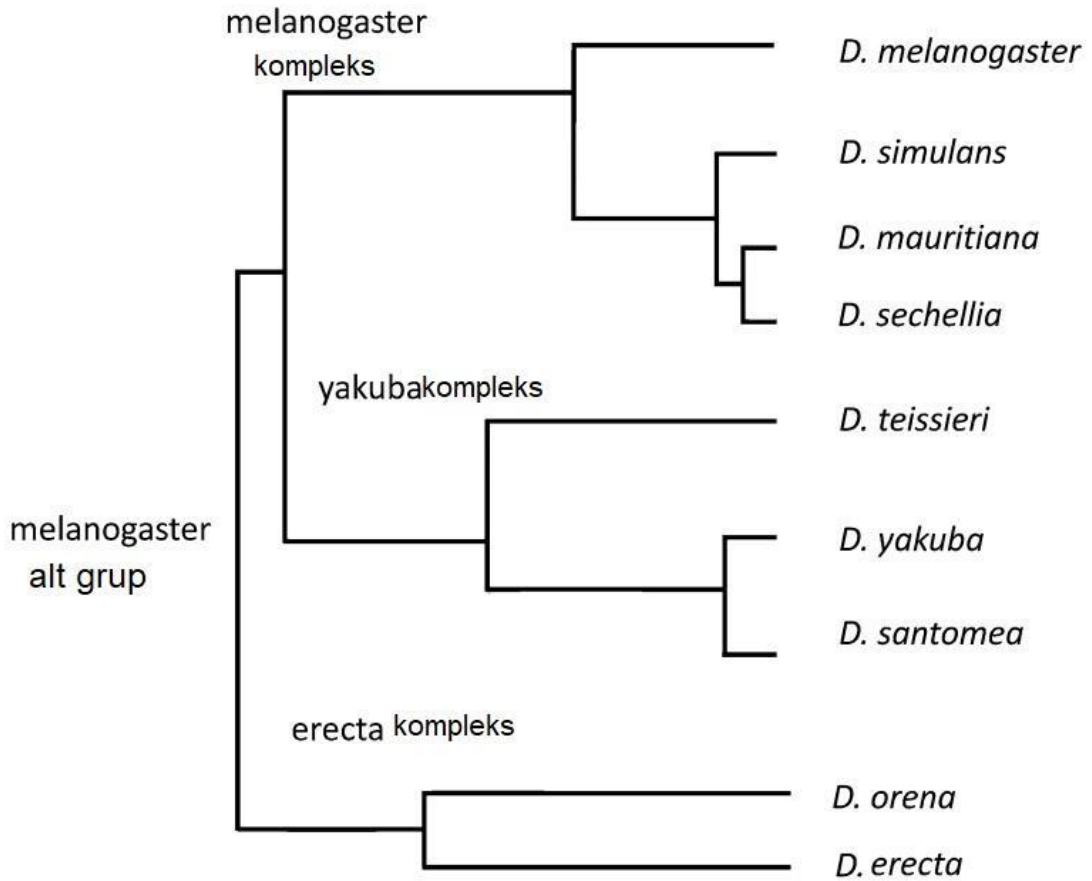
*D. simulans*’ın ovariol sayısı *D. melanogaster*’den az olmakla birlikte embriyonik gelişim süresi hızlıdır [62]. Yumurtadan ergine gelişim süresi ise iki tür için neredeyse aynıdır [63].

### 2.2.2. Filocoğrafya

Melanogaster alt grubu (Şekil 2.4.) içinde hem tropik hem de ılıman iklimlere adaptasyon sağlamış iki kozmopolit tür bulunur; *D. simulans* ve *D. melanogaster*. *D. simulans* ve *D. melanogaster*’in nasıl türleştiği ve Antartika dışında kıtaların tümünü nasıl kolonize ettikleri kesin olmamakla birlikte yaklaşık 2-3 milyon yıl öncesine kadar ortak bir ata paylaştıkları bilinir [2,3,17]. Çalışmalar *D. melanogaster* ve *D. simulans*’in simpatrik bir şekilde Sahra Altı Doğu Afrika’da türleşmiş olduğunu göstermiştir [2,3,53]. Yapılan bazı çalışmalar *D. simulans*’in atasal coğrafyasının Madagaskar adası olduğunu göstermiştir [3,18,64,65]. Her iki türün de atasal bölgeleri olan Afrika’da bazı bölgelerde çok nadir bulunmaları, kıtadan dışarı nasıl yayıldıkları ile ilgili bir fikir

verebilir. Uzun yıllardır Afrika'da sürdürülen örneklem çalışmalarında *D. simulans*'ın Batı Afrika'da neredeyse hiç bulunmaması dikkat çekicidir [3,38]. Ticaretin yoğun olduğu liman bölgeleri dışında hemen hiçbir bölgede *D. simulans*'a rastlanmaz ve karşılaşılan birey sayısının çok düşük olması bu bölgede yerleşik bir populasyon bulunmadığına işaret eder. Doğada siblingine göre insana bağımlı davranışları daha az olan *D. simulans*, batı Afrika liman bölgelerinde sadece yerleşim alanlarında bulunur [3,38]. Ters durum, Hint okyanusunun Doğu Afrika kıyısında *D. melanogaster* için geçerlidir. Bu bölgede *D. melanogaster* populasyonları sadece insanların yoğun olduğu yerleşim bölgelerinde bulunur ve populasyon büyüklükleri oldukça düşüktür [3,38]. *D. melanogaster*'in son paleolitik dönemde henüz Sahra Çölü coğrafi bariyer oluşturacak boyutlara ulaşmadan, yaklaşık 10-15 bin yıl önce, insan göçü ile birlikte Afrika kıtasından ayrılmaya başladığı ve Avrasya'ya ulaştığı tahmin edilmektedir [2,38,53,66,67]. Buna karşın güncel bir çalışma ile *D. melanogaster*'in Ön Asya'ya ulaşma tarihini yaklaşık 1.500 yıl öncesine tarihlenmektedir [68]. Avrupa populasyonlarının genetik yapısının Asya populasyonlarından çok Afrika populasyonlarına benzemesi, *D. melanogaster*'in Afrika'dan iki koldan – biri Sina Yarımadası-Anadolu üzerinden ve diğeri de kuzeybatı Afrika-İber Yarımadası üzerinden – çıktığını düşündürmektedir [2]. Amerika ve Avustralya kıtalarına varışının ise son birkaç yüzyıl içinde olduğu tahmin edilmektedir [2].





**Şekil 2. 4.** Melanogaster alt grubuna ait türleri gösteren filogenetik ağaç [69'dan alınmıştır].

*D. melanogaster*'in yayılma tarihi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmasına karşın [2,38,66–68,70], *D. simulans*'ın nasıl göç ettiği hala belirsizliğini korumaktadır. Yapılan çalışmalara göre *D. simulans*, yakın sibling türleri olan *D. mauritiana* ve *D. sechellia* ile yaklaşık 250.000 yıl öncesine kadar ortak bir ata paylaşıyordu [58]. *D. mauritiana* ve *D. sechellia* endemik ada türleridir, *D. sechellia*, *Morinda citrifolia* adı verilen toksik bir bitkiye bağımlı, insan yaşam alanlarına yaklaşmayan bir tür iken *D. mauritiana* tıpkı *D. simulans* benzeri kısmen insana bağımlı davranışlar gösterir ve bulunduğu alana fırsatçı bir şekilde yayılır [2,58]. Yapılan çalışmalar ışığında, iki büyük türleşme aşamasından geçen *D. simulans*'ın *D. melanogaster*'den yaklaşık 10 kat daha genç olduğu ve diğer kıtalara yayılmaya daha geç başladığı tahmin edilmektedir [15,38]. Yakın akraba bu iki türün yayılımı ile ilgili dikkat çekici boşluklar vardır. Her iki tür de Güneydoğu Asya ve Batı Pasifik'te ender bulunur [38]. Japonya'da 75 yıl gibi kısa bir süre öncesine dek *D. simulans*'a rastlanmazken, bugün adaların tümü *D. simulans*

tarafından kolonize edilmiş ve hatta bazı adalarda baskın tür olmayı başarmıştır [38,71].

### 2.2.3. Dağılım

Her ikisi de geniş bir yayılım gösteren bu iki türün, tahmini disperse olma zamanlamaları birbirinden farklıdır. *D. melanogaster*'in, *D. simulans*'dan çok daha önce Afrika'dan çıktığı tahmin edilmektedir [38–74].

Coğrafi olarak benzer yayılım gösterecekler de iki türün birbirinden ayrıldığı noktalar vardır. Yapılan araştırmalara göre *D. simulans* artan enlemlerde *D. melanogaster* kadar yaygın olarak bulunmaz [14,46]. Buna karşın Afrika ve Asya dağlarında yapılan örneklem çalışmalarına göre, *D. simulans*, *D. melanogaster*'e göre daha yüksek rakımları tercih etmeye eğilimlidir [38,77]. Çok yüksek irtifalarda rahatlıkla yaşadığı bilinen *D. simulans* popülasyonları, 0 – 2.500 m arasında geniş bir aralıkta bulunabilir [38,77].

İnsana bağlı olarak yayılım gösterdikleri bilinen bu iki türün, şehirleşmiş alanları paylaşımları da birbirlerinden farklıdır. *D. melanogaster*'in insana bağımlı davranışlar göstermektedir. Kalabalık şehirlerde, çöplerde yaygın olarak bulunan tür, ayrıca bina içlerine girmeye eğilimindedir. Buna karşın *D. simulans*'ın şehir içinde park ve bahçeler gibi daha doğal sayılabilecek alanları tercih etmekte, kalabalık şehirlerden ve bina içlerine girmekten kaçınmakta ve evsel atıktan çok doğal ortamında bulunan meyvelerle beslenmeyi tercih etmektedir [14,15,38,40,78,79]. Şehirlerde fermente meyve ve sebzelerin bolca bulunduğu yüksek etanol içeren çöpler, *D. melanogaster* için kaliteli bir besin kaynağı iken, siblingine göre etanol toleransı daha düşük olan *D. simulans*'ın tercih ettiği bir besin kaynağı değildir. Bu durumun, *D. simulans*'ın şehirleşmiş alanlardan uzak durmasına sebep olabileceği düşünülmektedir [14,15,18,80]. Aynı coğrafi lokasyonu kullanan iki türe ait popülasyonlar, zamansal olarak sıralı alan paylaşımı yaptıkları düşünülmektedir. Kuzey Yarı Küre'de yapılan örneklem çalışmaları *D. melanogaster* popülasyonlarına ilkbahar aylarında ortaya çıktığı, yaz aylarında popülasyonun maksimum büyüklüğüne eriştiği ve sonbahar ile birlikte küçüldüğü, *D. simulans* popülasyonlarının ise yaz aylarında örneklendiği ve popülasyonun maksimum büyüklüğüne sonbahar aylarında ulaştığı gözlenmiştir [46,78,79,81].

#### 2.2.4. Stres Toleransı

*D. simulans* ve *D. melanogaster*'in güçlü adaptasyon yetenekleri, bu iki türün karşılaştıkları çevresel koşullara uyum sağlamalarını ve böylece geniş bir habitata sahip olmalarını sağlamaktadır [1].

Birbirine çok yakın olan bu iki türe ait morfolojik, fizyolojik, ekolojik, biyocoğrafik ve genetik karşılaştırma çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, *D. simulans*'ın pek çok farklı fenotipik özelliğe ait elde edilen sonuçlarının, *D. melanogaster* kadar yüksek olmadığı bulunmuştur. Bunlar; vücut yağ oranı, vücut büyüklüğü, pigmentasyon, ovariyol sayısı, üreme kapasitesi, gelişim süresi, soğuk komasından kurtulma süresi, soğuk toleransı, açlık toleransı ve susuzluk toleransı olarak sayılabilir [10,11,13–15,46,55,82,83]. Öte yandan, farklı sıcaklıklarda gelişimini tamamlamış, *D. simulans* ve *D. melanogaster* ile yapılan rekabet ve stres toleransı çalışmalarında, düşük sıcaklık koşullarında geliştiklerinde, *D. simulans*'ın *D. melanogaster*'den daha yüksek tolerans gösterdiği bulunmuştur [77,84].

Dünya üzerinde hemen her noktaya yayılmış bu kozmopolit türlerin, ılıman bölgelerde, mevsim değişimlerine karşı geliştirdikleri adaptasyon yeteneklerinin aralarındaki sayısız benzerliğe karşın birbirinden farklı mekanizmaları olduğu düşünülmektedir [14,15,55]. Ortak ata, benzer yayılım ve niş kullanımına karşın, iki türün farklı reaksiyon normları olması söz konusu türlerde adaptasyon mekanizmalarının birbirinden farklı evrimleşmiş olabileceğini düşündürmektedir [18,55].

#### 2.2.5. Genetik Varyasyon

Tarihsel geçmişlerine bakıldığında, kozmopolit ve çok yakın akraba olan *D. simulans* ve *D. melanogaster*'in, birbirine benzer genetik yapıya sahip olması beklenebilir. Ancak yapılan araştırmaların sonuçlarına göre iki türün genetik yapısı beklenenden fazla farklılık göstermektedir.

*D. melanogaster* kromozomlarında hemen her popülasyonda yaygın olarak görülen büyük inversiyonlar taşır [86,87]. Bu inversiyonların bazıları kozmopolittir [88] bazıları klin göstermektedir [89]. Yakın zamana kadar *D. simulans*'ın hiç inversiyon taşımadığı düşünülüyordu ancak, son dönem yapılan çalışmalar siblingi gibi kozmopolit ve büyük inversiyonlara sahip olmasa da az sayıda küçük inversiyonlar taşıdığını göstermiştir [66,87,90,91]. Az sayıda inversiyona sahip olmasına karşın yapılan çalışmalara göre

*D. simulans* *D. melanogaster*'e göre daha fazla insersiyon polimorfizmi göstermektedir [92]. Öte yandan tek nükleotit polimorfizmlerinin (single nucleotide polymorphisms - SNP'ler) *D. simulans*'ta *D. melanogaster*'e göre daha düşük olduğu görülmüştür [10]. Kromozomların mikrosatellit bölgelerindeki tekrarlayan DNA dizilerinin farklı coğrafyalarda gösterdiği çeşitliliğin, *D. simulans*'ta *D. melanogaster*'e göre daha az olduğu düşünülmesine rağmen farklı populasyonlarla tekrar edilen çalışmalara göre, her iki tür için de Afrika populasyonlarındaki mikrosatellit bölgelerindeki çeşitlilik benzer bulunmuştur [14–96]. *D. simulans*'ın Avrupa populasyonlarındaki tekrarlayan dizilerin çeşitliliğinin Afrika populasyonlarından farklı olması, bu bölgelerin sanıldığı gibi nötral olmadığını ve seçilim baskısı altında olduğunu düşündürmektedir.

Transpozon elementler (TE) olarak adlandırılan “hareketli elementler”, genom içinde yer değiştirebilen, hareketli genetik birimler olarak tanımlanır [97]. *D. melanogaster*, genomunda sıkça rastlanan ve kozmopolit yayılım gösteren TE'ler taşır [74,98,99]. Yakın zamana kadar *D. simulans* genomunda tespit edilemeyen TE sayısının güncel çalışmalar ile oldukça az olduğu ve bu az sayıdaki TE'lerin populasyon içinde yayılım hızının yüksek olduğu bilinmektedir [15,99].

*D. simulans*'ın mitokondri DNA'sı (mtDNA) diğer sibling türleri olan *D. mauritiana* ve *D. sechellia*'nın mtDNA'sına *D. melanogaster*'inkinden daha çok benzerlik gösterir. *D. simulans*'ta filocoğrafi yapı üç farklı mtDNA soy hattı gösterir; kozmopolit, malagasy ve indo-pasifik haplotipleri [58,87]. *D. simulans*'ın mtDNA haplotip sayısı ve çeşitliliği *D. melanogaster*'e göre düşüktür ve bu durum mutasyon hızının siblingine göre düşük olabileceğini düşündürmektedir [14,54,87,100].

Yapılan allozim ve transkriptom çalışmalarına göre, gen ifadesi de *D. simulans*'da *D. melanogaster*'e göre daha düşüktür [17,54,87,101]. *D. melanogaster* ve *D. simulans*'ın farklı sıcaklıklardaki gen ifadelerinin karşılaştırılmasına dayanan bir çalışmaya göre ise *D. simulans*'da düşük sıcaklıkta daha fazla sayıda genin ifadesinin değiştiğini göstermiştir [17].

Çekirdek DNA çeşitliliğine bakıldığında, *D. simulans*'ta kromozomun bazı bölgelerinde *D. melanogaster*'den daha fazla polimorfizm olsa da genel olarak *D. melanogaster*'e göre daha az varyasyon göstermektedir [14,15,18,54,87]. Ancak populasyon içi çeşitlilik bakımından *D. simulans*'ın *D. melanogaster* ile benzer bir çeşitliliğe sahip olduğu ve hatta bazı durumlarda çeşitliliğin daha yüksek olduğu bilinmektedir [14]. Populasyonlar arası karşılaştırmalar yapıldığında ise *D. melanogaster*'in *D. simulans*'a göre yüksek çeşitliliğe sahip olduğu görülmektedir [15]. Bu durum *D. melanogaster*'in

bulunduğu alana hızlı uyum sağlayarak genetik olarak daha homojen populasyonlar oluşturmaya ve uzak populasyonların genetik benzerliğinin azalmasına öte yandan, *D. simulans* populasyonlarının, bulunduğu bölgede faydalı olmayan alelleri de taşımaya devam ederek populasyon içi çeşitliliğin yüksek tutulmasına ve uzak populasyonların birbirinden çok farklılaşmamasına işaret eder [10,14,15,54,55,87]. *D. simulans*'ta genetik çeşitlilik siblingi kadar yüksek olmasa da aynı koşullarda hayatta kalmayı başarabilir, bu durum tolerans aralığının daha geniş olmasıyla açıklanabilir [14,15]. Genetik çeşitliliğin genomdaki dağılımına bakıldığında ise *D. simulans*'ın X kromozomu üzerinde diğer otozomal kromozomlara göre daha yüksek oranda polimorfizm taşıdığı görülmüştür [10]. *D. simulans*'ın genetik çeşitliliği, coğrafi dağılımı bakımından incelendiğinde ise *D. melanogaster* kadar güçlü olmasa da enleme bağlı zayıf bir klin göstermektedir [10]. Genetik farklılaşmanın bir ölçüsü olan  $F_{ST}$  değerleri de karşılaştırıldığında *D. simulans*'ın populasyonlar arası değerleri, *D. melanogaster*'den belirgin ölçüde daha düşüktür [15,18].

### **2.3. *Drosophila simulans*'da Kışlama**

İlman kuşakta kış aylarında meydana gelen değişen hava koşulları, tropik kökenli olduğunu bildiğimiz kozmopolit canlıların tümü için ekolojik anlamda sınırlayıcı bir durumdur [103]. Bu durum, kış koşulları olmaksızın evrimleşmiş olan *D. simulans*'ın, ılıman kuşaklarda soğuk kış koşullarına nasıl adapte olabildiği ve hayatta kalabildiği sorusunu akla getirmektedir. Ektodermik canlıların metabolik faaliyetleri çevre sıcaklığına bağlıdır dolayısıyla termal toleranslarının sınırlarını anlamak, populasyon büyüklüklerini ve yayılışlarını anlamak için önemli bir anahtardır.

Yerleşim alanlarını, yaşam alanı olarak kolayca kullanabilen *D. melanogaster*'in, bina içlerinde, dormansi durumunda soğuk ve açlıktan korunarak kışı atlattığı bilinir [10,18,21,51,78]. Kışı olduğu yerde geçiren populasyon ilkbaharda tekrar uyanır ve sonbahara kadar varlığını devam ettirir. Yer değiştirmeyi tercih etmeyen *D. melanogaster* populasyonları buldukları alana çok başarılı ve hızlı bir şekilde uyum sağlar. Bunun sonucu olarak farklı populasyonlarla yapılan araştırmalarda *D. melanogaster*'in fenotipik ve genetik olarak klin gösterdiği ve *D. simulans*'a ait farklı populasyonlara göre daha yüksek  $F_{ST}$  değerlerine sahip olduğu bulunmuştur [10,18,103]. Bu durum da populasyonların yer değiştirmedeğini ve gen akışının küçük populasyonlar içinde devam ettiği görüşünü desteklemektedir.

*D. simulans*'ın kışlama adaptasyonu hakkında yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. Optimal laboratuvar koşullarında kültüre edilen, doğal *D. simulans* populasyonları kullanılarak yapılan soğuk toleransı testlerinin sonuçlarına göre, *D. simulans*, siblingi olan *D. melanogaster*'e göre, soğuk toleransı düşük ve yumuşak çevresel koşullarda hayatta kalma başarısı yüksek olan bir türdür [13,46,104,105]. *D. simulans* populasyonlarına yüksek enlemlerde az rastlanması, türün kış koşullarına dayanıksız olduğu ve bu nedenle sub-tropik ve ılıman iklime sahip bölgelerde yayılım gösterdiğini düşünülmektedir (Şekil 2.1).

*D. melanogaster*'in bir sığınakta ve dormansi halinde kışladığı anlaşıldığında, aynı parametreler *D. simulans* için de araştırılmıştır. Ne var ki *D. melanogaster*'in reproduktif diyapozda girdiği sıcaklıkta *D. simulans*'ın üremeye devam etmesi, *D. simulans*'ın bu adaptif cevaba sahip olmadığını düşündürmüştür [46,106]. *D. simulans*'ın ılıman bölgelerdeki populasyonlar arası gösterdiği düşük fenotipik ve genetik varyasyon, düşük stres toleransı ve yüksek enlemlerde az rastlanma gözlemiyle bir araya geldiğinde **göç teorisi** doğmuştur. Bu fikre göre soğuk kış koşullarında daha ılık bölgelere göç eden *D. simulans* populasyonları, koşulların üreme ve beslenmeye elverişli hale gelmesiyle birlikte aynı lokasyona geri döner. Söz konusu göç hareketi uzun zaman alacağı için populasyonlara yaz ortasına kadar rastlanmaz [10,21,46,78,103]. Göç halinde olan büyük bir populasyon fikri, gen akışının geniş alanlarda devam etmesi ve dolayısıyla *D. melanogaster*'e göre düşük genetik çeşitlilik verileriyle de uyumludur.

Son dönem yapılan çalışmalara göre, *D. simulans*, *D. melanogaster*'e göre daha soğuk çevresel koşullarda reproduktif diyapoz cevabı gösterir [19,21]. Larval gelişimini görece düşük sıcaklıklarda tamamlayan *D. simulans* bireyleriyle yapılan çalışmalarda, sanılanın aksine, soğuk koşullarda hayatta kalma başarısının *D. melanogaster*'den daha fazla olduğu gösterilmiştir [18,19,63,103]. Bu nedenle, düşük sıcaklıklarda üremeye devam eden *D. simulans* sonbaharda maksimum populasyon büyüklüğüne erişir ve kışa kadar varlığını sürdürür [46,78,79,81].

Elde edilen yeni bilgiler ışığında, sıcaklıkların düşmesiyle birlikte *D. simulans* dişilerinin reproduktif diyapoz cevabı geliştirdiği bilinmektedir [19,21]. Bir çeşit dormansi durumu olan söz konusu fenotipik karakter, canlıya zor çevresel koşullar altında beslenmeksizin uzun süre hayatta kalabilme başarısı sağlar [9,22]. Bu durumda *D. simulans*

populasyonlarının ılıman kuşaklarda göç etmeden, kışı sibliği *D. melanogaster* gibi bulunduğu bölgede geçirdiği de düşünülebilir.

### 2.3.1. Reprodüktif Diyapoz

Canlılar stres koşullarında dormansi durumuna girer, metabolik aktivitelerini düşürür, beslenmeyi ve üremeyi geçici olarak durdurur ve tasarruf ettikleri enerjiyi, karşılaştıkları zor koşullara verecekleri yanıtlara harcarlar [19,107,108]. İliman kuşakta sert kış koşulları ile baş etmek, çöllerde aşırı kurak ve sıcak koşullarda hayatta kalıp üreme başarısı göstermek ya da tropiklerde yaşayan canlıların kurak dönemlerde hayatta kalmak için geliştirdikleri pek çok dormansi stratejisi vardır. Dormansi; bitkilerde [107], balıklarda [109], omurgasızlarda [108], sürüngenlerde [110] ve memelilerde [111] görülen evrensel bir cevaptır ve canlıların göç ederek mekânsal olarak yer değiştirmesine gerek kalmaksızın, zamanda yer değiştirmesini ve istenmeyen koşulların üstesinden gelmesini sağlar. Yaklaşık 5 milyon yıl önce, Pliyosen çağındaki iklimsel dalgalanmalar ve soğumaların, sıcak olan alanlarda da hissedilmeye başlamasıyla, canlıların dormansi yanıtı oluşturmuş olmaları olasıdır [108].

Ekvatorдан kutuplara doğru gidildikçe, canlıların birbirinden farklı iklimsel değişkenlere bağlı seçim baskıları altında olduğu görülür. İklimdeki değişiklikler, çevresel sıcaklıkları etkilediği gibi ışık, nem ve besin kaynaklarını da etkiler. Bunun sonucu olarak, bazı türler hiç ara vermeksizin büyüme ve üremeye devam ederken, bazılarının ise geçici olarak kısa ya da uzun dönemli dormansiye girdikleri gözlenir [107]. Kozmopolit olan canlılarda ise söz konusu duraklama populasyonlar arası farklılık gösterebilir. Örneğin, tropik kuşakta yer alan populasyonlarda dormansiye rastlanmaz iken, ılıman kuşaklara yayılmış populasyonlarda dormansi durumu sıkça görülebilir.

Böceklerde dormansi; yumurta, larva, pupa ya da ergin dönemde görülebilir. Genel olarak böceklerdeki dormansi Şekil 2.5.'de görüleceği üzere üç ana tanım altında incelenebilir. [1] *Dinlenme* çevresel koşulların kısa süreli ve hafif değişimlerine verilen kısa süreli bir cevap; [2] *Oligopoz*: çevresel koşulların mevsim gibi döngüler halinde, görece yumuşak değişimlerine verilen bir cevap; [3] *Diyapoz*: ise mevsimlerin belirgin ve sert değişimlerine karşı verilen bir cevap olarak tanımlanır [108]. "Diyapoz" tanımı ilk kez 1893 yılında *Xiphidium ensiferum*'a ait dormant yumurtaları tanımlamak için

kullanılmış [108], zaman içinde anlamı genişletip daraltılarak pek çok diyapoz tanımı geliştirilmiştir.



**Şekil 2. 5.** Böceklerde dormansinin sınıflandırması [108].

Ergin böceklerdeki “reproduktif diyapoz” ilk kez 1981 yılında Herman tarafından *Danaus plexippus plexippus* üzerine yaptığı çalışmalar sonucunda tanımlanmıştır [112]. Artropodların, ekstrem çevresel koşullar altında, üremeyi durdurup, beslenmeyi ve fiziksel aktiviteyi azaltarak, verecekleri stres yanıtını güçlendirmeleri ve yaşam süresini uzatmaları durumuna reproduktif diyapoz denir. Bir “*trade-off*” stratejisi olan reproduktif diyapoz, pek çok böcek türünün ılıman kuşakta kışlama stratejisi olarak geliştirdiği adaptif bir yanıttır.

*Drosophila*, tamamen donmuş bölgeler dışındaki dünya üzerindeki her noktayı kolonize etmeyi başarmış bir taksondur. *Drosophila* cinsi *D. buzzatii* ve *D. mojavensis* gibi kaktofilik olarak yaşamını çöllerde sürdüren birçok tür içerdiği gibi, *D. montana* gibi arktik bölgenin sınırlarına yayılmış türlere de sahiptir [34,36]. *Drosophila* üyelerinin larva, pupa ve ergin halde diyapoza girdikleri biliniyordu ancak, Saunders’ın 1989’da *D. melanogaster* bireylerinin kışı ergin halde reproduktif diyapoza girerek geçirdiklerini bulması önemli bir çalışma oldu [20,21,113]. *D. melanogaster*, *Drosophilidae* ailesinin en geniş yayılım gösteren ve en çok bilinen türüdür. Tropik kökenli bu canlının, soğuk koşullarda hayatta kalmak için geliştirdiği bu cevap pek çok yeni soruyu akla getirmiştir. *D. melanogaster*’de reproduktif diyapozun; genetiği, biyokimyası ve hormonal mekanizması çok sayıda çalışmaya konu olmuştur [9,20,21,23,51,113,114].

Tropik kökenli olduğu bilinen *D. melanogaster*’in nasıl olup da reproduktif diyapoz cevabı geliştirdiği hala yanıtı merak edilen bir sorudur. Tropik ve ılıman kuşaklardan

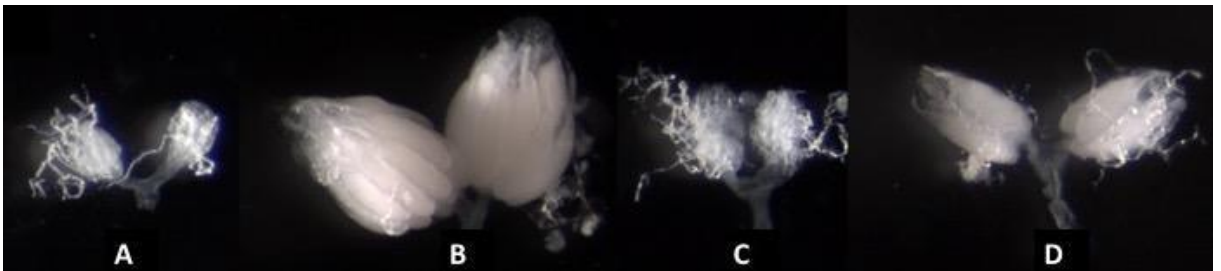


toplanan doğal *D. melanogaster* populasyonlarıyla sürdürülen çalışmalarda, Afrika populasyonlarının da ılıman kuşaklardaki akrabaları gibi diyapoz cevabı vermesi, reproduktif diyapozun bu canlıda kış koşullarıyla karşılaşmadan çok daha öncesinde, farklı stres koşulları altında evrimleşmiş olabileceği fikrini vermektedir [21].

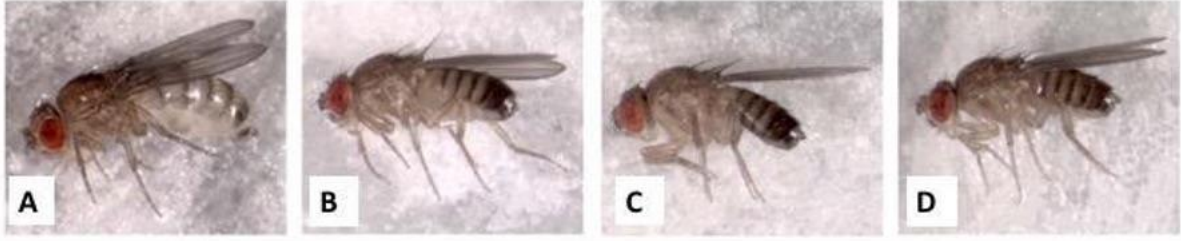
Reproduktif diyapoz, mevsimlerle olan ilişkisi gereği klin göstermesi beklenen bir yaşam öyküsü karakteridir. Avustralya ve Kuzey Amerika'da *D. melanogaster* ile yapılan enlemsellik çalışmaları, reproduktif diyapoz karakterinin paralel enlemsel klin gösterdiğini kanıtlamıştır [50,51].

Laboratuvar koşullarında reproduktif diyapoz cevabı oluşturmak için, tetikleyici olarak kullanılan ortam, *Drosophila* bireylerinin genellikle düşük sıcaklık ve kısa gün fotoperiyot uygulanmasına maruz bırakılmasıdır [20]. Yapılan çalışmalarda, koşullar sürdürülse dahi, bireylerin bir süre sonunda diyapozdan çıkmaya başladığı ve yeniden üretken yumurtalar geliştirmeye başladığı görülmüştür [21,106]. Diyapoza girip çıkmış *D. melanogaster* soyları ile yapılan stres toleransı çalışmalarında, söz konusu karakterin canlı üzerinde belirgin bir şekilde strese karşı toleransını arttırdığı görülmüştür [9,51,106].

Bazı *Drosophila* türlerine ait dişiler, sıcaklığın düşmesi ve günlerin kısalmasıyla birlikte, previtellogenik evrede yumurtaların gelişimini askıya alarak üremeyi durdurur. Çok az beslenerek ve hareket ederek reproduktif diyapoza girer. Koşulların tekrar ideal çevresel koşullara dönmesiyle birlikte, hızlı bir iyileşme döneminin ardından, yumurta üretimi durdurulduğu noktadan devam ettirilir (Şekil 2.6, Şekil 2.7).



**Şekil 2. 6.** *Drosophila* ovaryumlarında yumurta gelişimi ve diyapoz halindeyken duraklaması: [A] pupadan yeni çıkmış ve çiftleşmemiş bir dişide, yumurta gelişiminin henüz başlamadığı ovaryum. [B] eşeyssel olgunluğa erişmiş, gelişmiş yumurtalara sahip ovaryum. [C] reproduktif diyapoza girmiş, yumurta gelişiminin tamamen durduğu ovaryum. [D] reproduktif diyapozdan çıkmış, yeniden yumurta üretiminin başladığı, iyileşme dönemindeki ovaryum [20'den alınmıştır].



**Şekil 2. 7.** *Drosophila*'da diyapoz halindeki erginin abdomen hacminin gösterimi: [A] pupadan yeni çıkmış çiftleşmemiş bir dişi, [B] eşeyssel olgunluğa erişmiş bir dişi, [C] diyapoz koşulları altında tutulmuş bir dişi, [D] reproduktif diyapozdan çıkmış, iyileşme döneminde bir dişi [20'den alınmıştır].

*D. simulans* ile yapılan çalışmaların *D. melanogaster* kadar yaygın olmaması nedeniyle *D. simulans*'ın reproduktif diyapoza girdiği çok geç anlaşılmış ve ılıman kuşakta yayılım gösteren bazı türler gibi göç ederek kışladığı düşünülmüştür. Kışlama örüntüsü hala net olmamakla birlikte, *D. simulans* dişileri reproduktif diyapoza girerler [19,21]. Henüz çok yeni olan bu bilgi ardından yeni sorular getirmiştir, mevcut çalışmalar farklı *D. simulans* populasyonlarıyla yapılan yeni çalışmalar ile desteklenmelidir.

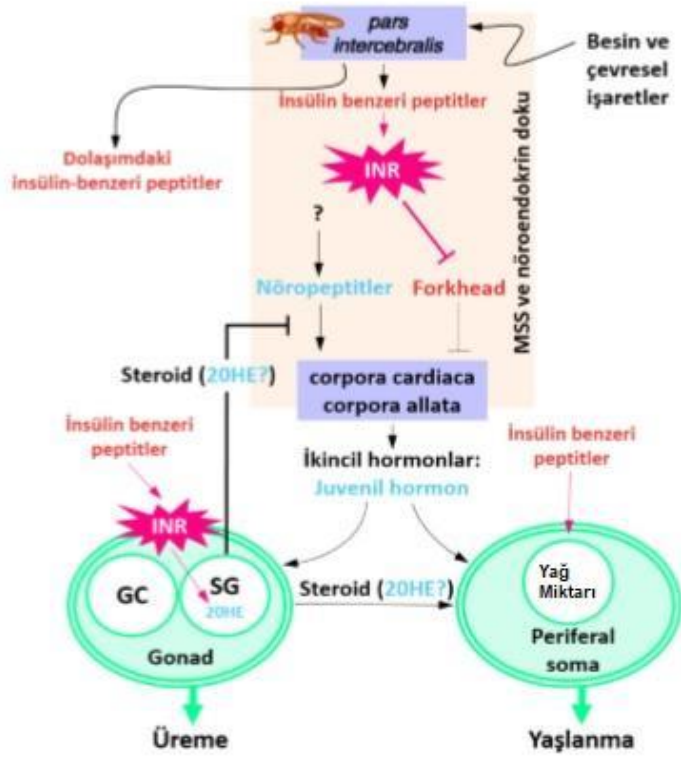
### 2.3.1.1 *Drosophila*'da Reproduktif Diyapoz Cevabını Kontrol Eden Mekanizmalar

Reproduktif diyapoz, çok geniş yayılım gösteren *Drosophiladea* ailesinde pek çok çalışmaya konu olmuş bir karakterdir [21,49,113,115–117]. Pek çok farklı tür üstünde araştırılan bir karakter olsa da Saunders ve arkadaşlarının [113] *D. melanogaster* erginlerinin reproduktif diyapoz cevabı oluşturduğunu bulunmasıyla birlikte, bu önemli kışlama karakterinin mekanizmaları hakkında bilgi toplamak için bu tür yaygın olarak kullanılmıştır [9,20–23,50,113,114,118–120]. Yapılan çalışmalar sonucunda reproduktif diyapoz cevabının, fotoperiyot ve çevresel sıcaklık değişimlerinin canlının nöroendokrin sistemi üzerinde yarattığı etki ile indüklendiği görülmüştür [21,36,113,121–123]. Diyapoz mekanizmasının altında yatan genetik faktörler pek çok araştırmaya konu olmuş ve pek çok aday gen ortaya atılmıştır. Yapılan araştırmalarda *couch potato (cpo)* geninin gösterdiği polimorfizmin enlemsel olduğu ve *Drosophila* türlerinde reproduktif diyapoz karakteri ile bağlantılı bir ilişkide olduğu görülmüştür [36,124–128]. *D. melanogaster* ile yapılan araştırmalarda *period (per)* geninin, sirkadiyen ritmin işleyişinden sorumlu olduğu görülmüştür [113,129]. Enlemsel klin

gösterdiği bilinen ve polimorfik olan bu gene ait farklı aleller ile gerçekleştirilen çalışmalarda, delesyona sahip *per* alellerinin fotoperiyodik saati inaktive ettiği ve gün uzunluğuna bağlı farklılık gösteren reprodüktif diyapoz karakteri ile ilişkili olduğu görülmüştür[113]. Diyapoz ile ilişkisi ortaya konmuş bir diğer gen ise, enlemsel klin gösterdiği bilinen *timeless (tim)* genidir [21,119,123,130]. *Drosophila*'da yapılan çalışmalarda *tim* geninin sikadiyen ritim ile ilişkili olduğu ve polimorfik alellerin farklı diyapoz frekanslarına sahip olduğu görülmüştür [130]. Bunların dışında *İnsülin-benzeri reseptör (InR)* gen bölgesinde bulunan bir polimorfizm enlemsel klin göstermekte ve bu polimorfizmin reprodüktif diyapoz ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [12,16,32].

### **2.3.1.2. İnsülin-benzeri Reseptör Geni (*InR*)**

Reprodüktif diyapoz cevabının canlı üzerinde nasıl bir mekanizma ile yönetildiği ile ilgili yapılan araştırmalardan çıkan ortak sonuç, insülin regülasyonunun büyük önem taşıdığı olmuştur [16,20,119,120,123,126,131–133]. İnsülin sinyal yolağı *Drosophila*'da reprodüktif diyapozun düzenlenmesiyle yakın ilişkilidir [16,131–133] “Juvenil Hormon” *Drosophila*'da yumurta gelişimi ve üreme mekanizmasından sorumludur ve seviyesindeki azalma, canlının diyapoza girmesine sebep olur [131,132]. Şekil 2.8.'de gösterildiği üzere canlıda juvenil hormon salınımı, insülin sinyal yolağının regülasyonu ile düzenlenir ve bu yolağın regülasyonundan *InR* geni sorumludur [131,132].



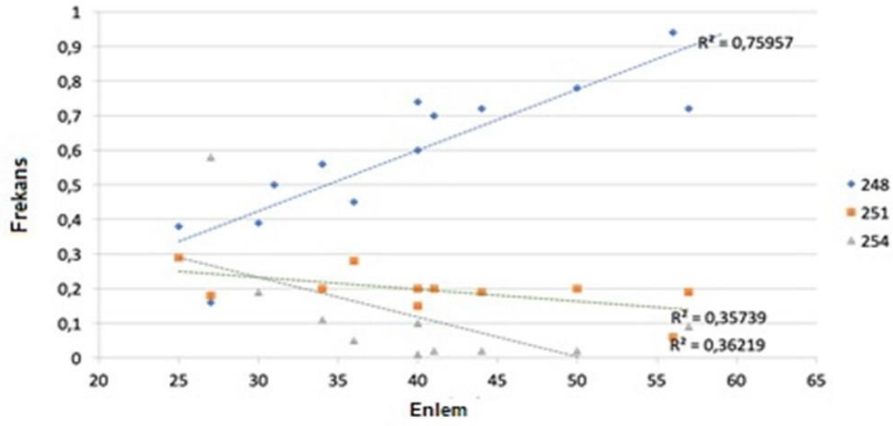
**Şekil 2. 8.** Reprodüktif diyapoz karakterinin hormonal kontrolü [134'den değiştirilerek alınmıştır].

İnsülin sinyal yolağı regülasyonunda önemli etkisi olan *InR* geni ile yapılan çalışmaların sonuçlarına göre yalnızca üreme değil, ömür uzunluğu, yaşlanma, vücut büyüklüğü, vücut yağ oranı ve stres toleransı karakterlerinden sorumlu bir aday gen olarak gösterilmiştir [16,21,132,133]. *InR* geni *D. simulans* ve *D. melanogaster*'de ortolog olan bir gendir ve *D. melanogaster* ile yapılan çalışmalarda reprodüktif diyapoz cevabı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [12,16,20,31,32,133].

3. kromozomun sağ kolunda bulunan *InR* geni 10 ekzon ve 9 intron bölgesine sahip, yaklaşık 7,5 kb uzunluğunda oldukça büyük bir gendir [136,171]. İfade ettiği protein  $\alpha$  ve  $\beta$  alt ünitelerinden oluşur;  $\alpha$  alt ünitesi ekstraselüler kısımdadır ve insüline bağlanır,  $\beta$  alt ünitesi ise membran içinde bulunur ve yaklaşık 400 amino asitten oluşan bir kuyruk sağlar [171]. Yapılan çalışmalarda *InR* genin tüm polimorfizmlerin yarısını birinci ekzonunun üzerinde barındırdığı görülmüştür [171]. Birinci ekzonu üzerinde yaklaşık 240 bp uzunluğunda bir bölgesinin çerçeve kaymasına neden olmayan, 3lü bazlar halinde tekrar eden insersiyon/delesyon (indel) polimorfizmine sahip olduğu ve glutamin histidin tekrarlarını bozarak amino asit ifadesinin değiştirdiği görülmüştür. Kuzey Amerika ve Avustralya populasyonlarının *InR* gen bölgesine ait sekanslar

incelenerek, söz konusu indel polimorfizme bağlı farklı aleller tanımlanmış, bu alellerin bazılarının yaygın bazılarının ise nadir olduğu tespit edilmiştir. Bu alellerin kıta boyunca enlemsel bir dağılıma sahip olup bazı yaşam öyküsü karakterleri ile de ilişkili olduğu görülmüştür [16,133].

*D. melanogaster* ile yapılan çalışmalar Kuzey Amerika, Avusturalya ve Doğu Avrupa'da *InR* geninin yüksek oranda polimorfizme sahip olduğu ve bazı alellerin enlem ile güçlü bir ilişki gösterdiği bulunmuştur (Şekil 2.9) [12,16,32]. Gen polimorfizmine ait gözlenen bu enlemsel klin *InR* genini lokal adaptasyon ile ilişkili güçlü bir aday gen yapmaktadır. Bu genin *D. simulans*'da lokal adaptasyon ile ilişkisi henüz bilinmemektedir.



**Şekil 2. 9.** *D. melanogaster*'in Kuzey Amerika, Avusturalya, Türkiye ve Rusya popülasyonlarında gözlenen *InR* indel polimorfizminin yaygın üç alelinin frekanslarının gösterimi [12'den değiştirilerek alınmıştır].

### 2.3.2. Soğuk Komadan Kurtulma Süresi

Canlıların kışlama adaptasyonlarını anlamak, soğuk toleransı mekanizmalarını çözmek ile mümkündür [24]. Doğal koşullar her zaman süreğen değildir, çevre sıcaklığı çok kısa sürelerde ani değişimler gösterebilir ya da ufak bir sığınak küçük bir canlı için hayatta kalabileceği bir mikroklima sağlayabilir. Değişken koşullar canlıların düşük çevresel sıcaklıklara adaptasyonunu, çok daha kompleks bir şekilde geliştirmeye itmiştir.

Soğuk toleransı üzerine *Drosophila*'da yapılan geçmiş çalışmalar, çoğunlukla donma alt sınırları üzerine odaklanmıştır [25,26]. Söz konusu yöntemler farklı lokasyonlardan toplanan popülasyonlar arası fark gösterdiği için adaptasyon çalışmalarında sıklıkla

tercih edilmiştir. Öte yandan canlılar donma sıcaklığının üstündeki bir sıcaklığa uzun süre maruz bırakıldığında da ölebilir. Dahası bireylerin ölümüyle son bulan bu çalışmalar, soğuk toleransının kalıtımıyla ilgili araştırmaların önüne engel teşkil eder [26,137].

Arktik kuşakta yaşayan canlı türleri arasında yaygın olarak görülen bir kışlama stratejisi “kriyoprezervasyon”dur ve tek hücrelilerden amfibi ve artropodlara kadar farklı taksonlarda rastlanır [138–140]. Canlı metabolik faaliyetlerine devam edemeyeceği çevresel sıcaklığa maruz kaldığında geçici bir donma fazına girerek, sıcaklık tekrar tercih ettiği aralığa yükseldiğinde donma fazından çıkar. Bu faz birkaç saat zaman aralığında olabileceği gibi aylarca sürebilir [139]. *Drosophila* ile yapılan çalışmalar, türün 0°C derece ve altındaki sıcaklıklara maruz bırakıldığında, kriyoprezervasyon benzeri kısa süreli “chill-coma” yani soğuk komasına girdiği görülmüştür [2,13]. Çevresel sıcaklığın 0°C dereceye düşmesi, canlının sinir sistemini tetikler ve hızlı bir şekilde koma benzeri bir duruma sokar, komaya giren birey hareket kabiliyetini ve beslenme kapasitesini kaybeder. Çevresel sıcaklık tekrar tercih edilen aralığa döndüğünde ise kısa bir süre sonra iyileşme başlar [13,25,26].

1998 yılında David ve arkadaşları, soğuk komasından kurtulma süresi (SKKS) için bir endeks oluşturup, *D. melanogaster*'de anestezi altında çalışmak ve soğuk toleransını ölçmek için en ideal metot olduğunu gösteren bir çalışma yayınlamıştır. Diğer yöntemlerin aksine canlı deneklerin ölmemesi sayesinde ile devamında ileri çalışmalar yapmak artık mümkün hale gelmiştir [26]. Bu çalışma *Drosophila* üzerinde yapılan soğuk toleransı araştırmaları için oldukça önemli olmuş ve farklı lokasyonlardan toplanan doğal populasyonlar arası anlamlı bir fark olduğunun görülmesi ile birlikte, arkasından gelen pek çok araştırmacının metoduna temel oluşturmuştur [8,9,12,24,26,89,137,141,142]. Devamında farklı *Drosophila* türleri üzerinde yapılan çalışmalar, soğuk komasından kurtulma süresinin populasyonlar arası farklı olduğunu ve enlemsel klin gösterdiğine işaret etmiştir [8,137,143].

### **2.3.3. Vücut Ağırlığı**

Uzun süreli kış koşulları, canlıların termal sınırlarını zorladığı gibi açlık toleransları için de seçici bir etkidir. Canlılar aylarca sürececek besinsiz dönemde hem soğuk koşullarda hayatta kalmak hem de açlık ve dolayısıyla susuzluk ile başa çıkmak zorundadır. Stres koşulları ile başa çıkmak için farklı tolerans mekanizmaları birbiriyle etkileşim halindedir [144]. Evrimsel süreçte oluşmuş bu etkileşimleri anlamak, altında yatan genetik

mekanizmayı açıklayabilmek için çok önemlidir. *Drosophila* ile yapılmış çalışmalarda, vücutta bulunan yağ miktarının açlık ve susuzluk toleransı ile pozitif korelasyon içinde olduğunu gösterilmiştir [27,28,30]. Bu durum vücut ağırlığı daha fazla olan bireylerin açlık ve susuzluk koşullarında daha uzun hayatta kalabileceği, uzun süren bir kışın ardından hayatta kalma olasılığını arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Öte yandan *D. melanogaster* ile yapılmış çalışmalara göre, biriktirilen yağ miktarının, soğuk toleransı ve yaşam öyküsü karakterleri üzerinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [22,144]. Düşük çevresel sıcaklıklardan gelen doğal populasyonlar ile yapılan çalışmalarda vücut ağırlığının arttığı görülmüştür [6,145]. *Drosophila* türleri ile yapılan çalışmalar, açlık toleransı ve vücut büyüklüğü gibi kışlama becerisi üzerine etkili özelliklerin enlemsel klin gösterdiğini işaret eder [7,30]. Bu durum belki de açlık ve susuzluk gibi stres toleransları ilişkili başka özelliklerin enlemsellik göstermesinden kaynaklanıyor olabilir. Biriktirilen lipid miktarı ile birlikte artan vücut ağırlığı, yalnızca açlık ve susuzluk toleransını değil, diyapoz ve ömür uzunluğu gibi başka özellikleri de etkileyen esas faktör olabilir [30].

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Arazi Çalışmaları

Araştırma kapsamında, 2018 yılında Kampala - Uganda (0°), Hayfa - İsrail (32°), Arsuz, Hatay - Türkiye (36°), Yeşilöz, Ankara - Türkiye (40°) ve Napoli - İtalya'dan (40°) toplanmış doğal populasyonlardan oluşturulan izodişi soy hatları (doğadan toplanan tek dişinin kurucu olarak seçildiği soy hatları) kullanılmıştır. Kullanılan populasyonlara ait iklimsel değişkenler ve coğrafi bilgiler Çizelge 3.1.'de özetlenmiştir.

Çalışmada kullanılan populasyonlar aynı yıl içerisinde toplanmış doğal populasyonlardan oluşmaktadır. Kampala populasyonu Mayıs 2018'de şehir merkezinden Cem Önder tarafından, Hayfa populasyonu Mart 2018'de şehir merkezinden uzak, deniz kenarında bir meyve bahçesinden Bengisu Subaşı tarafından, Arsuz populasyonu Haziran 2018'de bir turunçgil bahçesinden Esin Dural tarafından, Yeşilöz populasyonu Temmuz 2018'de köy içerisinde GenVA Lab tarafından, Napoli populasyonu ise Ekim 2018 şehrin güneyinde, yaygın olarak turunçgil yetiştirilen Massa Lubrense kasabasından Nur Seda Coşkun tarafından toplanmıştır.

**Çizelge 3. 1.** Kullanılan populasyonların toplandıkları coğrafi bölgelerin çevresel koşullarını tanımlayan iklimsel ve coğrafi parametreler. İklimsel parametreler populasyonların toplandığı 2018 yılına ait yıllık ortalama değerlerdir. Veriler <https://customweather.com/> adresinden alınmıştır.

	Toplandığı Tarih	Maksimum sıcaklık (°C)	Minimum sıcaklık (°C)	Ortalama Nem (%)	Enlem	Boylam	Rakım (m)
<b>Kampala</b>	May.18	29	17	85	0° 18' K	32°34' D	1.200
<b>Hayfa</b>	Mar.18	33	11	59	32°49' K	34°59' D	10
<b>Hatay</b>	Haz.18	39	19	73	36°35' K	36°10' D	25
<b>Ankara</b>	Tem.18	35	14	48	40°12' K	32°14' D	705
<b>Napoli</b>	Eki.18	25	12	74	40°37' K	14°22' D	50



Kampala popülasyonu, Doğu Afrika'da, ekvator üzerinde olmakla birlikte (0° 18' K) *D. simulans* için atasal olan bölgeye (Madagaskar) yakındır ve tropik bir bölge olması nedeniyle çalışmaya dahil edilmiştir. Yıl boyunca ilkbahar ve sonbahar aylarında iki kez düşen tropik yağmurla, çok yağışlı ve görece az yağışlı dönemler yaşanmaktadır. En yüksek yağış (163 mm) Nisan ayında düşerken, en düşük yağış ise Ocak (58 mm) ayındadır. Yıl boyunca sabit sıcaklıklar gözlenmektedir. Ortalama en yüksek sıcaklık (28,4°C) Ocak ve Şubat aylarında, en düşük sıcaklık (25,7°C) ise Temmuz ayında ölçülmektedir. Yıl içinde aylar arasında en yüksek sıcaklık farkı 2,7°C'dir. Aylar arasındaki en yüksek yağış farkı ise 105 mm'dir.

Hayfa, Kampala ile boylamsal olarak çok yakın olup, Afrika kıtasının kuzeyine de oldukça yakın (32°49' K) olan bir şehirdir. Popülasyonun toplandığı Hayfa Kuzey Yarım Küre'nin ılıman bölgesinde yer alan, coğrafi konumu nedeniyle sıcak-ılıman Akdeniz iklim kuşağındadır. Yağışlı gün sayısı kış aylarında fazla, bahar aylarında ise daha az olmakla birlikte yaz aylarında mutlak bir kuraklık görülür. Kışlar ılık ve yağışlı geçer; yıl boyunca ortalama en düşük sıcaklık (9°C) ve en yüksek yağış (155 mm) Ocak ayında görülür. Yazlar ise kurak ve sıcaktır; ortalama en yüksek sıcaklık (31,3°C) Ağustos ayında, en düşük yağışlar ise Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında (0 mm) görülür. Hatay popülasyonu İskenderun ilçesinin Arsuz köyünde toplanmıştır (36°35' K). Arsuz, Kuzey Yarım Küre'nin ılıman bölgesi sıcak-ılıman Akdeniz iklim kuşağındadır. Yağışlar yıl içinde kış aylarında artıp, yaz aylarında azalmakla birlikte diğer mevsimler içinde dengeli bir dağılım görülür. Kışlar ılık ve yağışlı geçer; ortalama en düşük sıcaklık (5,8°C) ve en yüksek yağış (137 mm) Ocak ayında görülür. Yazlar ise az yağışlı ve sıcaktır; ortalama en yüksek sıcaklık (31,5°C) Ağustos ayında, en düşük yağışlar ise Temmuz ayında (7mm) görülür.

Ankara popülasyonu Ankara'nın kuzeybatısında bulunan Gündül ilçesinin Yeşilöz mahallesinden (40°12' K) toplanmıştır, diğer popülasyonlar ile boylamsal olarak yakın ve ılıman iklim kuşağında olmakla birlikte, rakım ve iklimsel özellikleri bakımından farklıdır. Yıl içinde yağışlar kış aylarında artıp, yaz aylarında azalmakla birlikte diğer mevsimler içinde dengeli bir dağılım görülür. Kışlar soğuk ve yağışlıdır; ortalama en düşük sıcaklık (-5,6°C) Ocak ayında görülürken, en yüksek yağış (106 mm) ise Aralık ayındadır. Yazlar kısa, sıcak ve kuraktır; ortalama en yüksek sıcaklık (21,8°C) ve en düşük yağış (32 mm) Ağustos ayında görülür. Kirmir vadisinde bulunan Yeşilöz çevresine göre daha sıcak ve nemli bir bölgedir. Ankara'nın sert kışları ve kurak

yazlarından farklılık gösterir. Bu nedenle karasal iklim koşullarında yaşayamayan birçok bitki türüne de ev sahipliği yapar.

Napoli popülasyonu için arazi çalışması, Sorrento bölgesindeki Massa Lubrese kasabasında (40°37' K) gerçekleştirilmiş olup, Yeşilöz ile aynı enlemde olmakla birlikte, farklı boylam, rakım ve iklim özellikleri nedeniyle kontrol popülasyonu olması amacıyla tercih edilmiştir. Napoli, Kuzey Yarım Küre'nin ılıman bölgesinde sıcak-ılıman Akdeniz iklim kuşağındadır. Yağışlar sonbahar ve kış aylarında yüksek, yazın ise azalmakla birlikte bahar ayları da kısmen az yağış almaktadır. Kışlar ılık ve yağışlıdır; ortalama en düşük sıcaklık (6,6°C) Şubat ayında görülürken, en yüksek yağış (117 mm) ise Kasım ayındadır. Yazlar, sıcak ve az yağışlıdır; ortalama en yüksek sıcaklık (28,7°C) Ağustos ayında ve en düşük yağış (20 mm) Haziran ayında görülür.

Çalışmada kullanılan popülasyonların toplandığı bölgeler Şekil 3.1'de yer alan haritada verilmektedir.

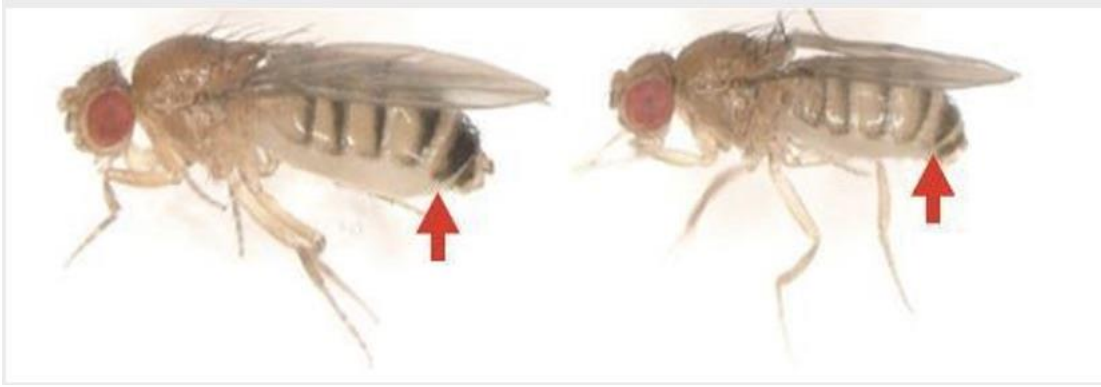


**Şekil 3. 1.** Popülasyonların toplandığı bölgeler ve enlem dereceleri.

Doğadan toplanan sinekler tuzaklardan standart besiyeri içeren tüplere aktarılarak, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Genetik Varyasyon ve Adaptasyon Laboratuvarı'na getirilmiş ve ivedi bir şekilde tür tayini yapılmıştır. Doğadan toplanan

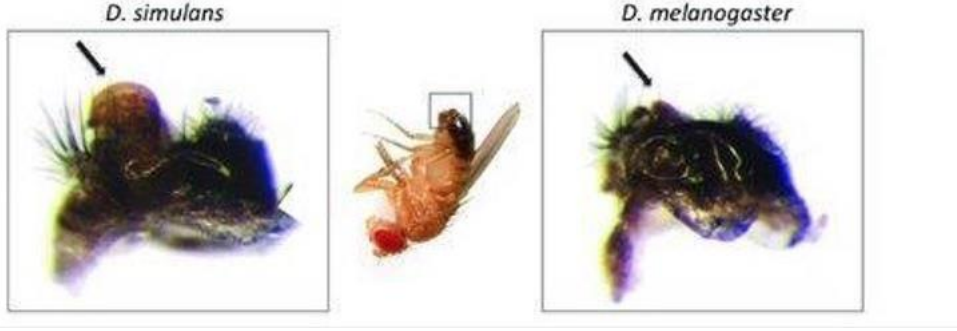
sinekler tür tayininden sonra eşeylerine ayrılarak izodişi soy hatları oluşturmak için her bir dişi, standart besiyeri içeren tüplere ayrı ayrı alınmıştır.

*D. simulans* ve *D. melanogaster* morfolojik olarak birbirine çok benzer türlerdir. Bu iki türü birbirinden ayırt etmek için, stereo mikroskop altında, dişilerde abdomendeki son tergumun lateralde gösterdiği renklenme farkı (Şekil 3.2.) tür tayini için kullanılan bir karakterdir. Ancak, pigmentasyon bireyler arasında yüksek varyasyon gösterdiği için bu yöntem güvenilir değildir.



**Şekil 3. 2.** *D. simulans* ve *D. melanogaster* dişi bireylerinin abdomenin son tergumundaki pigmentasyon farklılığı [146'dan alınmıştır].

*D. simulans* bireylerinde canlı olarak tür tayini yapmanın en kesin yöntemi erkek bireylerde mümkün olmaktadır. Erkek bireylerin genitalyasında bulunan ve *D. simulans*'a özgü olduğu bilinen genital ark (Şekil 3.3.) yapısı stereo mikroskop altında incelenerek erkek bireyler için tür ayrımı gerçekleştirilebilir. Doğadan gelen dişi bireylerde tür tayinini kesin olarak yapabilmek için dişiye ait F1 yavru dölünün erkek bireylerini kullanarak yapılan tür tayini ise en güvenilir yöntemdir. Bu çalışmada araziden toplanan dişi bireylerin yavru döl erkekleri kullanılarak soy hatları *D. simulans* ve *D. melanogaster* olarak ayrılmış ve tür teşhisi tamamlandıktan sonra soy hatları kodlanarak laboratuvarında standart koşullar altında kültüre alınmıştır.



**Şekil 3. 3.** *D. simulans* erkek bireylerinde genital ark yapısı ve *D. melanogaster* bireylerinden farklılığı [147'den alınmıştır].

### 3.1.1 İzodişi Soy Hatları Oluşturulması

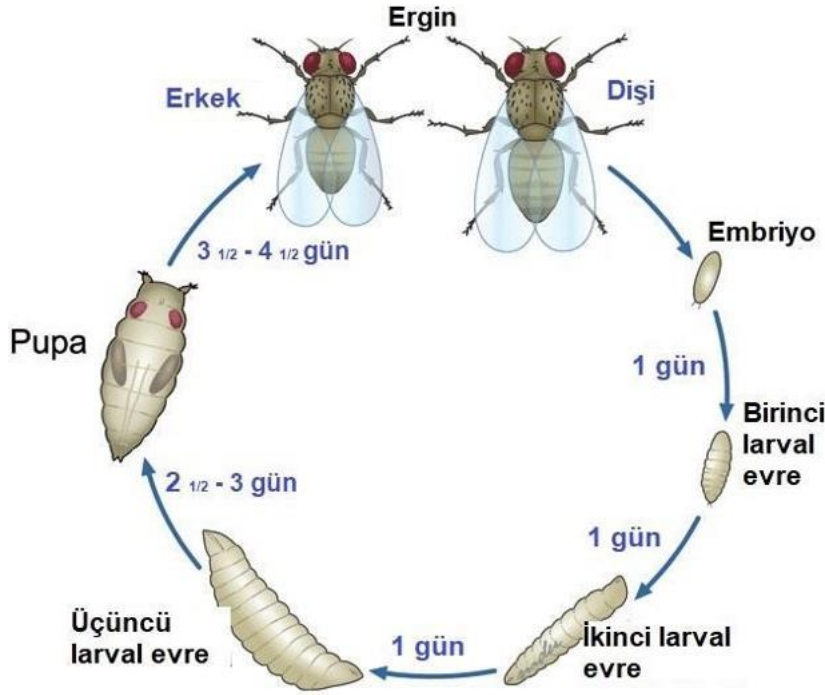
Bu tez çalışması kapsamında doğadan toplanan soylar izodişi soy hatları (isofemale line) olarak kültüre alınmıştır. İzodişi soy hatları elde etmek için doğadan getirilen her bir dişi ayrı bir tüpe alınarak bu dişiden meydana gelen döller kuşaklar boyunca sürdürülmektedir. *Drosophila* çalışmalarında izodişi soy hatları atasal popülasyona ait genetik varyasyonu en iyi temsil eden metotlardan biri olarak kullanılmaktadır. Laboratuvarında seleksiyonun uzun yıllar boyunca çok düşük olduğu bilinen izodişi soy hatları popülasyonların sahip olduğu genetik çeşitliliği anlamak için oldukça önemli araçlardır [148].

### 3.1.2. Soyların Kültüre Edilmesi

*Drosophila*'ların kültürü için laboratuvarımızda kullanılan standart besiyeri (1 litre su için 45 g mısır unu, 50 g şeker, 35 g maya, 10 g agar, ve 5 ml Propiyonik asit ile 7 ml alkol içerisinde çözdürülen 1.4 g metil paraben) ile yapılmıştır. İçeriğindeki mısır unu; *D. simulans* bireyleri için karbonhidrat, vitamin ve mineral kaynağı, şeker karbonhidrat kaynağı, maya protein kaynağı, agar katılaştırıcı, propiyonik asit ve metil paraben çözeltisi ise koruyucu olarak kullanılmaktadır.

*D. simulans*'ın yaşam döngüsü standart koşullar altında (25°C sıcaklık, %55 – 60 nem ve 12:12 aydınlık/karanlık fotoperiyod); 1 gün yumurta, 1 gün birinci larva evre (L1), 1 gün ikinci larval evre (L2), 2,5-3 gün üçüncü larval evre (L3) ve 3,5-4,5 gün pupa evresinden sonra ergin birey oluşumu şeklinde yaklaşık 10 gün sürer (Şekil 3.4.). Soylar 21°C sıcaklık, %55 – 60 nem ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ışık periyodu sağlayan Nüve marka (TK600) iklim kabinlerinde tutulmuştur.

Ortalama her 21 günde bir kültürler yenilenmiştir. Bunun için ergin bireyler taze besiyerine aktarılmış, besiyerindeki larval rekabeti önlemek için 3 gün yumurta bırakmaları için beklenmiş ve daha sonra tüm ergin bireyler tüplerden uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde farklı kuşakların birbiriyle çakışması da önlenmiştir. Yaklaşık 15 gün sonra yeni kuşağa ait ergin bireyler pupadan çıkmaya başlamış ve 21. günde yeniden kültür yapılmıştır.



**Şekil 3. 4.** *D. simulans*'ın 25°C sıcaklıkta hayat döngüsü [168'den değiştirilerek alınmıştır]

Deneye alınan tüm soy hatları 6-12 ay boyunca standart laboratuvar koşullarında kültüre edilmiş ve ortak laboratuvar koşullarında yaşamaya alıştırmış soylar haline getirilmiştir. Bu sayede fenotipik esneklik ve genotip - çevre etkileşimi belirli bir derecede kontrol altına alınmıştır.

### 3.2 Reprodüktif Diyapoz

#### 3.2.1. Deneyde Kullanılacak Bireylerin Toplanması

Deney için kullanılacak bireylerin toplanması için öncelikle kültürlerin çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. Ortak koşullarda (21°C sıcaklık ve %60 nem sağlayan 12:12

aydınlık/karanlık fotoperiyot) *Drosophila* tüplerinde kültürde bulunan soylara ait 3-7 günlük genç ve sağlıklı 30 dişi ve 30 erkek birey, CO<sub>2</sub> yardımıyla anestezi altında seçilmiş, 50 ml standart besiyeri içeren *Drosophila* şişelerine toplanmış ve şişeler 25°C sıcaklık, % 60 nem, 12:12 aydınlık/karanlık foto periyot sağlayacak iklim kabinlerine alınmıştır. Bireylerin çiftleşmesi ve yumurta bırakması için 2 gün beklenmiş ve 2. günün sonunda tüm ergin bireyler şişelerden uzaklaştırılmıştır. Yaklaşık 10 gün sonra ergin bireyler pupadan çıkmaya başlamıştır, ilk pupa çıktıktan 5 gün sonra pupaların büyük bir çoğunluğu açıldığında, şişedeki 3-5 günlük genç ve sağlıklı 30 dişi ve 30 erkek birey tekrar CO<sub>2</sub> yardımıyla toplanmış 50 ml standart besiyeri içeren *Drosophila* şişelerine toplanmış ve şişeler 25°C sıcaklık, %60 nem, 12:12 aydınlık/karanlık foto periyot sağlayacak iklim kabinlerine alınmıştır. İki kuşak boyunca tüm soylar aynı koşullarda çoğaltılmış ve deney için her bir soy hattına ait yeterli sayıda bireye ulaşılmıştır.

İkinci kuşak kurulduktan yaklaşık 10 gün sonra her bir soy hattı için erginler pupadan çıkmaya başlamıştır. Çıkışların olduğu ilk gün tüm bireyler şişelerden uzaklaştırılmış ve ikinci günden itibaren çiftleşmemiş dişi erginler (virgin dişiler) toplanmaya başlanmıştır. Çiftleşmiş dişiler ile hiç çiftleşmemiş virgin dişilerin, dişi vücudundaki spermin dişinin üreme hormonları üzerine etkisi olduğundan [132,149] üreme ile ilgili fenotiplerde göstereceği cevaplar farklılık gösterebilir. Bu nedenle deneyimizde tüm bireyler, virgin dişiler olarak seçilmiştir.

Virgin bireyler toplamak için, sabah şişelerin içindeki tüm bireyler uzaklaştırılmış ve sonrasındaki her 2 saatte bir tüm bireyler toplanmış, CO<sub>2</sub> yardımıyla anestezi altına alınarak stereo mikroskop altında dişiler seçilmiş ve 7 ml standart besiyeri içeren tüplere toplanmıştır. Her tüpte 15 adet birey olacak şekilde toplanıp, üzerine soya ait künnye bilgileri ve toplandığı tarih yazılarak, aynı gün diyapozu indükleyici koşullar sağlayacak iklim kabinlerine alınmıştır.

### **3.2.2. *D. simulans* için Belirlenen Reprodüktif Diyapoz Koşulları**

Reprodüktif diyapoz, doğada farklı mevsim değişkenlerine maruz kalan *Drosophila* türlerinde rastlanan adaptif bir davranıştır. Doğada farklı değişkenlere karşı verilen bu cevabın laboratuvarında indüklenmesi için, farklı ışık döngüleri ve düşük sıcaklık kullanılması yaygındır. *D. simulans* ile yapılan diyapoz çalışmalarının azlığı nedeniyle, literatürde henüz standart bir reprodüktif diyapoz koşulu belirlenmemiştir. Bu nedenle ön denemeler yapılarak uygun koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. Fotoperiyot sabit tutularak, sıcaklık 8°C, 10°C, 11°C ve 12°C olarak değiştirilmiş ve *D. simulans* soyları

için, populasyonlar arası varyasyonların en iyi  $11 \pm 0.5$  °C sıcaklık, %60 nem ve 10:14 aydınlık/karanlık fotoperiyot koşullarında görüldüğü tespit edilmiştir.

Her soya ait en az 5 replika olacak şekilde 75 birey toplanmış, 10:14 aydınlık/karanlık fotoperiyot koşullarında ve 11°C'de diyapoz koşulları sağlayan iklim kabinlerinde 28 gün boyunca tutulmuştur. Herhangi bir besin kıtlığına sebep olmamak için, ikinci haftanın sonunda tüm bireyler taze besiyeri içeren tüplere transfer edilmiştir. 28. günün sonunda tüm bireyler -20°C'de öldürülmüş ve ovaryum diseksiyonu gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3. Ovaryum Diseksiyonu

Laboratuvar koşullarında, *D. simulans* bireylerinin en erken ne zaman diyapoz cevabı göstermeye başladığı ve ne zaman diyapozdan çıktığının anlaşılması için, çeşitli ön denemeler yapılmıştır. Diyapoz koşullarındaki bireylere 14, 21, 28, 35 ve 42. günlerinde diseksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Ön denemelerimiz 28. günün, diyapoz cevabını görmek için optimum bir süre olduğunu göstermiş ve literatürdeki mevcut önerilen metotları da desteklemiştir [20].

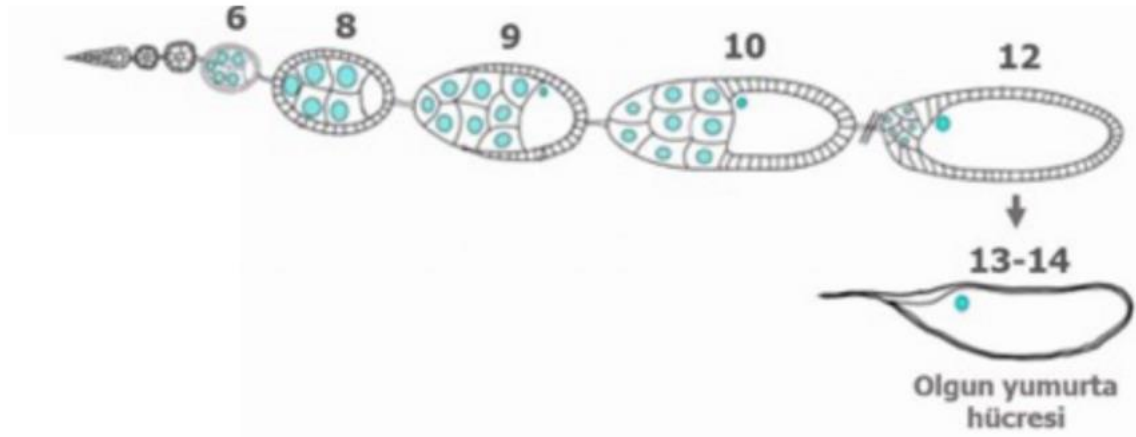
Diseksiyon, Leica marka stereo mikroskop altında ve PBS (Fosfat tamponlu salin, ph=7.4) tamponu içinde, bir adet diseksiyon iğnesi ile abdomenin üst kısmından sabitlenen bireyin, diğer diseksiyon iğnesi ile abdomenin ucundan tutulup çekilerek (Şekil 3.5.) disekte edilmesi ile gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3. 5.** Ovaryum diseksiyonu gerçekleştirilmesi. Birey abdomenin anterior kısmından sıkıca tutulur. Pens ya da diseksiyon iğnesi yardımıyla abdomenin posterior ucundan tutulup nazikçe çekilir ve üreme organları vücut boşluğundan dışarı çekilir.

Ovaryumların dışarı çıkmaması durumunda abdomene nazikçe bastırılarak tüm ovaryumların dışarı çıkarılması sağlanır.

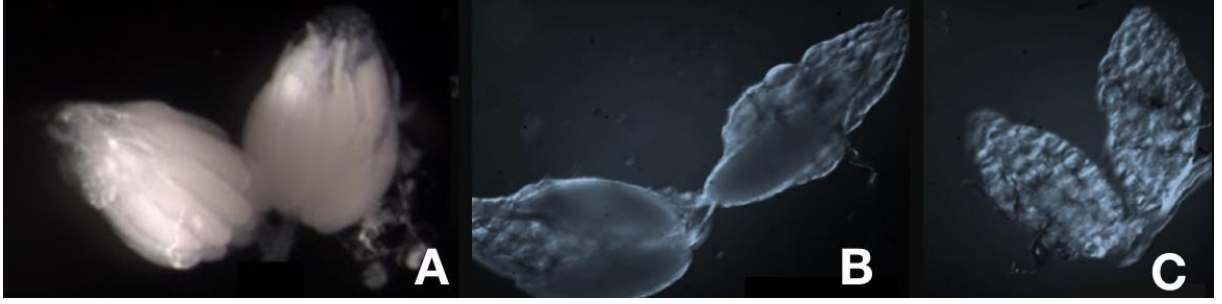
Şekil 3.6'da görüldüğü üzere, her iki ovaryumda da oosit gelişimi King tarafından [150] belirlenen 8. aşamada ya da altında ise "diyapozda" (D) olarak sınıflandırılmış, ovaryumların birinde tam gelişmiş yumurtalar bulunup diğeri diyapoz halindeyse ya da her iki ovaryum da tam gelişmiş bir adet yumurtaya sahipse "arada" (ID) olarak sınıflandırılmış, her iki ovaryum da tam gelişmiş yumurtalara sahipse "diyapozda değil" (ND) olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 3.7).



**Şekil 3. 6.** King'in belirlemiş *Drosophila* yumurtalarının gelişim aşamaları [150'den alınmıştır].

Literatüre göre iki ovaryumdan herhangi biri en az bir gelişmiş yumurtaya sahipse "diyapozda değil" olarak sınıflandırılır. "Arada" olarak sınıflandırılan bireyler diyapozda olmadığı düşünülmektedir, öte yandan tam olarak üremeyi başarıp başaramadıkları bilinmemektedir. Literatürde bu konuda yeterli bilgi olmadığından, sınıflandırma üç aşamada yapılmasına karşın, analizlerde "arada" olan bireyler de "diyapozda değil" olarak kabul edilerek gerçekleştirilmiştir.





**Şekil 3. 7.** Ovaryumların sınıflandırılması; A. diyapozda değil, B. arada ve C. diyapozda [20,151'den alınmıştır].

### 3.4. Soğuk Komadan Kurtulma Süresinin (SKKS) Ölçülmesi

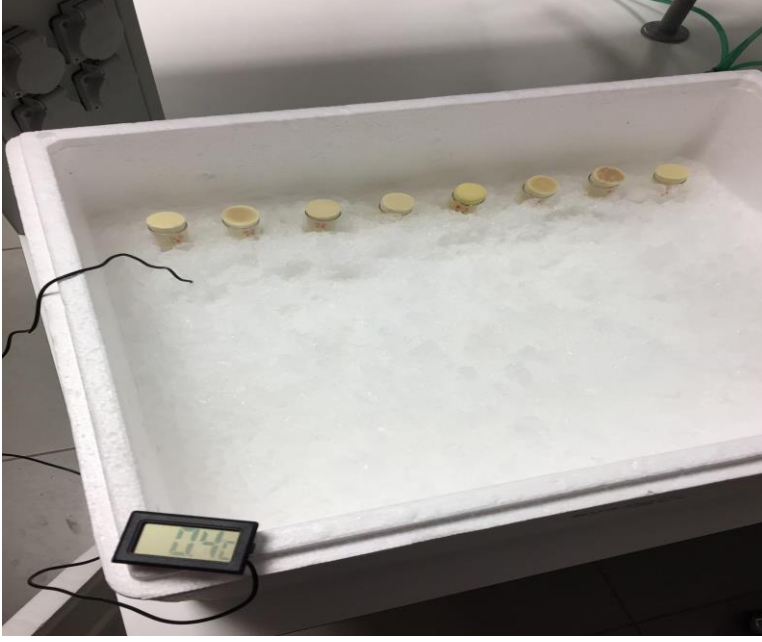
#### 3.4.1. Deneyde Kullanılacak Bireylerin Toplanması

Deney için kullanılacak bireyler 2 kuşak boyunca reproduktif diyapoz deneyi ile aynı koşullarda çoğaltılmıştır. Çalışmanın çevre koşullarından etkilenmesini önlemek için, çoğaltma koşullarının, her soy için standart olarak uygulanması önemlidir. 50 ml besiyeri içeren *Drosophila* şişelerine, her şişeye 30 dişi ve 30 erkek olacak şekilde 60 birey konulmuş ve tüm erginler ikinci günün sonunda besiyerinden uzaklaştırılmıştır. Koşulların standart olarak uygulanması sonucu her larva ve erginin benzer koşullarda gelişimini tamamlayıp beslendiği kabul edilmiştir.

Çoğaltma şişelerindeki erginlerin çıkışını takiben toplama işlemine geçilmiştir. İlk gün çıkan sineklerin tümü şişelerden uzaklaştırılmış, ikinci gün çıkış yapan bireyler, CO<sub>2</sub> yardımıyla anestezi altında eşey ayrı her tüpte 10 birey olacak şekilde taze besiyeri içeren tüplere transfer edilmiştir. Aynı işlem yeterli sayıda birey elde edilene kadar üçüncü ve dördüncü gün tekrar edilmiştir. Tüm bireyler 5 gün boyunca taze besiyeri içeren tüplerde standart koşullarda (25°C sıcaklık, %60 nem, 12:12 aydınlık/karanlık fotoperiyot) tutulmuş, beşinci günün sonunda, 3'er replika halinde 30 dişi ve 30 erkek olmak üzere her soy için toplam 60 birey deneye alınmıştır.

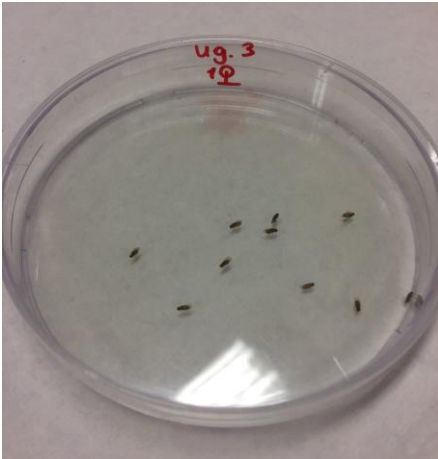
#### 3.4.2. Soğuk Komadan Kurtulma Süresinin Ölçülmesi

Deneyde kullanılacak bireyler ısı transferinin daha homojen olmasını sağlamak için cam tüplere transfer edilmiş ve tüplere bireylerin künyesi not edilmiştir. Şekil 3.8.'da görüleceği gibi cam tüpler sıralı olarak,  $0 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta buz içeren, ısıyı muhafaza eden strafor köpük kutulara yerleştirilmiştir.



**Şekil 3. 8.** Deneye alınan ergin bireylere soğuk uygulaması için kullanılan düzenek.

Cam tüpler içerisinde bulunan erginler bir saat boyunca buzda bekletilerek, soğuk komasına girerek bayılmaları sağlanmıştır. Bir saatin sonunda tüpler buzdan çıkarılarak kronometre çalıştırılmıştır. Tüplerin içindeki bireyler petri kaplarına transfer edilerek kapların üzerine bireylerin künyeleri not edilmiştir (Şekil 3.9.).



**Şekil 3. 9.** Soğuk komasından kurtulma sürelerini gözlemlemek için soğuk komasına giren bireylerin petri kaplarına aktarılması.

Şekil 3.10.'de görüleceği üzere bireyler 6 bacak üzerinde durdukları an komadan kurtulma anı olarak kabul edilerek ayılma süresi not edilmiştir. Gözlem son birey soğuk komasından kurtulana kadar devam ettirilmiştir.



**Şekil 3. 10.** Solda soğuk komasına girmiş baygın bir ergin, sağda ise soğuk komasından kurtularak 6 bacak üzerinde duran ergin *Drosophila* [152'den alınmıştır].

Bireylerin komadan çıkma süresinin çevresel değişkenlerden en az şekilde etkilenmesi için, her deney aynı laboratuvarda, benzer ışık ve çevresel sıcaklık koşulları sağlanarak gerçekleştirilmiştir.

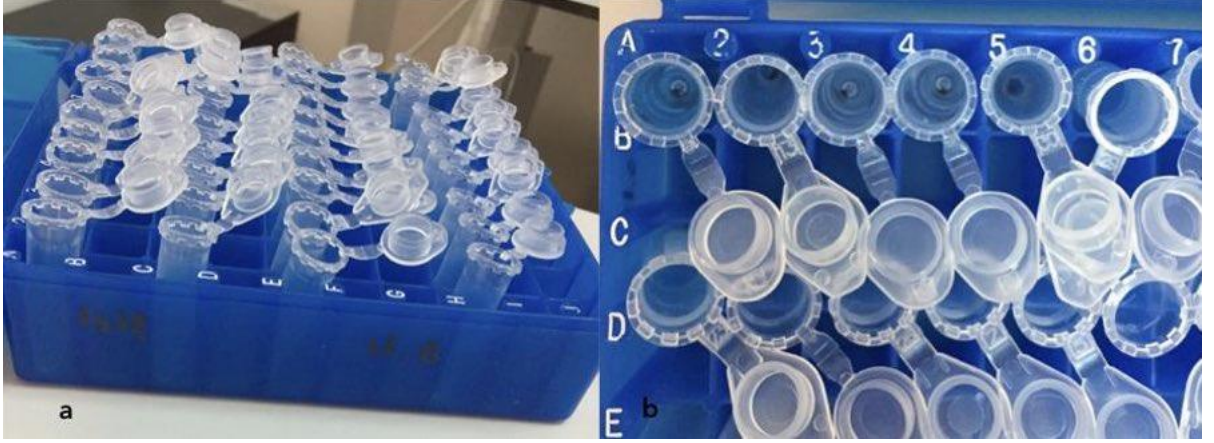
### 3.3. Vücut Ağırlığı

#### 3.3.1. Deneyde Kullanılacak Bireylerin Toplanması

Deney için kullanılacak bireyler 2 kuşak boyunca reproduktif diyapoz deneyi ile aynı koşullarda çoğaltılmıştır. Yapılan çalışmanın besin miktarı, rekabet gibi çevresel etkilere olan hassasiyeti dolayısıyla çoğaltma koşullarının, her soy için standart olarak uygulanması önemlidir. 50 ml besiyeri içeren *Drosophila* şişelerine, her şişeye 30 dişi ve 30 erkek olacak şekilde 60 birey konulmuş ve tüm erginler ikinci günün sonunda besiyerinden uzaklaştırılmıştır. Koşulların standart olarak uygulanması sonucu her larva ve erginin benzer koşullarda gelişimini tamamlayıp beslendiği kabul edilmiştir. Çoğaltma şişelerindeki erginlerin çıkışını takiben toplama işlemine geçilmiştir. İlk gün çıkan sineklerin tümü şişelerden uzaklaştırılmış, ikinci gün çıkış yapan bireyler, tüp başına yaklaşık 30 adet olacak şekilde, 7 ml taze besiyeri dökülmüş *Drosophila* tüplerine alınmıştır. Aynı işlem yeterli sayıda birey elde edilene kadar üçüncü ve dördüncü gün tekrar edilmiştir. Tüm bireyler 5 gün boyunca taze besiyeri içeren tüplerde standart koşullarda (25°C sıcaklık, %60 nem, 12:12 aydınlık/karanlık fotoperiyot) tutulmuş, beşinci günün sonunda CO<sub>2</sub> yardımıyla anestezi altında 50 dişi ve 50 erkek seçilmiş, eşey ayrı olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine konularak, üstlerine ait olduğu soyun künye bilgileri not edildikten sonra -20°C sıcaklıkta öldürülmüştür.

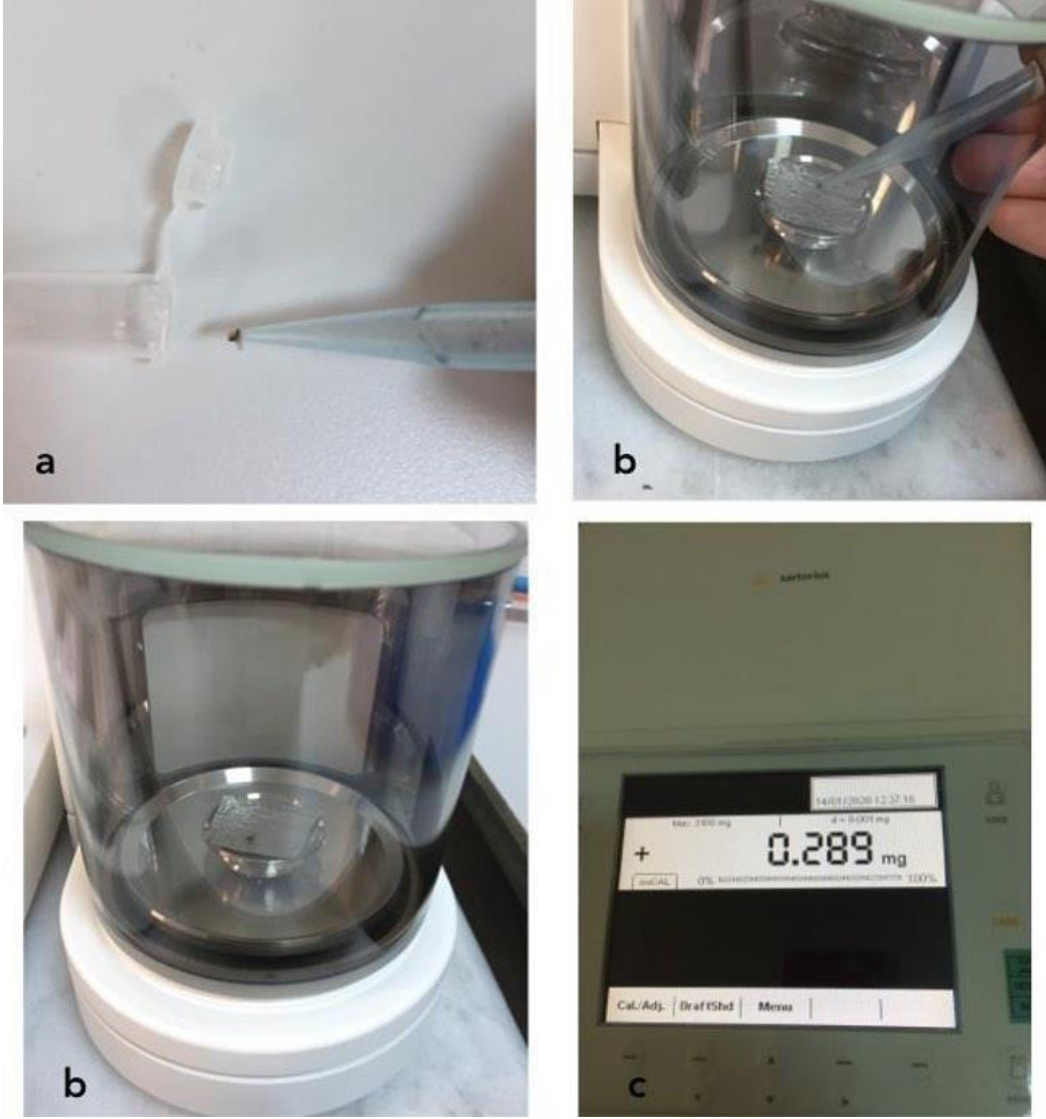
### 3.3.2. Vücut Ağırlığı Ölçümünün Gerçekleştirilmesi

Ölçüm yapmak için, her soya ait 10 dişi ve 10 erkek olmak üzere toplam 20 adet birey kullanılmıştır. Şekil 3.11.'de görüleceği gibi her birey mikrosantrifüj tüplerine tek tek konulmuş, her soy dişiler ve erkekler sıralı olacak şekilde dizilmiş ve soya ait bilgiler tüpler üzerine not edilmiştir.



**Şekil 3. 11.** Vücut ağırlığı ölçümleri düzeneği **a.** Bir soya ait bireylerin tartım için hazırlanması. **b.** Her bir tüpe tek bir bireyin yerleştirilmesi.

Tüplerin kapakları açık olarak 65°C sıcaklık ve kuru etüvde en az 3 gün boyunca bekletilerek vücut sıvılarının tamamen kurutulması sağlanmıştır. Üçüncü günün sonunda, kurutulmuş bireylerin vücut bütünlüğünü bozmadan ve statik elektrik oluşumunu önleyecek şekilde sinekleri transfer etmek için, Şekil 3.12.'da görülen ucu kesilmiş 1 ml'lik mikropipet uçlarından yapılmış özel aspiratör kullanılmıştır. Kuru vücut ağırlığı (KVA), Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (HÜNİTEK) bulunan Sartorius® marka Cubis® Micro Balance model hassas terazi ile ölçülmüş ve sonuçlar not edilmiştir.



**Şekil 3. 12.** Vücut ağırlığı ölçümleri. **a.** Bireylerin transfer edildiği **b.** Bireylerin tartıya yerleştirilmesi **c.** Bireylerin ağırlıklarının ölçümü.

### 3.5. Moleküler Analizler

#### 3.5.1. DNA İzolasyonu

Moleküler analizleri gerçekleştirmek üzere, öncelikle deney soylarına ait DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon, Pure-Link Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) ile üreticinin firmanın belirlediği protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

Her soya ait 10 adet erkek birey steril mikrosantrifüj tüplerine konulmuş, tüplerin üzerine soylara ait künye bilgisi yazılmış ve  $-20^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta öldürüldükten sonra izolasyon işlemine başlanmıştır. Protokole göre izolasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılan DNA'ların konsantrasyonu Nanaospektrofotometre

(BioSpec - Shimadzu) ile ölçülmüş, uygun miktar ve saflıkta olan DNA'lar kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

### 3.4.2. *InR* Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) için, *InR* gen bölgesi üzerinde *D. melanogaster*'de varyasyon gösterdiği bilinen 1. ekzonun yaklaşık 250 bç uzunluğunda bir bölgesi [16] (Şekil 3.13.) amplifiye edilmiştir. İlgili bölgenin *InR* amplifikasyonu için F: 5'-CAA TAT CTT TAG CAA CTG TCA C-3', ve R: 5'- TTT AGG GCT TAA ACT CAG TC-3' primerler kullanılmıştır.

```
GGCGGAACAAATAGAAGAAAAATTGCATTCCAAGTGAAGTGAATATTTGTTGCGCTTTT
CGGCTGCAACAGAGTGTGAGAGCGGGACGAAAGATGATTACCTAGCGGGGGTGAGAGAGA
CCCAAAAAGCGAAAGCAGAAGTCTGTTGAAAGCTGAAAATTTGAGGAAACAATTTATAAT
ACGAATAGAAACACCGCAATATGTTCAATATGCCACGGGGAGTGACAAAAAGTAAATCCA
AGCGTGGGAAAATTAAGATGGAAAACGATATGGCAGCAGCAGCAACAACAACAGCCTGCA
CGTTGGACACATTTGTGTTTTGTGCCGGCAAGAAATGTTGCTGGATACATGTTGCTGCC
GGCAAGCAGTAGAAGCAGTTGACAGCCCCGCAAGCAGTGAAGAAGCGTATAGCAGTAGCA
ACAGCAGCAGCTGTCAAGCAAGCAGTGAATCAGTGCGGAGGAGGTCTGGTTTCTCAGTC
ATGATGATATCGTACTGTGCCGACAGACAAAAATTTGACGAAGTGGAGACGACGGGTAAAA
AGAGGGACGTTAAATGCAGCGGGCATCAGTGCAGCAATGAATGCGACGATGGCAGCACGA
aaaacaatcgacaacagcgcgaaaacttcaatatcttagcaactgtcacaatattttgc
GAACATTGCAATCGCTGCTGCTGCTCATGTTCAATTGCGGCATTTTCAACAAGCGCAGCA
GGCGGCAGCATCAGCAGCAGCATCATCATTATCAGCATCATCATCAGCAGCATCATC
AGCAGCATCATCAGCGGCAGCAAGCCAATGTTAGTTACACAAAATTCCTATTGCTGCTAC
AAACTGAGCAGCAGCAACCACAAAGACTGAGTTTAAAGCCCTAAAAACTACAAACAACAAC
AAACTACAGCATAACCAACAGCTGCCACGTGCCACACCGCAACAAAAGCAACAAGAGA
AAGATAGGCATAAGTGCTTTCACTACAAGCACAATTACTCTTACTCGCCTGGCATTAGCC
TTTACTCTTTATCCTACTGGCCAACACATTGGCCATCCAAGCGGTGCTGTTGCCAGCAC
ATCAGCAGCACCTGCTGCACAATGATATAGCCGATGGACTGGATAAAACAGCGCTTTCCGG
TGTCGGGGACGCAATCGCGATGGACAAGGAGCGAATCAAACCAACAATGCGACTGTCAC
AAAATGTAACCGtatgtattacatgatctaccttgaagttaaaggaacattcccat
ttgcagcagactgacagataactaatagctttccattaacaccttatagCTTGCAAATCC
ATGGACATCAGGAACATGGTGTGCACTTCAATCAGCTGGAGAACTGCACGGTCATCGAG
GGCTTCTGCTGATCGATTTGATAAACGACGCCAGCCCTCTGAACAGAAGCTTTCCAAAA
CTGACCGAGGTACAGATTATACATAATCTACCGTGTGACTGGATTGCACTCGCTGTCA
AAGATCTTTCCAATCTGAGCGTCATTAGGGGAAACAAGCTGTTGACGGATATGCCTTG
GTCGTCTACTCGAATTTGACCTCATGGATTTGGGACTTACAAGCTACGATCCATAACC
AGAGGCGGTGTGCGGATTGAGAAGAATCATAAGCTGTGCTATGATAGGACCATCGATTGG
```

**Şekil 3. 13.** Sarı ile işaretlenmiş primerlerin arasındaki yaklaşık 250 bç'lik bölge çoğaltılmıştır.

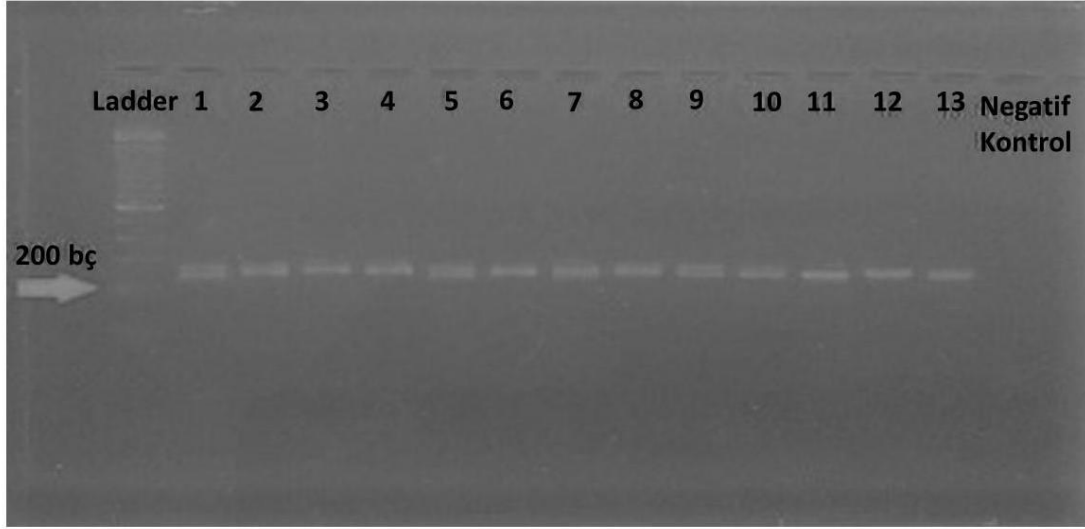
Denemeler sonucu amplifikasyonun başarıyla gerçekleştiği PZR döngüsü belirlenmiştir. İlk olarak DNA zincirini denatüre etmek için 2 dakika boyunca 94°C sıcaklık, primerin bağlanması ve zincirin sentezlenmesi için 30 döngü boyunca; 30 saniye 94°C, 30 saniye 51,5°C, 1 dakika 72°C sıcaklık ve en son zincirin uzatılması ve üzerindeki hataların onarımı için 10 dakika 72°C sıcaklık olarak uygulanan PZR döngüsü kullanılmıştır.

PZR amplifikasyonu SimpliAmp (Thermo) PZR cihazı ve 50 µl stok çözelti ile gerçekleştirilmiştir, hazırlanan çözeltinin içeriği ve miktarları Çizelge 3.2'de belirtildiği gibidir.

**Çizelge 3. 2.** 50 µl PZR çözeltisi içeriği ve miktarları.

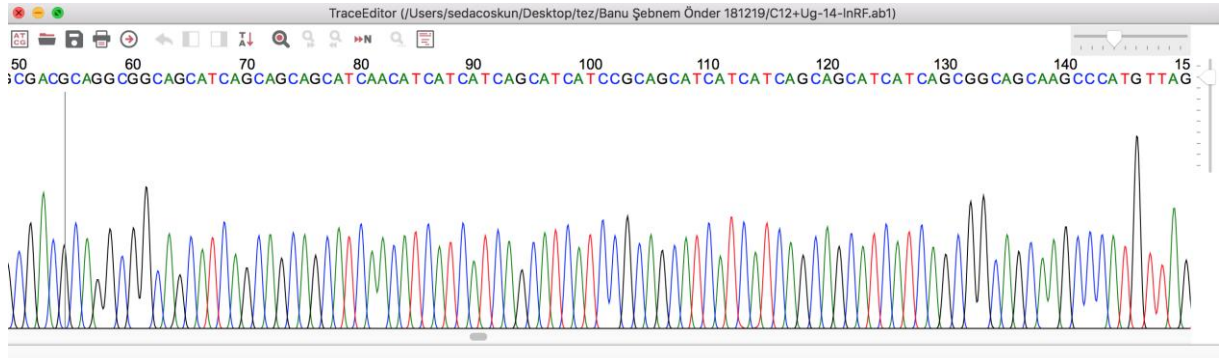
<b>Bileşenler</b>	<b>Final Konsantrasyon</b>	<b>Örnek Başına Hacim (µl)</b>
<b>dNTP</b>	2 mM	4
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2 mM	2
<b>Tampon</b>	1 X	5
<b>İleri (5') primer</b>	0,4 pmol	2
<b>Geri (3') primer</b>	0,4 pmol	2
<b>Taq polimeraz</b>	1 ünite/(µl)	0,025
<b>DNA</b>	1 (µg)	2
<b>Steril ve distile su</b>		32,75

Her örneğe ait 6 µl amplifikasyon ürünü %2'lik agaroz jel'de 100 bç hassasiyette DNA markörü ile yaklaşık 100 volt akım ile elektroforezde yürütülmüştür. Şekil 3.14'de görüldüğü üzere, 250 - 300 bç hizasında elde edilen net ve parlak bantlara ait amplifikasyon ürünleri hizmet alımı ile sekans analizine gönderilmiş, başarısız olan ürünler için amplifikasyon aşaması tekrar edilmiştir.



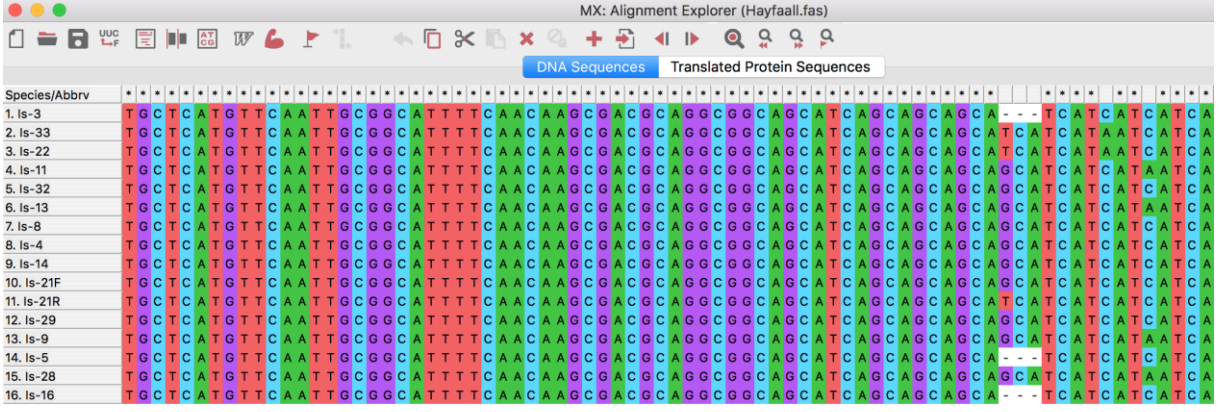
**Şekil 3. 14.** *InR* gen bölgesine ait PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.

Hizmet alımı sonucu elde edilen sekanslara ait kromotogram MEGA7 [102] adlı program kullanılarak görüntülenmiş (Şekil 3.15.) ve aynı program ile hizalanmış (Şekil 3.16.) ve polimorfizmler belirlenmiştir.



**Şekil 3. 15.** *InR* gen bölgesine ait sekans sonuçlarının kromatogram görüntüsü.





**Şekil 3. 16.** *InR* gen bölgesine ait sekans sonuçlarının hizalanması. (-) delesyonu ifade eder.

### 3.5. İstatiksel Analizler

Beş popülasyondan seçilen 75 soya ait diyapoz verileri; diyapozda (D), arada (ID), diyapozda değil (ND) şeklinde kategorilendirilmiştir. Analizler sırasında ID durumunda olan bireylerde az da olsa yumurta üretimi başlamış olduğu için ND olarak kullanılmıştır. Soyulara ait diyapoz frekansı SPSS (v.20) istatistik programı [169] yardımıyla hesaplanmıştır. Popülasyonlar arası diyapoz frekansının analiz edilmesi için, Pearson ki-kare testi gerçekleştirilmiştir. Aynı test popülasyona ait soyuların yani popülasyon içi karşılaştırmaların analizinde kullanılmıştır. Elde edilen veriler R programında (v.4.0.2) [170], “ggplot2” [45], “dplyr” [72], “forcats” [73], “hrbrthemes” [85] ve “viridis” [93] paketleri kullanılarak görselleştirilmiştir. Diyapoz deneyinin sonlandığı 28. gün, deney süresince ölen bireyler not edilmiş ve ölenler (0), hayatta olanlar (1) olarak kategorilendirilmiştir. SPSS (v.20) programı kullanılarak, popülasyonların soğuk koşullarda hayatta kalma frekansları hesaplanmıştır. Elde edilen veriler, diyapoz frekansı ile bağımlı iki örneklem t testi ile karşılaştırılmıştır.

Beş popülasyondan seçilen 75 soya ait bireylerin soğuk komasından kurtulma süreleri dakika, saniye ve salise bazında kaydedilmiştir. Süre verisi tamamen saliseye çevrilmiş ve analizler salise birimi üzerinden gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı SPSS (v.20) programında Kolmogorov Smirnov testi ile analiz edilmiştir. Normal dağılmadığı görülen veriler e tabanında logaritma (Ln) tabanında dönüştürülmüş, devamında yapılan tüm analizler Ln tabanında salise verisi ile gerçekleştirilmiştir.

SKKS verisine ait popülasyonlar arası ortalama değerler SPSS (v.20) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Eşeyler arası dimorfizmin belirlenmesi için SPSS (v.20)

kullanılarak eşeyler arası bağımsız t testi yapılmıştır. Eşeyler arası farkın yüksek olması nedeniyle devamında yapılan tüm analizler eşeyler için ayrı ayrı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler “doğrusal model” ile sonrasında *post-hoc* testleri ile analiz edilmiştir. Analizler R programı (v.4.0.2) [170] kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizde “lmTest” [75], “lsmmeans” [76], ve “emmeans” [167], paketleri kullanılmış, model oluştururken iç içe geçmiş rassal (random) faktörler bulunduğundan doğrusal model olan “lm” fonksiyonu kullanılarak analizler yapılmıştır. Model için sabit etkili (fixed effect) olarak “populasyon” belirlenmiştir. Rassal etkili (random effect) olarak da “soy hattı” ve “replikalar”, populasyon ile iç içe (nested) geçirilmiştir. İkili karşılaştırmalar için “Tukey” *post-hoc* testi kullanılmıştır. SKKS için eşeyler ayrı olarak kullanılan model

$$\text{lm}(\text{LnSKKS} \sim \text{Pop} + (1:\text{Soy}/\text{Pop}) + (1:\text{Rep}/\text{Soy}/\text{Pop}))$$

şeklinde oluşturulmuştur. Aynı test kullanılarak, populasyon içinde soylar arası fark analiz edilmiştir. Kullanılan model:

$$\text{lm}(\text{LnSKKS} \sim \text{Soy} + (1:\text{Rep} / \text{Soy}))$$

Elde edilen veriler R programı (v.4.0.2), “ggplot2” [45], “dplyr” [72], “forcats” [73], “hrbrthemes” [85] ve “viridis” [93] paketleri kullanılarak görselleştirilmiştir.

Beş populasyondan seçilen 74 soya ait bireylerin kuru vücut ağırlığı kaydedilmiştir. SPSS (v.20) adlı program kullanılarak Kolmogorov Smirnov testi ile veriler analiz edilmiş, verilerin normal dağıldığı görülmüştür.

KVA verisine ait populasyonlar arası ortalama değerler SPSS (v.20) adlı program kullanılarak analiz edilmiştir. Eşeyler arası farkın belirlenmesi için SPSS (v.20) kullanılarak eşeyler arası bağımsız t testi yapılmıştır. Eşeyler arası farkın istatistiksel olarak anlamlı olması nedeniyle devamında yapılan tüm analizler eşeyler ayrı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler “doğrusal model” ile sonrasında *post-hoc* testleri ile analiz edilmiştir. Analizler R programı (v.4.0.2) [170] kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Programda “lmTest” [75], “lsmmeans” [76], ve “emmeans” [167], paketleri kullanılmış, model oluştururken iç içe geçmiş rassal (random) faktörler bulunduğundan doğrusal model olan “lm” fonksiyonu kullanılarak analizler yapılmıştır. Model için sabit etkili (fixed effect) olarak populasyon belirlenmiştir. Rassal etkili (random effect) olarak da soy hattı

ve replikalar, populasyon ile iç içe (nested) geçirilmiştir. İkili karşılaştırmalar için “Tukey” *post-hoc* testi kullanılmıştır. KVA için eşeyler ayrı olarak kullanılan model

$$\text{lm(KVA} \sim \text{Pop} + (1:\text{Soy}/\text{Pop}) + (1:\text{Rep}/\text{Soy}/\text{Pop}))$$

şeklinde oluşturulmuştur. Aynı test kullanılarak, populasyon içinde soylar arası fark analiz edilmiştir. Kullanılan model:

$$\text{lm(KVA} \sim \text{Soy} + (1:\text{Rep} / \text{Soy}))$$

Elde edilen veriler R programı (v.4.0.2) [170], “ggplot2” [45], “dplyr” [72], “forcats” [73], “hrbrthemes” [85] ve “viridis” [93] paketleri kullanılarak görselleştirilmiştir.

Beş populasyondan seçilen 75 soya ait *InR* gen bölgesinin sekansı yapılmış diziler, MEGA versiyon X [102] adlı program ile hizalanmış ve aleller ve SNP’ler belirlenmiştir. Dizilerin polimorfik bölgeleri R programı (v.4.0.2) [170] “haplotypes” [135] paketi kullanılarak görselleştirilmiştir ve soylara ait indel matrisi oluşturulmuştur. Alellerin populasyonlar içindeki frekanslarının belirlenmesi için SPSS (v.20) adlı program kullanılmıştır. Populasyonlar arası alel frekansı verileri SPSS (v.20) programıyla Fisher exact testi ile analiz edilmiştir.

Elde edilen dizilerin moleküler analizleri DNAsp 6 [94] adlı program kullanılarak yapılmış, ayrılma bölgeleri sayısı, Watterson nükleotit çeşitliliği, ortalama nükleotit çeşitliliği, *Tajima'nın D* değeri, haplotip sayısı, haplotip çeşitliliği ve sabitleme endeksi ( $F_{ST}$ ) hesaplanmıştır. *InR* gen bölgesi üzerinde bulunan indel polimorfizmi ayrıca değerlendirilmeye alınmış ve indel sayısı, indel haplotip sayıları, indel ortalama nükleotit çeşitliliği, indel *Tajima'nın D* değeri hesaplanmıştır.

Elde edilen fenotipik ve genotip verilerin, populasyonların toplandıkları lokasyonlara ait iklimsel değişkenler, enlem, boylam ve yükseklik ile ilişkileri için en uygun regresyon modelinin bulunması ve analiz SPSS (v.20) programıyla gerçekleştirilmiştir. Fenotipik değişkenlerin birbiri ve çevresel değişkenler ile olan ilişkisinin yönü ve gücünü analiz etmek için gerçekleştirilen Korelasyon testleri de SPSS (v.20) programıyla yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Reprodüktif Diyapoz

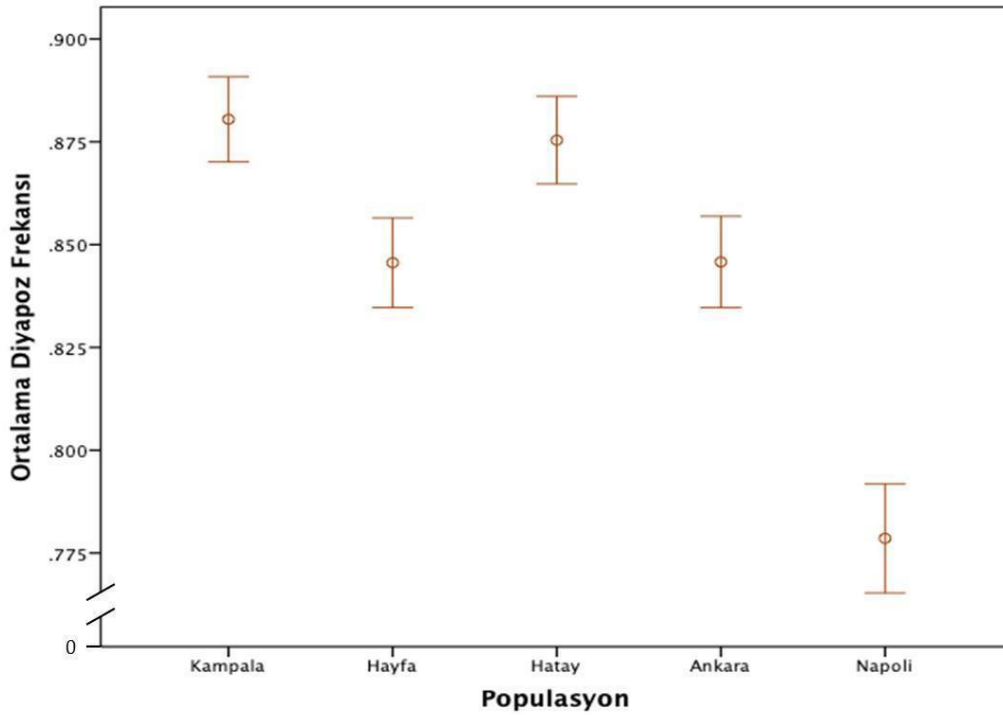
*D. simulans* bireylerinde diyapoz frekansının enlem ile ilişkisini incelemek için, dört farklı enlemden toplanmış 5 farklı populasyondan seçilen soylara ait bireylerin, laboratuvarında kış koşulları simüle edilerek diyapoza girmesi indüklenmiştir. Dişiler 11 °C'lik iklim dolabında tutuldukları 28. günün sonunda populasyonların diyapoz frekanslarını saptamak için disekte edilmiştir. Yapılan ovaryum diseksiyonları sonrası dişiler ovaryumlarındaki oosit gelişim aşamasına göre sınıflandırılarak populasyonlara ait diyapoz frekansları hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4. 1.** Populasyonlara ait ortalama diyapoz frekanslarına ait tanımlayıcı istatistikler.

	<b>Soy Hattı Sayısı</b>	<b>Birey Sayısı</b>	<b>Ortalama DF</b>	<b>ss</b>
<b>Kampala</b>	15	979	0,8805	0,3246
<b>Hayfa</b>	16	1101	0,8456	0,3615
<b>Hatay</b>	14	963	0,8754	0,3305
<b>Ankara</b>	16	1057	0,8458	0,3613
<b>Napoli</b>	14	980	0,7786	0,4154

**DF** diyapoz frekansı, **ss** Standart sapma

Elde edilen sonuçlara göre en fazla diyapoz frekansı gösteren populasyon %88 ile Kampala populasyonu olurken, en az diyapoz frekansı gösteren populasyon ise %78 ile Napoli populasyonu olmuştur. Diyapoz frekansı enleme bağlı kademeli bir değişim göstermemekle birlikte enlem arttıkça azalma eğilimi göstermiştir (Şekil 4.1.)

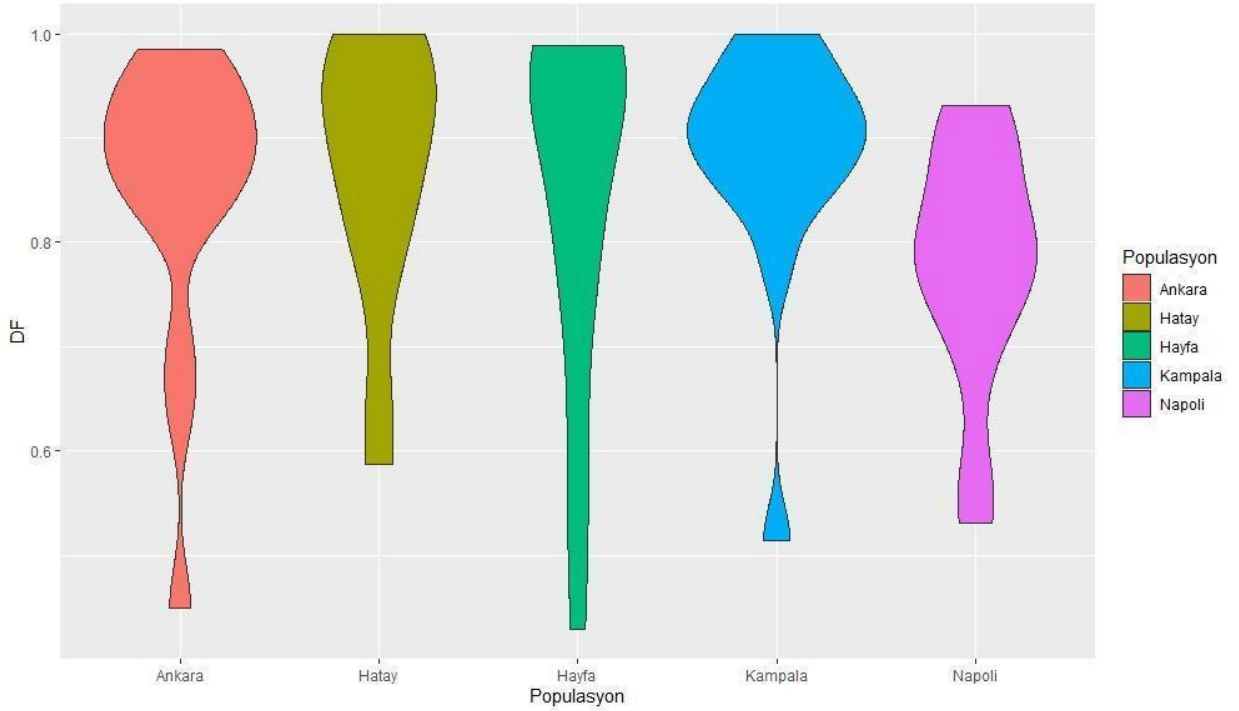


**Şekil 4. 1.** Populasyonların ortalama diyapoz frekansı  $\pm$ Standart hata.

Populasyonlara ait diyapoz frekansları Pearson ki-kare testi ile karşılaştırılmış ve populasyonların diyapoz frekansları bakımından birbirinden anlamlı derecede ( $p < 0,001$ ) farklılaştığı bulunmuştur.

Populasyonlar arası farklılıklar ikili karşılaştırmalar yapılarak ki-kare testi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre, Napoli populasyonu tüm diğer populasyonlarla anlamlı derecede farklılık göstermiştir ( $p < 0,001$ ). Ayrıca Kampala populasyonu da Ankara ( $p = 0,020$ ) ve Hayfa ( $p = 0,021$ ) populasyonları ile anlamlı farklılık göstermiştir. Bunlar dışındaki populasyonlar arası ikili karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Populasyon içi, yani soy hatları arasında farklılıklar Pearson ki-kare testi ile analiz edilmiş ve populasyon içi yani soylar arası varyasyon anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).



**Şekil 4. 2.** Diyapoz frekanslarının populasyon dağılım ve yoğunluklarının viyolonsel grafiği.

Diyapoz koşullarının oluşturulduğu deney sırasında soğuk koşullara maruz bırakılan bireyler, 28. gün sonunda hayatta kalan ve ölenler olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.2.).

**Çizelge 4. 2.** Bireylerin 28 gün sonunda hayatta kalım istatistikleri.

	Canlı	Ölü	Toplam	Hayatta Kalım
<b>Kampala</b>	979	257	1236	%79
<b>Hayfa</b>	1101	189	1290	%85
<b>Hatay</b>	963	269	1232	%78
<b>Ankara</b>	1057	360	1417	%75
<b>Napoli</b>	980	205	1185	%83

Populasyonların diyapoza girme frekansı ve soğuk koşullarda hayatta kalma frekansı, bağımlı iki örneklem t testi ile analiz edilmiş aralarında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $t = 1,423$ ;  $p = 0,228$ ). Yaşayabilirlik en yüksek Hayfa populasyonunda en düşük ise Ankara populasyonunda görülmüştür.

## 4.2. Soğuk Komadan Kurtulma Süresi

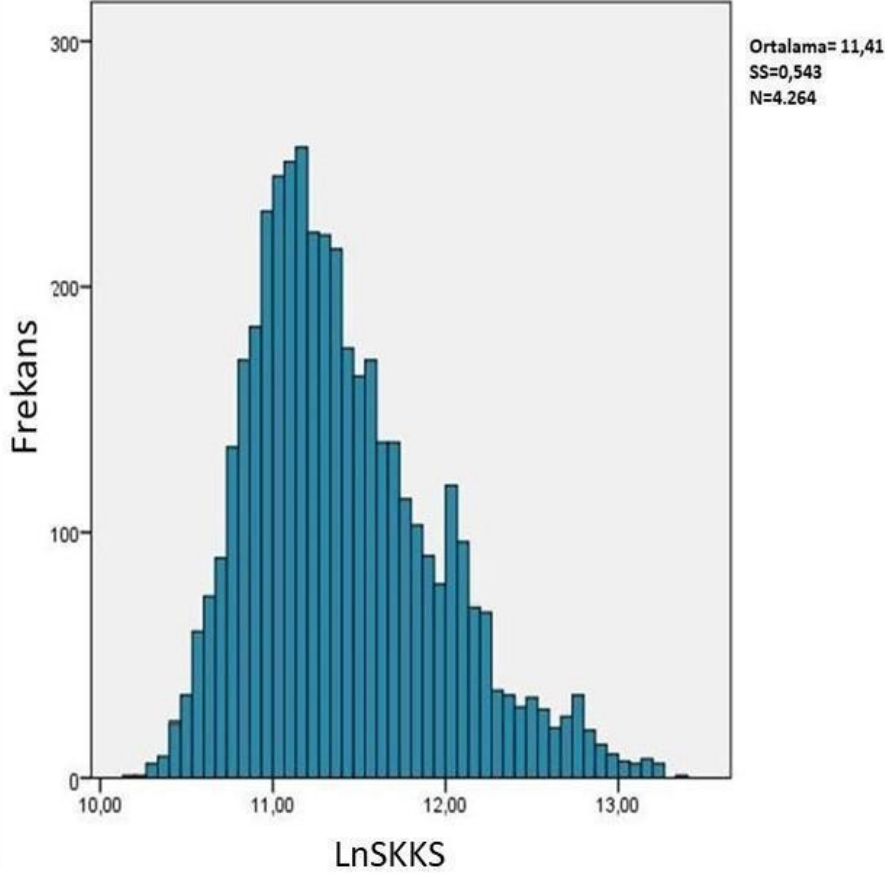
*D. simulans* bireylerinde soğuk komasından kurtulma sürelerinin belirlemek için, dört farklı enlemden toplanmış 5 farklı populasyondan seçilen soylara ait bireyler, 0°C derecede 1 saat bekletilerek soğuk komasına girmesi sağlanmış, daha sonra SKKS'leri salise bazında kaydedilmiştir.

Elde edilen veriler normal dağılım göstermediği için, e tabanında logaritma (ln) dönüşümü yapılmış ve Şekil 4.3'de görüleceği gibi veriler normal bir dağılım kazandıktan sonra analizler yapılmıştır. Populasyonlara ait ortalama SKKS'leri Çizelge 4.3.'de verilmektedir.

**Çizelge 4. 3.** Populasyonların ortalama soğuk komasından kurtulma sürelerine ait tanımlayıcı istatistikler (SKKS'ler salise olarak verilmiştir).

	Dişi			Erkek			Toplam		
	Ortalama SKKS	n	ss	Ortalama SKKS	n	ss	Ortalama SKKS	n	ss
<b>Kampala</b>	94.602	420	52.366	102.164	430	59.747	98.428	850	56.315
<b>Hayfa</b>	129.308	439	100.298	112.063	437	78.582	120.705	876	90.482
<b>Hatay</b>	129.812	444	109.269	106.983	445	72.478	118.384	889	93.346
<b>Ankara</b>	102.278	405	61.195	89.286	417	50.545	95.687	822	56.388
<b>Napoli</b>	93.941	411	65.379	100.376	416	53.534	97.178	827	59.766

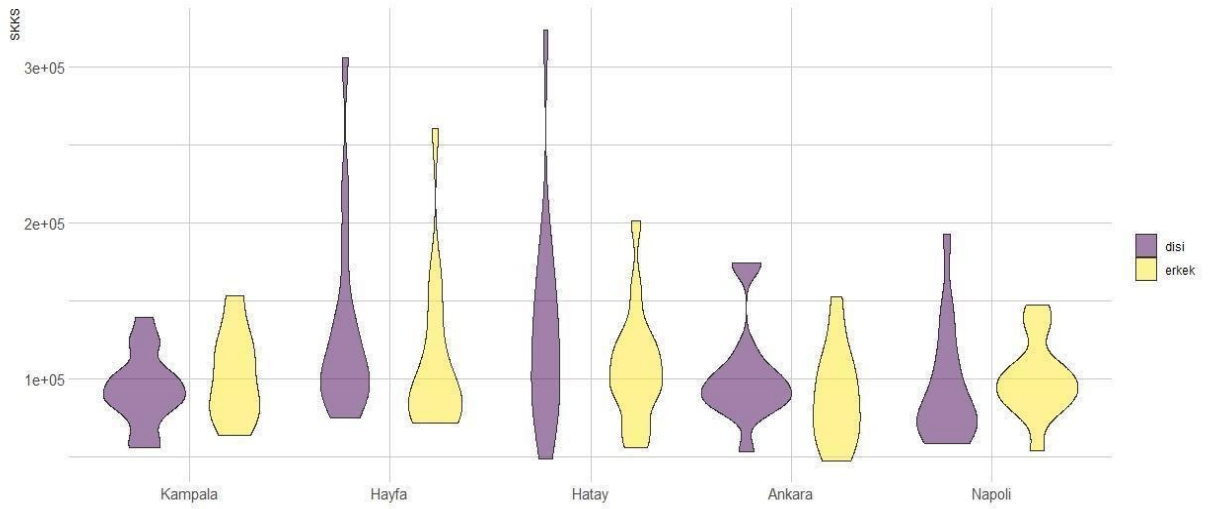
n, birey sayısı; ss, standart sapma.



**Şekil 4. 3.** Ln tabanında dönüştürülmüş soğuk komasından kurtulma süresi (SKKS) verilerinin dağılımı.

Elde edilen verilere göre ortalama SKKS en yüksek olan populasyonlar 120.705 ve 118.384 salise ile sırasıyla Hayfa ve Hatay populasyonları olmuştur. Ankara ve Napoli populasyonları ise 95.684 ile 97.178 salise ile en kısa sürede soğuk komasından kurtulma süresine sahip populasyonlar olmuştur (Çizelge 4.3.). Söz konusu fenotipin eşeyssel dimorfizm gösterdiği bilindiği için eşeyler arası fark bağımsız t testi ile analiz edilmiş ve her populasyonun anlamlı derecede eşeyssel farklılık gösterdiği bulunmuştur. Kampala ve Napoli populasyonlarında dişiler erkeklerden daha hızlı bir şekilde soğuk komasından kurtulurken, diğer populasyonlarda erkeklerin daha hızlı bir şekilde soğuk komasından kurtulduğu görülmüştür (Şekil 4.4.).





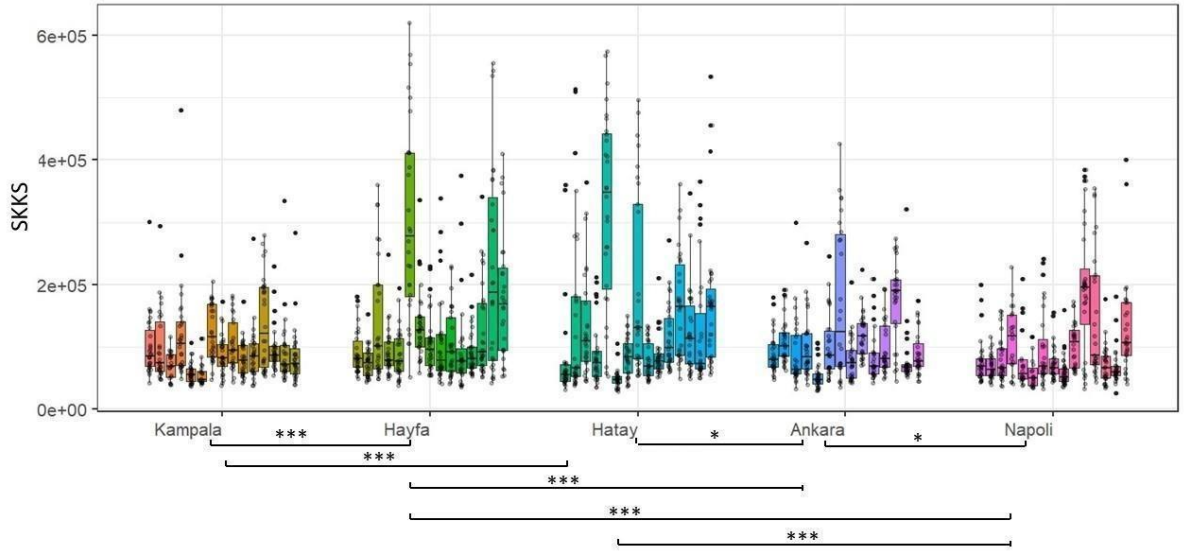
**Şekil 4. 4.** SKKS'lerinin populasyon dağılım ve yoğunluklarının eşey ayrı viyolonsel grafiği. y eksenini salise olarak SKKS'ni vermektedir. Mor dişi, sarı erkeklere ait dağılımları göstermektedir.

Elde edilen bilgiler doğrultusunda gerçekleştirilecek analizler eşeyler ayrı olarak yapılmıştır.

#### 4.2.1. Dişilerin Soğuk Komadan Kurtulma Süresi

Populasyonlar arası dişi bireylerin soğuk komasından kurtulma süresi, doğrusal model ile analiz edilmiş ve populasyonların anlamlı derece farklılık gösterdiği bulunmuştur ( $F=18,049$ ;  $p<0,001$ ). Çizelge 4.3'de populasyonların ortalama soğuk komasından kurtulma süreleri verilmektedir.

Çizelge 4.3'de görüldüğü üzere soğuk komasından en hızlı kurtulan dişi bireyler Napoli populasyonuna ait iken en yavaş kurtulan dişi bireyler ise Hayfa populasyonuna aittir. Şekil 4.5'de tüm soy hatlarına ait dişi SKKS sonuçları kutu grafiği olarak özetlenmekte ve populasyonlar arası *post-hoc* test sonuçları verilmektedir.



**Şekil 4. 5.** Populasyonlara ait tüm soy hatlarının dişilerinin ortalama soğuk komasından kurtulma süreleri. Populasyonların Tukey *post-hoc* testi ile yapılan ikili karşılaştırma sonuçları x ekseninin altında verilmektedir. \*:  $p < 0,05$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

SKKS populasyonlar arası anlamlılık derecesi Tukey *post-hoc* çoklu karşılaştırma testi ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.5.'de sunulmuştur. İkili karşılaştırma sonuçlarına göre Hayfa ve Hatay populasyonları birbiri arasında farklılık göstermezken bu iki populasyon diğer tüm populasyonlarla anlamlı derecede farklılık göstermiştir. Ankara ile Napoli populasyonları arasındaki fark ise  $p = 0,034$  olarak hesaplanmıştır. Populasyonlara ait dişi bireyler kendi içlerinde soy hattına bağlı olarak gösterdiği soğuk komasından kurtulma süresi doğrusal model ile analiz edilmiş ve soylar birbirinden anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

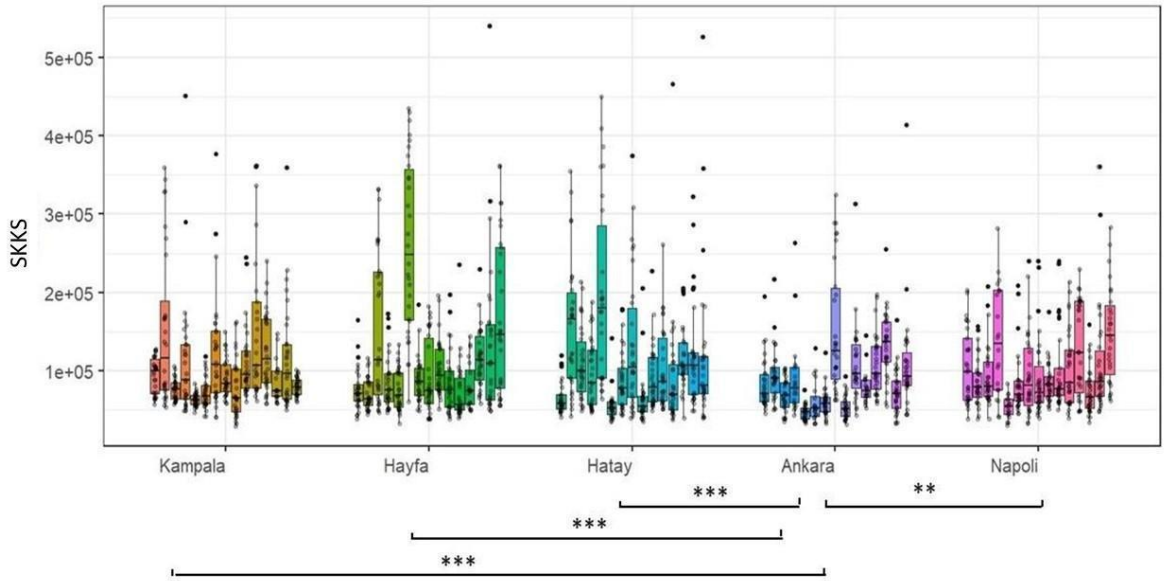
Soylar arasında SKKS farklılığı en yüksek olan populasyon Hatay, soylar arası farklılığın en az olduğu populasyon ise Kampala populasyonudur. Dişi bireylerin ise SKKS bakımından gösterdiği populasyon içi farklılık populasyonlar arası farklılıktan düşüktür.

#### 4.2.2. Erkeklerin Soğuk Komadan Kurtulma Süresi

Populasyonlar arası erkek bireylerin SKKS, doğrusal model ile analiz edilmiş ve populasyonların anlamlı derece farklılık gösterdiği bulunmuştur ( $F = 7.5713$ ;  $p < 0,001$ ).

Çizelge 4.3'de populasyonlar arası ortalama soğuk komasından kurtulma süreleri sunulmuştur.

Çizelge 4.3'de görüldüğü üzere soğuk komasından en hızlı kurtulan erkek bireyler Ankara populasyonuna ait iken en yavaş kurtulan erkek bireyler ise Hayfa populasyonuna aittir. Şekil 4.6'da tüm soy hatlarına ait erkek SKKS sonuçları kutu grafiği olarak özetlenmekte ve populasyonlar arası *post-hoc* test sonuçları verilmektedir.



**Şekil 4. 6.** Populasyonlara ait tüm soy hatlarının erkeklerinin ortalama soğuk komasından kurtulma süreleri. Populasyonların Tukey *post-hoc* testi ile yapılan ikili karşılaştırma sonuçları x ekseninin altında verilmektedir. \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

SKKS populasyonlar arası anlamlılık derecesi Tukey *post-hoc* çoklu karşılaştırma testi ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.6.'de sunulmuştur. İkili karşılaştırma sonuçlarına göre sadece Ankara populasyonu erkek bireylerinin SKKS'si diğer populasyonlar ile anlamlı derecede farklılık göstermiştir.

Populasyonlara ait erkek bireyler kendi içlerinde soy hattına bağlı olarak gösterdiği SKKS doğrusal model ile analiz edilmiş ve soylar birbirinden anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

Soylar arasında SKKS farklılığı en yüksek olan populasyon Ankara, soylar arası farklılığın en az olduğu populasyon ise Napoli populasyonudur. Napoli hariç diğer

populasyonlarda erkek bireylerin SKKS bakımından populasyon içi farklılık populasyonlar arası farklılıktan düşüktür.

### 4.3. Kuru Vücut Ağırlığı

*D. simulans* bireylerinde KVA fenotipini belirlemek için, dört farklı enlemden toplanmış 5 farklı populasyondan seçilen soylara ait bireyler, vücutlarındaki tüm sıvı miktarı buharlaştırılana kadar kurtulmuş, daha sonra hassas terazi ile her birey tek tek tartılmış ve ağırlıkları kaydedilmiştir.

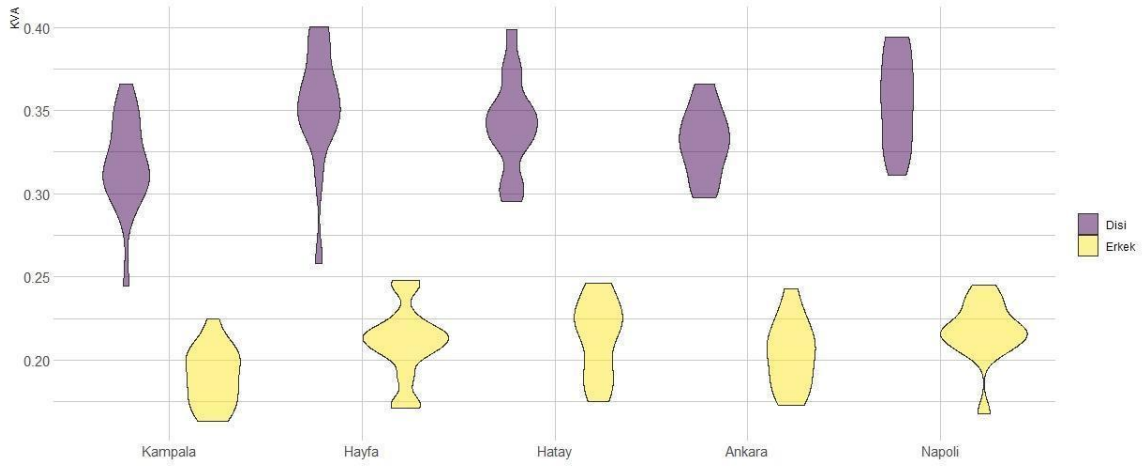
Populasyonların KVA ortalamaları Çizelge 4.4.'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar ortalama kuru vücut ağırlığı en yüksek olan populasyonun Napoli, en düşük olan populasyonun ise Kampala olduğunu göstermiştir.

**Çizelge 4. 4.** Populasyonların ortalama kuru vücut ağırlığına ait tanımlayıcı istatistikler.

	Dişi			Erkek			Toplam		
	Ortalama KVA (mg)	n	ss	Ortalama KVA (mg)	n	ss	Ortalama KVA (mg)	n	ss
<b>Kampala</b>	0,318	180	0,044	0,190	180	0,025	0,254	360	0,073
<b>Hayfa</b>	0,352	140	0,050	0,211	140	0,029	0,281	280	0,082
<b>Hatay</b>	0,340	150	0,044	0,215	150	0,031	0,277	300	0,073
<b>Ankara</b>	0,329	150	0,046	0,204	150	0,029	0,267	300	0,074
<b>Napoli</b>	0,354	150	0,049	0,214	150	0,033	0,284	300	0,082

n, örneklem sayısı; ss, standart sapma.

KVA fenotipinin eşeysel dimorfizm gösterdiği bilindiği için veriler eşeyler arası farkın belirlenmesi için bağımsız t testi ile analiz edilmiş ve her populasyonun eşeyler arasındaki ağırlık farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p < 0.001$ ) (Şekil 4.7.).



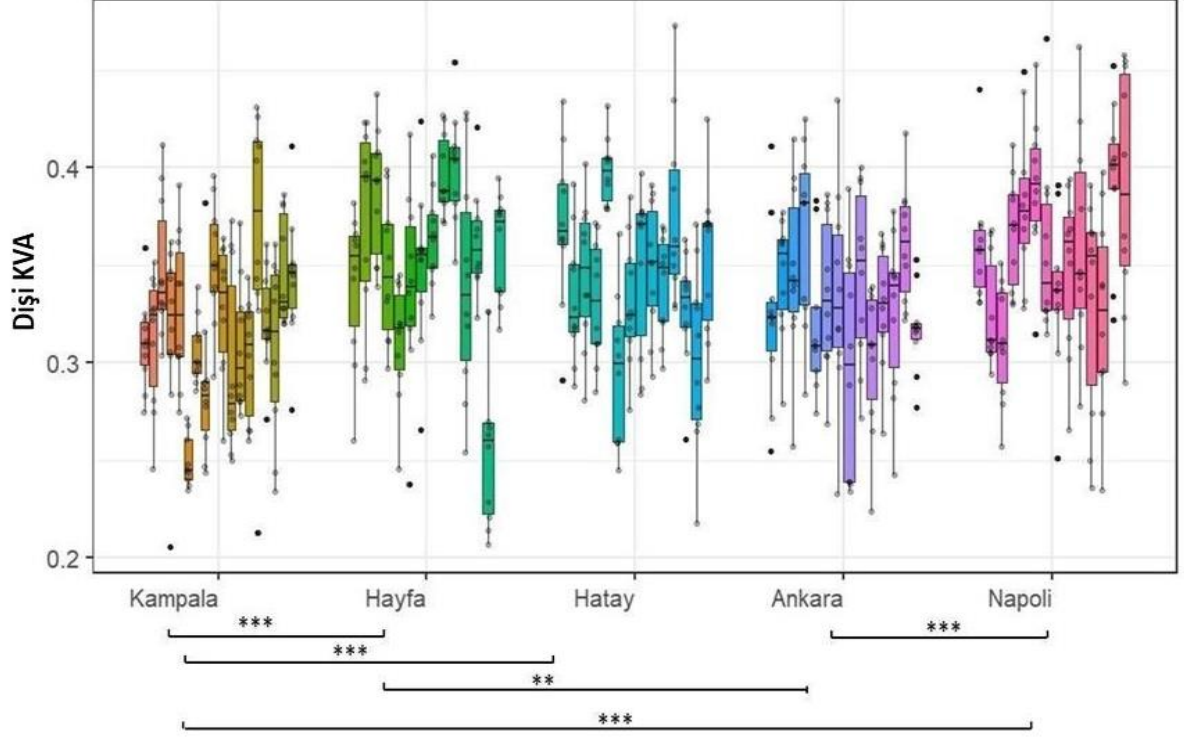
**Şekil 4. 7.** KVA verilerinin popülasyon dağılımlarının ve yoğunluğunun eşey ayrı viyolonsel grafiği. KVA mg cinsinden gösterilmektedir. Mor dişi, sarı erkeklere ait dağılımları göstermektedir.

Elde edilen bilgiler doğrultusunda analizler eşey ayrı olarak gerçekleştirilmiştir.

#### 4.3.1. Dişilerin Kuru Vücut Ağırlığı

Popülasyonlar arası dişi bireylerin kuru vücut ağırlığı, doğrusal model ile analiz edilmiş ve popülasyonların anlamlı derece farklılık gösterdiği bulunmuştur ( $F= 17,526$ ;  $p<0,001$ ). Çizelge 4.4'da popülasyonlar arası ortalama KVA bilgisi sunulmuştur.

Çizelge 4.4'de görüldüğü üzere kuru vücut ağırlığı en fazla olan dişi bireyler Napoli ve Hayfa popülasyonlarına ait iken en düşük ağırlığa sahip dişi bireyler ise Kampala popülasyonuna aittir. Şekil 4.8'de tüm soy hatlarına ait dişi ağırlık sonuçlar kutu grafiği olarak özetlenmekte ve popülasyonlar arası *post-hoc* test sonuçları verilmektedir.



**Şekil 4. 8.** Populasyonlara ait tüm soy hatlarının dişlerinin ortalama kuru vücut ağırlığı. Populasyonların Tukey *post-hoc* testi ile yapılan ikili karşılaştırma sonuçları x ekseninin altında verilmektedir. \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

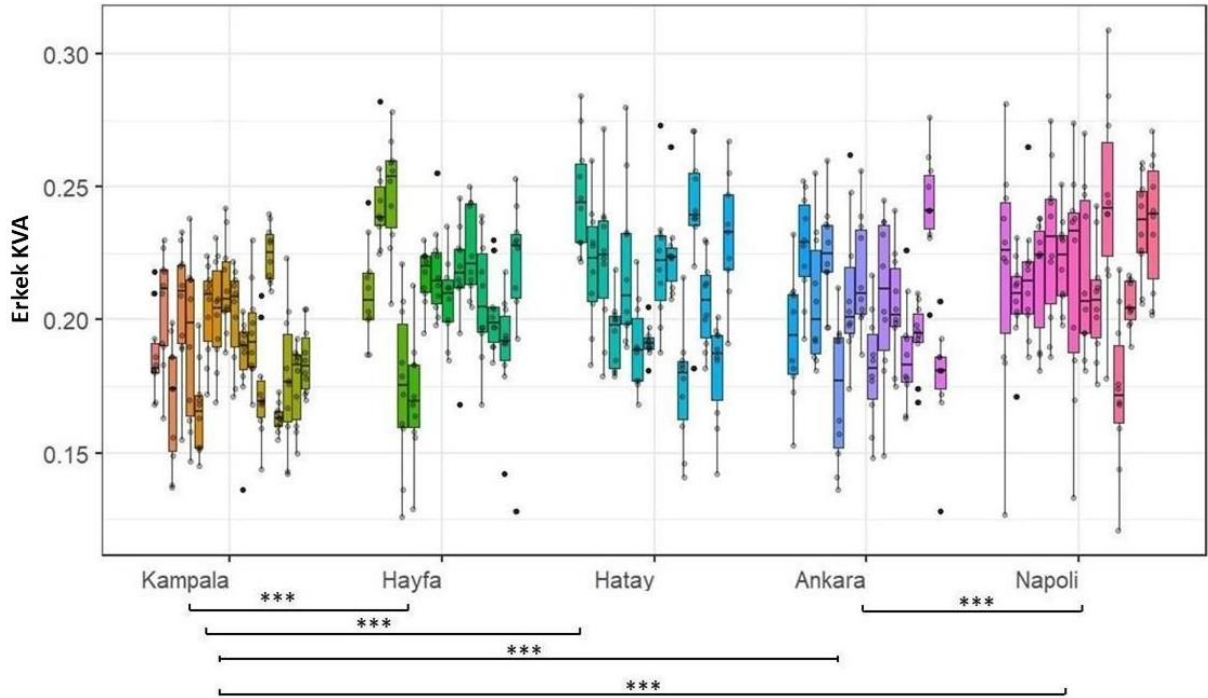
Fenotipe göre populasyonların birbiri ile ilişkisini anlamak için, veriler Tukey *post-hoc* çoklu karşılaştırma testi ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.8.'de sunulmuştur. Şekil 4.8'de görüleceği gibi, Kampala populasyonu Hayfa, Hatay ve Napoli ile Ankara populasyonu ise Hayfa ve Napoli populasyonları ile istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık göstermiştir.

Populasyonlara ait dişi bireyler kendi içlerinde soy hattına bağlı olarak gösterdiği kuru vücut ağırlığı fenotipi açısından karşılaştırıldığında ise, soylar birbirinden anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). Soylar arasında fenotipik çeşitliliğin en yüksek olduğu populasyon Hayfa iken, birbirine en yakın fenotipik cevaplar veren populasyon ise Ankara olmuştur. Populasyonların hiçbirinde dişi bireylerin gösterdiği populasyon içi fenotipik çeşitlilik, populasyonlar arası çeşitlilikten fazla çıkmamıştır. Şekil 4.5'de soyların kuru vücut ağırlığı dağılımları gösterilmektedir.

### 4.3.2. Erkeklerin Kuru Vücut Ağırlığı

Populasyonlar arası erkek bireylerin kuru vücut ağırlığı, doğrusal model ile analiz edilmiş ve populasyonların anlamlı derece farklılık gösterdiği bulunmuştur ( $F= 21,887$ ;  $p<0,001$ ). Çizelge 4.4.'de populasyonlar arası ortalama kuru vücut ağırlığı bilgisi sunulmuştur.

Çizelge 4.4'de görüldüğü üzere kuru vücut ağırlığı en fazla olan erkek bireyler Hatay ve Napoli populasyonlarına ait iken en düşük ağırlığa sahip erkek bireyler ise Kampala populasyonuna aittir. Şekil 4.9'da tüm soy hatlarına ait erkek ağırlık sonuçlar kutu grafiği olarak özetlenmekte ve populasyonlar arası *post-hoc* test sonuçları verilmektedir.



**Şekil 4. 9.** Populasyonlara ait tüm soy hatlarının erkeklerinin ortalama kuru vücut ağırlığı. Populasyonların Tukey *post-hoc* testi ile yapılan ikili karşılaştırma sonuçları x ekseninin altında verilmektedir. \*\*\*:  $p<0.001$ .

Fenotipe göre populasyonların birbiri ile ilişkisini anlamak için, veriler Tukey çoklu karşılaştırma testi ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.9.'da sunulmuştur. Elde edilen bilgilere göre Kampala populasyonu diğer tüm populasyonlar ile ve Ankara populasyonu Napoli populasyonu ile anlamlı derecede farklılık göstermiştir.

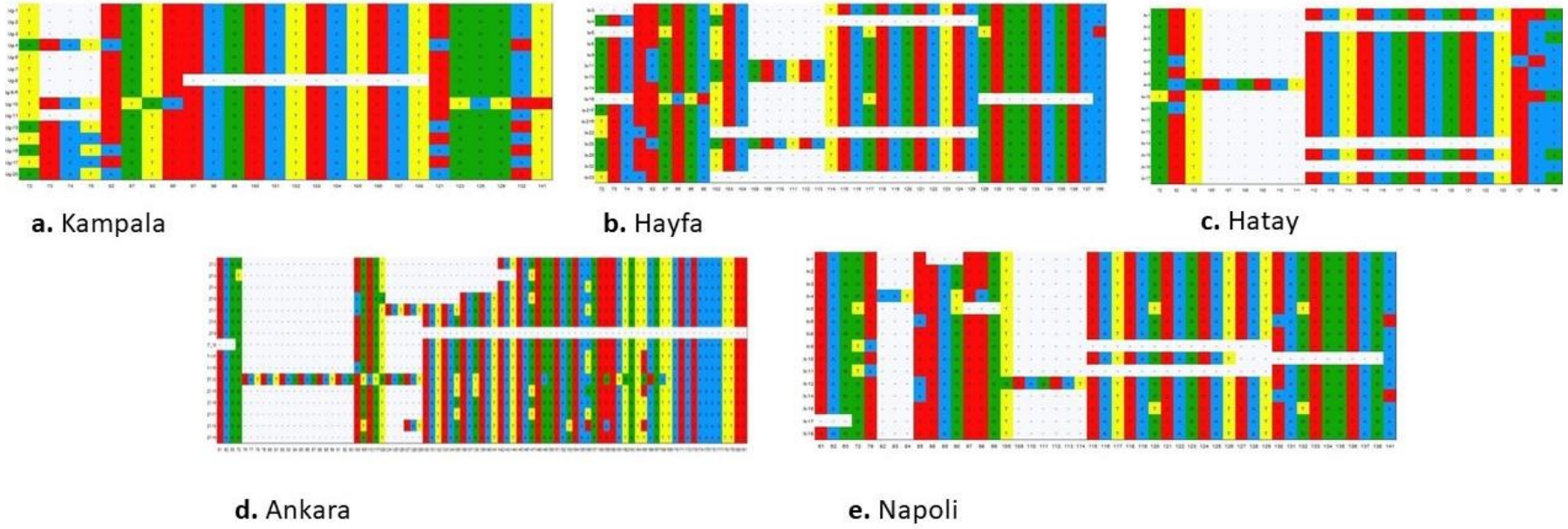
Populasyonlara ait erkek bireyler kendi içlerinde soy hattına bağılı olarak gösterdiği kuru vücut ağırlığı fenotipi açısından karşılaştırılmıştır soylar birbirinden anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). Soylar arasında fenotipik çeşitliliğin en yüksek olduğu populasyon Hayfa ve Hatay iken, birbirine en yakın fenotipik cevaplar veren populasyon ise Napoli olmuştur. Populasyonların hiçbirinde erkek bireylerin gösterdiği populasyon içi fenotipik çeşitlilik, populasyonlar arası çeşitlilikten fazla çıkmamıştır. Şekil 4.9'da soyların kuru vücut ağırlığı dağılımları gösterilmektedir.

#### **4.4. *InR* Gen Bölgesi**

##### **4.4.1. *InR* Alel Dağılımı**

*InR* geninin 1. ekzonunda bulunan polimorfik bölge PZR amplifikasyonu ile çoğaltılmış ve sekans sonuçları elde edilmiştir. Elde edilen diziler MEGA versiyon X [102] adlı program ile hizalanmış ve polimorfik bölgeler R programı (v.4.0.2) [170], "haplotypes" [135] ile görselleştirilmiştir (Şekil 4.10.), diziler sahip oldukları indel polimorfizminin uzunluğuna göre birbirinden ayrılmış toplam 9 adet alel belirlenmiştir. Bu aleller sahip oldukları uzunluklara göre 233, 236, 239, 245, 248, 251, 254, 257 ve 275 şeklinde isimlendirilmiştir (Çizelge 4.4.). Polimorfizm gösteren bölgeler Kampala populasyonunda 72. ve 141. bç arasında (Şekil 4.10. a), Hayfa ve Hatay populasyonlarında 72. ve 156 bç arasında (Şekil 4.10. b, c), Ankara populasyonunda 61. ve 192. bç arasında (görsel 181. baza kadar verilmiştir) (Şekil 4.10. d) ve Napoli populasyonunda 61. ve 141. bç arasında (Şekil 4.10. e) bulunmuştur.



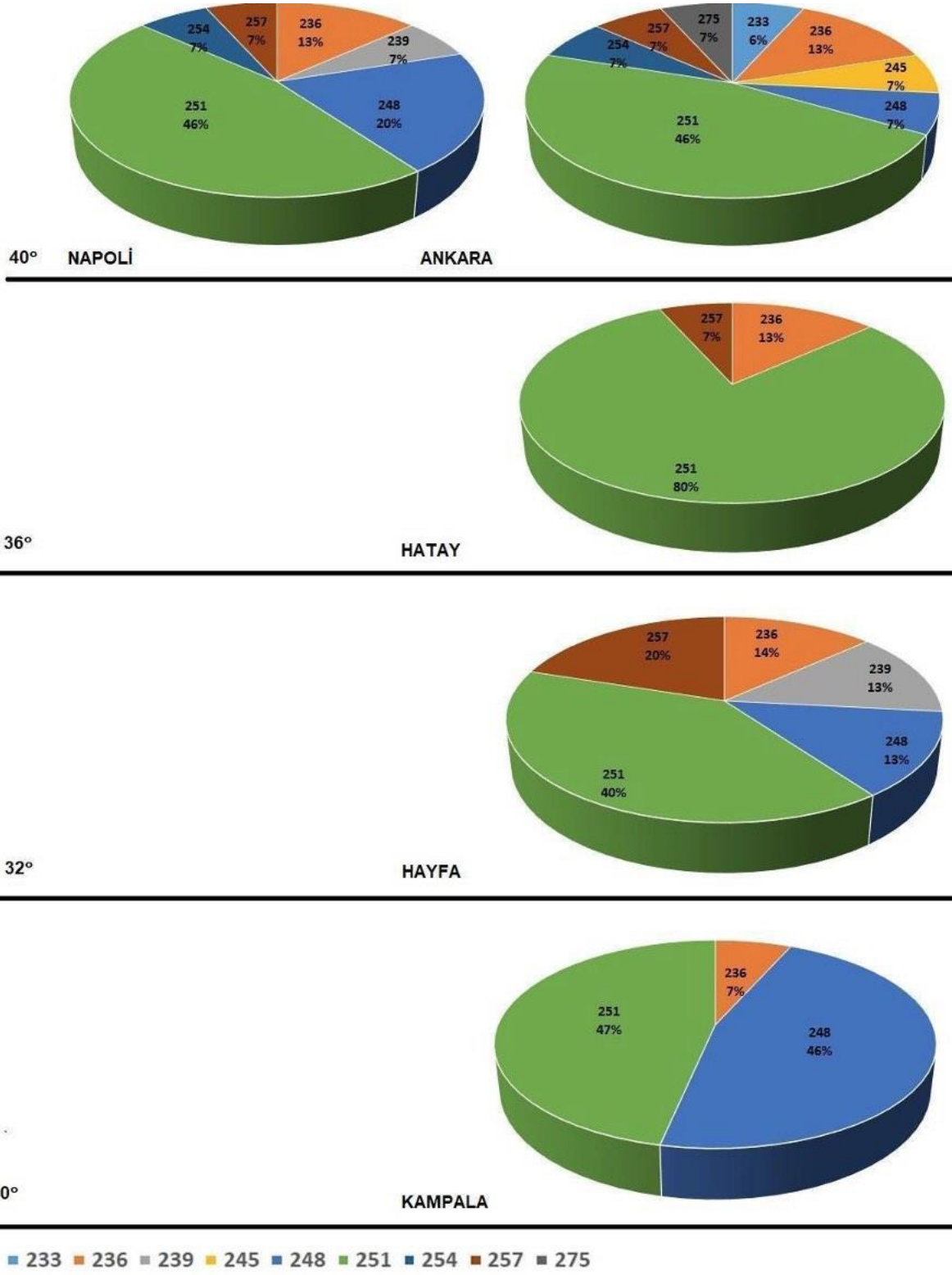


**Şekil 4. 10.** Amplifiye edilen *InR* gen bölgesinin polimorfizm gösteren bölgeleri. **a.** Kampala popülasyonuna ait soy hatları, **b.** Hayfa popülasyonuna ait soy hatları, **c.** Hatay popülasyonuna ait soy hatları, **d.** Ankara popülasyonuna ait soy hatları, **e.** Napoli popülasyonuna ait soy hatları.

Populasyonlar sahip oldukları alel dağılımına göre incelenmiş ve Fisher exact testi sonuçlarına göre ( $p>0,05$ ) birbirlerinden anlamlı derecede farklı alel dağılımına sahip çıkmamışlardır. Şekil 4.8'de görüleceği üzere alel çeşitliliği Uganda ve Hatay populasyonunda en az iken, Ankara populasyonu en yüksek çeşitliliği göstermiştir.

Tüm populasyonlarda yaygın görülen 251 (%52) aleli, Hatay populasyonu hariç tutulduğunda enlem değişikçe populasyonlar içindeki frekansını değiştirmemiştir. 236 aleli (%12) her populasyonda benzer frekansta dağılım göstermiştir. 257 aleline Kampala hariç tüm populasyonlarda (%8) rastlanmıştır. 248 aleline Hatay dışında tüm populasyonlarda rastlanmıştır (%17,3). 239 aleline yalnızca Hayfa ve Napoli populasyonlarında (%4) rastlanmış, 254 aleli Ankara ve Napoli populasyonunda (%2,7) görülmüş, 233, 245 ve 275 alleleri ise yalnızca Ankara populasyonunda karşımıza çıkan nadir aleller (%1,3) olmuştur (Şekil 4.11.).

Populasyonlarda yaygın görülen 13 SNP (tek nükleotid polimorfizmi) belirlenmiştir. 17405543 noktasında T/G, 17405565 noktasında A/C, 17405571 noktasında A/C, 17405576 noktasında T/G, 17405584 noktasında A/C, 17405597 noktasında T/G, 17405603 noktasında T/G, 17405606 noktasında T/G, 17405609 noktasında T/G, 17405616 noktasında A/C, 17405618 noktasında T/G, 17405627 noktasında A/C ve A/T, 17405645 noktasında A/G ve A/C belirlenmiştir.



Şekil 4. 11. *InR* gen bölgesinin popülasyonlara göre alel dağılımı.

#### 4.4.2. *InR* Gen Bölgesi Analizi

*D. simulans* populasyonlarında *InR* gen bölgesine ait polimorfizmler DNAsp programı [94] ile analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'de sunulmuştur.

Çizelge 4. 5. *InR* gen bölgesine ait analiz sonuçları.

	n	S	$\theta$	$\pi$	TajD	FuFs	nHap	Hd
Kampala	15	11	3,383	0,018	-0,903	2,043	6	0,762
Hayfa	16	7	2,11	0,011	-1,241	-0,643	9	0,883
Hatay	15	6	1,845	0,011	-0,538	-2,677	8	0,886
Ankara	16	6	1,808	0,011	-1,214	-1,214	14	0,975
Napoli	15	5	1,538	0,011	-0,49	-0,841	10	0,924

n,örneklem sayısı; S, ayrılma bölgeleri sayısı;  $\theta$ , Watterson nükleotit çeşitliliği;  $\pi$ , ortalama nükleotit çeşitliliği; TajD, Tajima'nın D değeri; FuFs, Fu'nun Fs değeri; nHap, haplotip sayısı; Hd, haplotip çeşitliliği.

Elde edilen sonuçlara göre enlem arttıkça, *InR* gen bölgesi üzerinde polimorfizm gösteren bölgeler ve nükleotit çeşitliliği azalmış, haplotip sayıları ve çeşitliliği ise artmıştır. Tajima'nın D'si ise, tüm populasyonlarda negatif olup Hayfa ve Ankara populasyonlarının diğer populasyonlara göre, daha düşük sonuçlar verdiği görülmüştür. Fu'nun Fs'i Kampala'da pozitif iken diğer tüm populasyonlarda negatif değere sahiptir. Tüm populasyonlarda elde edilen Tajima'nın D'si ve Fu'nun Fs'i istatistiksel olarak anlamsızdır.

*InR* gen bölgesi üzerinde bulunan indel polimorfizmi ayrıca değerlendirmeye alınmıştır. DNAsp programı [94] ile analiz edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.6.'de sunulmuştur.

Çizelge 4. 6. *InR* gen bölgesi üzerinde bulunan indel polimorfizmine ait analiz sonuçları.

	İndel Sayısı	nHap	Hd	$\pi$	TajD
Kampala	2	3	0,600	0,004	0,221
Hayfa	5	6	0,783	0,009	0,003
Hatay	2	3	0,448	0,005	0,628
Ankara	2	3	0,242	0,002	-1,498
Napoli	7	8	0,790	0,008	-1,498

İndel nHap, haplotip sayıları; Hd, haplotip çeşitliliği;  $\pi$ , ortalama nükleotit çeşitliliği; TajD, İndel Tajima'nın D değeri.

Çizelge 4.5.'de sunulan bilgilere göre en fazla indel polimorfizmine sahip, indel haplotip sayısı ve çeşitliliği en yüksek populasyon Napoli olmuştur. Aynı parametreler açısından ikinci olan populasyon Hayfa ise en yüksek indel nükleotid çeşitliliğini göstermiştir. Kampala, Hatay ve Ankara populasyonu söz konusu parametreler için birbirine yakın sonuçlar vermiştir. İndel polimorfizmleri için hesaplanan *Tajima'nın D'sine* göre, Ankara ve Napoli populasyonlarının negatif değerlere sahip olduğu görülmüştür.

Populasyonlar arası yapılan  $F_{ST}$  analizleri sonuçları Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre *InR* gen bölgesi bakımından birbirine en yakın iki populasyon Hayfa ve Hatay olurken en uzak populasyonlar ise Kampala ve Hatay populasyonları olmuştur.

**Çizelge 4. 7.** Populasyonlar arası  $F_{ST}$  değerleri.

Lokasyon 1	Lokasyon 2	$F_{st}$
Kampala	Hayfa	0,80
Kampala	Hatay	0,86
Kampala	Ankara	0,81
Kampala	Napoli	0,85
Hayfa	Hatay	0,39
Hayfa	Ankara	0,78
Hayfa	Napoli	0,78
Hatay	Ankara	0,81
Hatay	Napoli	0,83
Ankara	Napoli	0,77

$F_{ST}$ , sabitleme endeksi

#### 4.4. Regresyon ve Korelasyon Analizleri

Çalışma sırasında elde edilen fenotipik ve genotip verilerinin populasyonların toplandıkları bölgelerin iklimsel ve coğrafi parametreler ile ilişki içerisinde olup

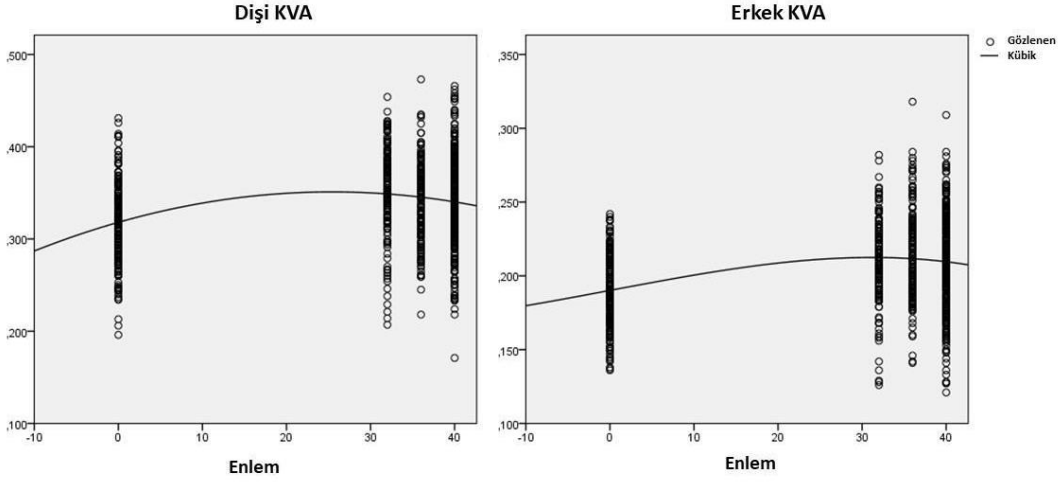
olmadıklarını analiz etmek için regresyon analizi, bu değişkenler arasındaki ilişkinin yönü ve gücünü belirlemek için ise korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir.

#### 4.4.1 Regresyon Analizi

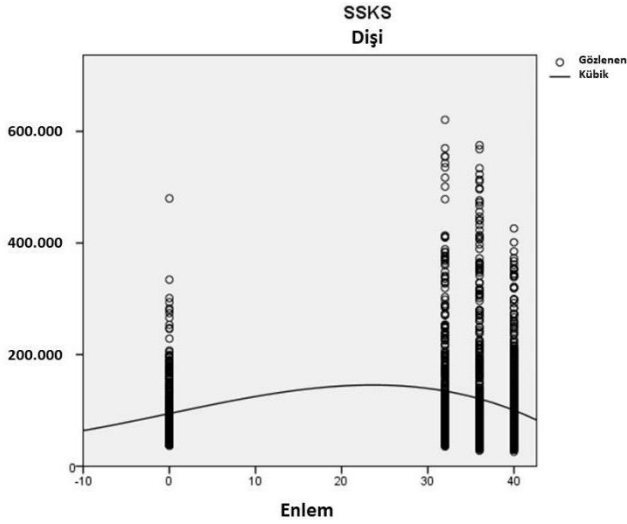
Soy hatlarına ait ortalama veriler kullanılarak, iklimsel ve coğrafi değişkenlerle doğrusal regresyon analizi yapılmıştır. Ancak doğrusal regresyon incelenen karakterler üzerinde iklimsel ve coğrafi parametrelerin etkisini göstermek bakımından en iyi model olmamıştır. Doğrusal regresyon modeli sadece rakım ve kuru vücut ağırlığı arasında görülen anlamlı ilişkiyi güçlü bir şekilde açıklamıştır. Buna göre hem eşey karışık KVA ( $R^2=0,234$ ;  $p<0,001$ ) hem de dişi ( $R^2=0,193$ ;  $p<0,001$ ) ve erkek KVA ( $R^2=0,198$ ;  $p<0,001$ ) rakım ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişmiştir.

Değişkenlerin ilişkisini anlamak için test edilen tüm regresyon modelleri arasından doğrusal olmayan kübik regresyon modeli birçok ilişkiyi doğrusal modele göre daha güçlü bir şekilde açıklayabilmiştir.

Elde edilen verilerin, enlem ile ilişkisinin daha net bir şekilde belirleyebilmek için fenotipik değişkenler ve *InR* alelleri enlem ile birlikte kübik regresyon analizi ile test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre  $R^2$  sayıları küçük olmasına karşın fenotipik karakterlerden KVA hem dişi hem erkek verileri enlemle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermiştir ( $R^2=0,145$ ;  $p<0,05$ ;  $R^2=0,172$ ;  $p<0,001$ ). Aynı karakterlerden KVA doğrusal regresyon analizinde de enlem ile anlamlı bir ilişki göstermiştir. Ancak kübik regresyon modeli karakterlerin enlem ile ilişkisini daha iyi açıklamıştır. Ayrıca dişi bireylere ait SKKS verileri enlemle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermiştir ( $R^2=0,108$ ;  $p<0,05$ ). Şekil 4.12.'de enlem ile anlamlılık gösteren karakterlere ait doğrusal olmayan kübik regresyon eğrileri verilmektedir.



a.



b.

**Şekil 4. 12.** Fenotipik veriler ile enlem arasındaki regresyon eğrileri. **a.** KVA verilerinin enlem ile doğrusal olmayan ilişkisinin kübik regresyon eğrisi ile gösterimi **b.** SKKS verilerinin enlem ile doğrusal olmayan ilişkisinin kübik regresyon eğrisi ile gösterimi.

Bunların yanı sıra KVA ortalama sıcaklık, minimum sıcaklık ve nem değişkenleriyle de istatistiksel olarak anlamlı doğrusal olmayan bir regresyon göstermiştir. Bunlar arasında ortalama sıcaklık KVA karakterini en güçlü etkileyen çevresel değişken olmuştur ( $R^2=0,215$ ;  $p<0,001$ ). Böylece enlem, yükseklik, ortalama ve minimum sıcaklık ile nem olmak üzere kuru vücut ağırlığı çevresel değişkenlerden en çok etkilenen karakter olmuştur.

İncelenen *InR* genine ait alellerden, 248 aleli enlemle istatistiksel olarak anlamlı doğrusal bir ilişki göstermiştir ( $R^2=0,122$ ;  $p<0,05$ ). Diğer aleller ve enlem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

*InR* gen bölgesinde populasyonlar arasında sık görülen SNP noktaları, soylara ait elde edilen fenotipik ortalamalar ile doğrusal ve doğrusal olmayan regresyon analizleri ile test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, doğrusal olmayan kübik regresyon modeli verilerin enlem ile ilişkisini daha iyi açıklamıştır. Pozisyonu 17405565 olan A/C SNP, pozisyonu 17405603 olan T/G SNP, pozisyonu 17405609 olan T/G SNP ve pozisyonu 17405616 olan A/C SNP, enlem ile anlamlı sonuçlar vermiş ( $R^2=0,129$ ,  $R^2=0,206$ ,  $R^2=0,265$ ,  $R^2=0,106$ ;  $p<0,05$ ), pozisyonu 17405618 olan T/G SNP erkek KVA ile, anlamlı sonuçlar vermiştir ( $R^2=0,245$ ;  $p<0,05$ ). Pozisyonu 17405627 olan A/C SNP, enlem ve dişi SKKS ile anlamlı sonuçlar vermiştir ( $R^2=0,190$ ;  $p<0,05$ ;  $R^2=0,229$ ;  $p<0,05$ ).

*InR* gen bölgesinde bulunan SNP'ler iklimsel değişkenlerle doğrusal ve doğrusal olmayan regresyon analizleri ile test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre SNP'lerin iklimsel veriler ile ilişkisini doğrusal olmayan kübik regresyon modeli daha iyi açıklamıştır.

Pozisyonu 17405565 olan A/C SNP ortalama ve maksimum sıcaklık değerleri ile anlamlı sonuçlar vermiştir (ortalama sıcaklık  $R^2=0,156$ ;  $p<0,05$ ; maksimum sıcaklık  $R^2=0,149$ ;  $p<0,05$ ). Pozisyonu 17405584 olan A/C SNP ortalama nem değeri ile anlamlı sonuçlar vermiştir ( $R^2=0,122$ ;  $p<0,05$ ). Pozisyonu 17405603 T/G olan SNP minimum sıcaklık ile marjinalde kalan bir ilişki göstermiştir ( $R^2=0,064$ ;  $p=0,058$ ). Pozisyonu 17405609 olan T/G SNP minimum sıcaklık ile anlamlı sonuçlar vermiştir ( $R^2=0,153$ ;  $p<0,001$ ). Pozisyonu 17405627 olan A/C SNP ortalama nem ile anlamlı sonuçlar vermiştir ( $R^2=0,070$ ;  $p<0,05$ ).

#### 4.4.2 Korelasyon Analizi

Gerçekleştirilen deneylerin tümünden elde edilen veriler, populasyonların toplandıkları lokasyonlara ait çevresel değişkenlerle birlikte Pearson Korelasyon testi ile analiz edilmiş ve elde edilen sonuçların birbiri ve çevresel değişkenlerle ilişkisi belirlenmiştir. Çizelge 4.8.'de sunulduğu üzere, KVA sonuçları her iki eşeyde de rakım ile negatif,



enlem ile pozitif bir korelasyon göstermiştir. Erkeklerin SKKS DF ile pozitif bir korelasyon içinde olup çevresel değişkenler ile herhangi bir ilişki göstermemiştir. Dişilere ait SKKS ortalama nem ile negatif bir korelasyon göstermiştir.

**Çizelge 4. 8.** Populasyonların toplandıkları lokasyonlara ait çevresel değişkenlerle ve elde edilen bulguların Pearson korelasyon katsayıları (üst matris) ve anlamlılık dereceleri (alt matris).

	DF	Hayatta a Kalım	Dişi SSKS	Erkek SSKS	Dişi KVA	Erkek KVA	Ort Sıc.	Mak Sıc.	Min Sıc.	Nem	Enlem	Boylam	Rakım
<b>DF</b>		0,217	0,245	<b>,284*</b>	-0,052	-0,138	0,083	0,09	-0,007	-0,084	-0,148	0,222	0,138
<b>Hayatta Kalım</b>	0,062		0,096	0,183	-0,078	-0,094	0,159	0,196	0,182	-0,199	0,033	-0,008	-0,191
<b>Dişi SSKS</b>	0,053	0,456		<b>,796**</b>	0,118	0,012	0,061	0,198	-0,027	<b>-,322**</b>	0,119	0,212	-0,207
<b>Erkek SSKS</b>	0,023	0,147	<b>&gt;0,001</b>		0,071	-0,108	0,182	0,214	0,142	-0,163	-0,043	0,056	-0,102
<b>Dişi KVA</b>	0,683	0,541	0,359	0,578		<b>,658**</b>	-0,077	0,039	0,003	-0,154	<b>,352**</b>	-0,205	<b>-,439**</b>
<b>Erkek KVA</b>	0,275	0,46	0,926	0,4	<b>&gt;0,001</b>		-0,159	-0,008	-0,135	-0,116	<b>,406**</b>	-0,177	<b>-,445**</b>
<b>Ort Sıc.</b>	0,478	0,172	0,603	0,117	0,514	0,176		<b>,905**</b>	<b>,869**</b>	<b>-,393**</b>	<b>-,696**</b>	0,191	0,057
<b>Mak Sıc.</b>	0,443	0,092	0,09	0,065	0,739	0,946	<b>&gt;0,001</b>		<b>,675**</b>	<b>-,668**</b>	<b>-,400**</b>	<b>,360**</b>	<b>-,255*</b>
<b>Min Sıc.</b>	0,949	0,118	0,818	0,224	0,98	0,252	<b>&gt;0,001</b>	<b>&gt;0,001</b>		<b>-,271*</b>	<b>-,583**</b>	-0,117	0,011
<b>Nem</b>	0,474	0,087	<b>0,005</b>	0,162	0,189	0,323	<b>&gt;0,001</b>	<b>&gt;0,001</b>	0,01		-0,108	<b>-,649**</b>	<b>,466**</b>
<b>Enlem</b>	0,204	0,781	0,312	0,711	<b>0,002</b>	<b>&gt;0,001</b>	<b>&gt;0,001</b>	<b>&gt;0,001</b>	<b>&gt;0,001</b>	0,313		<b>-,264*</b>	<b>-,756**</b>
<b>Boylam</b>	0,056	0,944	0,07	0,635	0,079	0,13	0,073	0,001	0,277	<b>&gt;0,001</b>	0,013		<b>,243*</b>
<b>Rakım</b>	0,236	0,101	0,077	0,385	<b>&gt;0,001</b>	<b>&gt;0,001</b>	0,594	0,016	0,916	<b>&gt;0,001</b>	<b>&gt;0,001</b>	0,022	

## 5. TARTIŞMA

Dünya üzerinde çok farklı çevre koşullarına uyum sağlayan *D. simulans*'ın [38], bu değişken çevresel koşullara özellikle de ılıman kuşakta karşı karşıya kaldığı kış koşullarına nasıl adaptasyon gösterdiği tam olarak bilinmemektedir. Organizmaların heterojen çevrelere gösterdikleri adaptasyonların karmaşık mekanizmalarını anlamak evrimsel biyoloji açısından önemlidir. Bu tezde *D. simulans*'ın farklı enlemlerden toplanan ılıman ve tropik populasyonlarının kışlama ile ilgili farklı fenotipik karakterleri ve bu karakterlerle ilgili aday gösterilen bir gene ait polimorfizmleri karşılaştırmalı olarak incelenerek populasyonların heterojen çevrelere adaptasyonlarının altında yatan karmaşık mekanizmaları anlamak amaçlanmıştır.

Reprodüktif diyapoz, pek çok farklı böcek türünde ılıman kuşakta görülen adaptif bir yanıt olup, *D. melanogaster* kullanılarak yapılan birçok çalışmaya konu olmuştur [20,21,113] *D. melanogaster* ile yapılan çalışmalarda reprodüktif diyapoz karakterinin enlemsellik gösterdiği ve canlının bu şekilde farklı iklimlerde başarıyla kışladığı bilinmektedir [22,50]. Bu tezde farklı enlemlerden toplanan *D. simulans* populasyonlarının, laboratuvar koşullarında reprodüktif diyapoz karakteri incelenmiş ve populasyonların ılıman kuşağa uyum sağlamasında yardımcı olan, adaptif bir karakter olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *D. simulans* populasyonlarının diyapoz frekansı birbirleriyle anlamlı bir farklılık gösterse de ( $p < 0,001$ ) bu karakter enlem ile anlamlı bir ilişki göstermemiştir. Reprodüktif diyapoz karakteri güçlü bir klin oluşturmamasına karşın enlem arttıkça populasyonların diyapoz frekansında görülen azalma eğilimi zayıf bir klinal örüntüye işaret etmektedir (Şekil 4.1.). Elde edilen bu sonuç enlem ve diyapoz ilişkisi açısından daha önce yapılmış başka bir çalışma ile benzerlik göstermektedir. Viyana, Güney Afrika ve Sahra Altı Doğu Afrika'yı temsil eden (Madagaskar adası da dahil olmak üzere birbirine yakın lokasyonlardan elde edilen farklı soy hatları ile oluşturulmuş) üç populasyon ile gerçekleştirilen bir çalışmada, en yüksek diyapoza girme frekansı gösteren Sahra Altı Doğu Afrika populasyonu olmuş, en az diyapoz frekansı gösteren ise Viyana populasyonu olmuş, enlem ile diyapoza girme frekansı negatif bir ilişki göstermiştir [19]. Daha önce *D. melanogaster* bireyleri ile yapılan benzer bir çalışmada da enlemin artmasıyla diyapoz frekansı arasında negatif bir ilişki olduğu bulunmuştur [32]. Literatürde mevcut olan bu bilgiler populasyonların buldukları lokasyona ait çevresel koşulların, reprodüktif diyapoz karakteri üzerinde seçilimsel bir baskı oluşturabildiği yönünde yorumlanabilir. Kampala,

çevresel sıcaklık değişimlerinin dar aralıklarda yaşandığı ve gündüz/gece uzunluğunun çok değişmediği tropik bir bölgedir. Kampala populasyonunun diyapoz girmesine sebep olacak sıcaklık, ışık gibi çevresel baskılar doğal ortamında mevcut değildir. Buna karşın laboratuvar ortamında oluşturulan 11°C ve 10/14 saatlik fotoperiyot koşulları ile Kampala populasyonu dişilerinde reprodüktif diyapoz davranışı hızla tetiklenmiştir. Diğer taraftan sonbahar ve kış mevsiminin belirgin görüldüğü yüksek enlemlere ait Ankara ve Napoli gibi populasyonlarda, deney koşulları reprodüktif diyapoz davranışını tetikleyecek kadar güçlü koşulları oluşturmamış olabilir. Populasyonlar arası ilişkiler incelendiğinde Kampala populasyonunun en yüksek diyapoz frekansına sahip olması ve diğer populasyonlarla istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık göstermesi oluşturulan bu deneysel koşulların populasyonlar üzerindeki dengesiz etkisinden kaynaklanmış olabilir (Çizelge 4.2.). Öte yandan Napoli populasyonunun gösterdiği düşük diyapoz frekansı ile diğer populasyonlardan, özellikle aynı enlemde olup Napoli'ye göre daha soğuk koşullara sahip Ankara populasyonu ile ayrılmaktadır. Ankara populasyonunun toplandığı Yeşilöz'ü sahip olduğu yumuşak iklim bu farklılaşmaya neden olmuş olabilir. Öte yandan gözlenen bu durum reprodüktif diyapoz karakterinin *Drosophila* populasyonlarında mevsimsellik göstermesi ile de açıklanabilir [22,32]. Napoli incelenen populasyonlar arasında Ekim ayında doğadan toplanarak, diğer populasyonlardan zamansal olarak ayrılmaktadır. Reprodüktif diyapoz frekansının populasyon içinde gösterdiği çeşitlilik incelendiğinde ise, soylar arası farklılık oldukça yüksektir (Çizelge 4.3.) ve populasyonların kendi içinde gösterdiği çeşitlilik populasyonlar arası çeşitlilikten fazladır. Bu durum *D. simulans* populasyonlarının yapısının incelenen karakter için homojen olmadığı, dolayısıyla populasyonlar arası farkın azalmasına sebep olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Diyapoz koşullarında tutulan populasyonlara ait dişilere 28. günde ovarium diseksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ancak bu sürenin sonunda tüm bireyler hayatta kalmamıştır. 11°C'de 28. günün sonunda ölen bireyler sayılmış ve bireylerin soğuk koşullarda hayatta kalma başarısı hesaplanmıştır (Çizelge 4.4). Elde edilen sonuçlara göre hayatta kalma başarısı en yüksek olan populasyon %85 ile Hayfa iken en düşük olan ise %75 ile Ankara populasyonu olmuştur. Hayatta kalma verileri populasyonların ait olduğu lokasyona ait iklimsel parametrelerle ya da enlem ile açıklanamamıştır. Hayatta kalmanın başarısında da yine mevsimsellikle ilgili bir etki olabileceğini düşündürmektedir. Hayfa populasyonu Mart ayında ve Ankara populasyonu Temmuz ayında doğadan toplanmıştır. Hayfa bulunduğu iklimsel kuşakta Mart ayında ısınmaya

başlar ve *Drosophila* populasyonlarına da aynı zamanlarda doğada rastlanmaya başlanır. Topladığımız populasyon şayet kışlamış ve o yılın kurucusu olan populasyon ise bu hayatta kalma konusundaki başarısını açıklayabilir. Temmuz ayında toplanan Ankara populasyonu ise, çevresel koşulların ideal ve besinin bol olduğu bir zamanda toplanmıştır. Bu durumda populasyon üzerindeki seçim baskısının az olduğu dolayısıyla populasyonun hızlı üreme döneminde olabileceğini ve hayatta kalma başarısını düşürmüş olabileceğini düşündürür [133]. Populasyonların diyapoza girme frekansı ve soğuk koşullarda hayatta kalma başarısı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

*Drosophila* ile yapılan çalışmalarda soğuk komasından kurtulma süresinin, bireylerin soğuk toleransını ölçmek için iyi bir parametre olduğunu göstermiştir [25,26]. Soğuk komasından kurtulma süresi *D. melanogaster*'de güçlü enlemsel klin gösteren bir karakterdir [8,26,141]. *D. simulans* ile yapılan çalışmalar daha az olmasına karşın Avustralya'nın doğu kıyısından 25° ve 42° enlemler arasında toplanan on populasyonun dişilerinin SKKS bakımından istatistiksel olarak anlamlı doğrusal olmayan bir klin gösterdiği bulunmuştur [56]. Elde ettiğimiz sonuçlar Arthur ve arkadaşlarının (2008) [56] sonuçlarını desteklemektedir. SKKS enlem ile doğrusal bir klin göstermemekte ama aynı Avustralya populasyonlarında olduğu gibi dişiler istatistiksel olarak anlamlı doğrusal olmayan bir klin göstermektedir. Avustralya populasyonlarında dişilerde görülen bu klin, Kampala, Hayfa, Hatay, Ankara ve Napoli populasyonlarında da dişiler için güçlü bir klin oluşturmaktadır. Bu çalışma ile elde edilen bulgular *D. simulans* dişileri SKKS karakteri için ortaya konulan ilk paralel klin olması bakımından oldukça önemlidir. Paralel klinler karakterlerin farklı coğrafi bölgelerde aynı seçim baskısı altında olduklarını gösteren önemli evrimsel kanıtlardır. Kıtalar arasında paralel enlemsel varyasyonlar adaptif ve nötr farklılaşmaları ayırt etmeye yarayan klasik bir yaklaşımdır [8,12,16,74,89,153]. Söz konusu bu doğrusal olmayan klin Kampala populasyonunun yüksek enlemdeki populasyonlara yakın bir SKKS'ye sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Kampala tropik bir iklime sahip olup, *D. simulans*'ın atasal populasyona ait olduğu düşünülen Madagaskar adasına oldukça yakındır [64,65]. Madagaskar tropik bir bölgede olmasına karşın, güney bölgesinde iklimsel özellikler değişir ve ılıman kuşak özellikleri gösterir [111]. Yapılan çalışmalar, *D. simulans*'ın mevsimlerin var olduğu bir coğrafyada evrilmiş olduğunu işaret eder. Uganda'nın coğrafi olarak Madagaskar adasına yakınlığı düşünüldüğünde, çalıştığımız Kampala populasyonunun, belki de atasal populasyona çok yakın özelliklerde olması

söz konusu olabilir. Bu durum, Kampala popülasyonunun soğuk komasından nasıl hızla çıkabildiğinin cevabı olabilir. Kampala ve Napoli popülasyonlarında dişiler soğuk komasından erkeklerden daha önce kurtulmuştur. Bu sonuç literatür ile uyumlu olup, hem *D. melanogaster* hem de *D. simulans* ile yapılmış olan çalışmalar benzer bir örüntü göstermektedir [25,56,142]. Diğer taraftan Hayfa, Hatay ve Ankara popülasyonlarında tersi bir durum gözlenmiş ve dişiler soğuk komasından erkeklerden daha geç çıkmıştır. Ancak bu durumun soy hatları arasında da farklılık gösterdiğinden popülasyonlara genellemek çok doğru değildir. SKKS için 1 saat buzda tutulan bireylerde soğuk komasından ötürü ölüm gözlenmemiştir. Bu sonuç *D. simulans* için 0°C'nin 1 saatlik maruziyetinin öldürücü olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

*Drosophila* ile yapılan çalışmalara göre vücutta biriktirilen yağ miktarı, dolayısıyla artan vücut ağırlığı soğuk toleransı üzerinde önemli bir rol oynar [51,144]. İncelenen popülasyonlar kuru vücut ağırlığı fenotipi açısından, enleme bağlı kademeli bir değişim göstermiştir. Ortalama KVA en yüksek olan popülasyon Napoli en düşük olan ise Kampala popülasyonu olmuştur. Eşeyler birbirinden ayrı incelendiğinde dişi bireylerin genel ortalama ile benzer KVA'na sahip olmasıyla birlikte Hatay popülasyonuna ait erkek bireylerin en yüksek KVA'na sahip olduğu görülmüştür. 0° ve 40° enlemlere ait popülasyonlara bakılacak olursa, *D. melanogaster* ile benzer bir örüntüde KVA değerlerinin enlem ile pozitif bir korelasyon içinde olduğundan söz edebiliriz [7]. Ancak aynı SKKS olduğu gibi KVA'da enlem ile güçlü doğrusal olmayan bir ilişki içerisinde olduğunu ve ağırlık karakterinin doğrusal olmayan bir kline sahip olduğunu göstermiştir. *Drosophila* türlerinde vücut büyüklüğünün enlem ile pozitif bir ilişki içerisinde olduğu bilinmektedir; [16,125,154–160]. Vücut büyüklüğünün bir ölçüsü olarak kanat büyüklüğü, kanat alanı, hücre sayısı, toraks uzunluğu gibi karakterlerin yanı sıra vücut yaş ağırlığı, kuru ağırlık ve yağ oranı da kullanılmaktadır [161]. Arthur ve arkadaşlarının (2008) [56] Avustralya kıtasında *D. simulans* ile yaptıkları çalışmada kanat büyüklüğünün dişi ve erkeklerde güçlü bir enlemsel klin göstermiştir. Çalıştığımız popülasyonların da vücut ağırlığı için güçlü bir enlemsel klin göstermesi aynı SKKS karakteri için olduğu gibi paralel bir klin oluşturmuş olması bakımından önemlidir. Öte yandan elde edilen sonuçlara göre, incelenen popülasyonlarda KVA karakterinin rakım ile güçlü negatif bir ilişki içinde olduğu belirlenmiştir. Bu ilişki yüksek rakıma sahip Kampala ve Ankara'dan toplanan popülasyonlardan kaynaklanmaktadır. Her iki etkenin de deney sonuçları ile olan ilişkisi, elimizdeki sonuçları yorumlamamızı zorlaştırmıştır.

İleriki enlemsel klin çalışmalarında populasyonların benzer rakımlardan seçilmesi sonuçları rakımdan bağımsız olarak tartışma fırsatı tanıyacaktır.

Yaygın olarak birçok karakter bakımından güçlü klin gösteren *D. melanogaster*'e karşı *D. simulans*'ın daha zayıf klin göstermesinin nedenlerini araştırmak için genom çaplı karşılaştırmalı bir çalışma ile anlaşılmasına çalışılmıştır [10]. Sonuçlar fenotipik karakterlerle benzerlik göstermiş ve *D. simulans*'ın otozomlarda daha düşük klinal örüntü gösteren varyasyonlara sahip olduğunu, buna karşın ise X kromozomunda daha yüksek oranda klinal örüntüye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Aynı çalışma, iki türün de klinal örüntü gösteren yaklaşık 3300 ortak gen tanımlanmıştır. Bu sonuç *D. simulans*'da da bazı genlerin seçilim altında olduğunu göstermektedir. Ortak tespit edilen genlerden 10 tanesi ise daha önce literatürde her iki türde de klinal örüntü gösterdiği ortaya konan genler olduğu analiz edilmiştir. Klinal örüntü gösterdiği bilinen ve literatür desteği olan genler *Pgm* [10,162,163], *G6pd* [10], *Gpdh* [10], *UGP* [10,162], *Treh* [10,162], *sgg* [10,164], *cpo* [10,124], *per* [10,129], *Adh* [10,165,166] ve *InR* [10,12,16].

Machado ve arkadaşlarının [10] yaptığı karşılaştırmalı genom çalışmasında *D. melanogaster* ve *D. simulans*'da klin gösteren *InR* geninin *D. melanogaster*'de insülin sinyal yolağını regüle ederek diyapozun düzenlenmesiyle ilişkili olduğu, ömür uzunluğu, yaşlanma, vücut büyüklüğü, vücut yağ oranı ve stres toleransı karakterlerini doğrudan etkilediği gösterilmiştir [16,21,131–133]. *D. melanogaster* ile yapılmış çalışmalarda kıtalararası güçlü bir paralel klin göstermesi ve sahip olduğu polimorfizmler *InR* geninin lokal adaptasyon ile ilgili önemini vurgular [12,16]. Birinci ekzon bölgesinde sahip olduğu yaklaşık 240 bç uzunluğundaki indel polimorfizmleri seçilim altındadır [16]. *InR* geninin polimorfik bir yapıda olmasına ve klinal bir örüntü göstermesine sebep olmaktadır [16,133]. İnsülin yolağının regülasyonunun yaşam öyküsü karakterleri üzerinde majör bir etkisinin olması ve çalışmamızda ölçülen tüm fenotipik karakterler ile yakın ilişkisi, *InR* genini *D. simulans*'ta çalışmak için iyi bir aday gen yapmış ve üzerinde çalışılan gen bölgesi bu kriterler dahilinde belirlenip, karakterize edilmiştir.

İncelenen *InR* gen bölgesi için dördü yaygın toplam dokuz farklı alel belirlenmiştir. Enlem arttığında alel çeşitliliği belirgin bir şekilde artış göstermiştir (Şekil 4.2). Yaygın görülen 251 ve 236 alellerinin populasyonlar içindeki görülme frekansı enlemle birlikte değişiklik göstermemiştir. Öte yandan yaygın görülen 257 ve 248 alellerinin enlem arttıkça populasyon içindeki frekansında azalma görülmüştür. 248 alelinin enlem ile ilişkisinin istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görülmüştür. Populasyonlarda nadir

rastlanan alellerin kuzey enlemlerinde görüldüğü, bunun alel çeşitliliğini arttırdığı bulunmuştur (Şekil 4.11.) Bu durum *InR* gen bölgesinin enleme bağlı bir seçim baskısına maruz kaldığı şeklinde yorumlanabilir. *InR* gen bölgesine ait polimorfizmler analiz edildiğinde ise enlem arttıkça, *InR* gen bölgesi üzerinde polimorfizm gösteren bölgeler ve nükleotit çeşitliliği azalmış, haplotip sayıları ve çeşitliliği ise artmıştır. *Tajima'nın D*'si ise, tüm populasyonlarda negatif,  $F_u$ 'nun  $F_s$ 'i ise Kampala'da pozitif diğer populasyonlarda negatif değerler vermiştir (Çizelge 4.5.). Ne var ki elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ve incelenen gen bölgesinin oldukça kısa bir bölge olması elde edilen verilere dayalı net yorumlar yapılmasına mani olmuştur. Kampala populasyonundaki görece yüksek nükleotit çeşitliliği ve düşük haplotip çeşitliliği birlikte incelendiğinde, gen bölgesi üzerinde seçici baskının olmadığı dengeli bir populasyon olduğu yorumu yapılabilir. Diğer populasyonlarda ise enlem arttıkça nükleotit çeşitliliği sabit kalırken haplotip çeşitliliğinde artış söz konusu olmuştur. Yüksek haplotip çeşitliliği ve negatif *Tajima'nın D* değerleri birlikte ele alındığında, populasyonlarda *InR* geninin yakın geçmişte bir dar boğazdan geçmiş olduğu ve genişleme trendinde olabileceğini düşündürse bile seçici süpürme (selective sweep) olasılığı da göz ardı edilemez. Bunun için daha geniş çaplı genomik bilginin elde edilmesi gereklidir. Ayrıca yapılan analizler *InR* geni üzerinde demografinin etkilerini seçilimin etkilerinden ayırt etmek için yeterli değildir. *D. melanogaster*'de *InR* gen bölgesinin enleme bağlı gösterdiği çeşitliliğin esas sebebi sahip olduğu büyük indel polimorfizimleridir [16]. Elde edilen dizilerde yapılan indel analizlerine göre, Hayfa ve Napoli populasyonları yüksek haplotip ve nükleotit çeşitliliğine sahiptir. Elde edilen sonuçlarda Ankara populasyonuna ait toplam 8 indel bölgesi bulunmasına karşın, bu bölgelerin birbiri ile çakışıyor olması analizlerde daha az indel bölgesine ve haplotip çeşitliliğine sahipmiş gibi bir yanılgı yaratmıştır. Tüm bu bilgiler ışığında populasyonlar incelendiğinde, artan enlem ile birlikte artan bir indel çeşitliliğinden bahsetmek mümkün olabilir. Ankara ve Napoli populasyonlarında görülen negatif *Tajima'nın D* değerleri, incelenen indel bölgesinin artan enleme bağlı bir seçilime maruz kaldığı şeklinde yorumlanabilir. Populasyonların *InR* gen bölgesine ait  $F_{ST}$  değerleri indel bölgeleri beşinci değişken olarak kabul edilerek incelendiğinde ise, enleme bağlı olarak birbirinden farklılaştıkları görülmektedir. Öte yandan aynı enlemsel mesafedeki Hayfa, Hatay ve Ankara populasyonları arasında en yüksek  $F_{ST}$  değerleri Ankara populasyonu ile diğer populasyonlar arasındayken, aynı enlemden bulunan Ankara ve Napoli populasyonları arasında da yüksek olan  $F_{ST}$  değerleri, söz konusu gen bölgesi üzerinde



enlemin seçici bir etken olmasıyla birlikte, iklimsel değişkenlerin de seçici bir baskı yaratıyor olabileceği ihtimalini düşündürmektedir. Elde edilen sonuçlar *InR* geni üzerindeki indel polimorfizminin siblingi *D. melanogaster* gibi *D. simulans*'ta da enleme bağlı bir seçim altında olabileceğini göstermiştir [10,16,32].

İncelenen *InR* gen bölgesi için, 7'si popülasyonlar arasında yaygın toplam 13 tane tekrarlayan SNP noktaları belirlenmiş ve bunlara ait frekansların elde edilen fenotipik veriler ile ilişkileri incelendiğinde; 17405618 pozisyonundaki SNP'in erkek KVA ile ve 17405627 pozisyonundaki SNP'in dişi SKKS ile anlamlı negatif bir ilişki içinde olduğu görülmüştür. 17405627 pozisyonundaki SNP'in aynı zamanda enlem ile de negatif anlamlı bir ilişki göstermiştir. Ayrıca 17405565, 17405603, 17405609 ve 17405616 pozisyonundaki SNP frekansları hiçbir fenotipik karakter ile anlamlı bir ilişki göstermese de enlem ile anlamlı ilişki göstermiştir. Öte yandan incelenen SNP'lerden 5 tanesinin iklimsel değişkenler ve özellikle sıcaklık değerleri ile anlamlı bir ilişki içinde olduğu görülmüştür. Elde edilen veriler *InR* gen bölgesi üzerinde bulunan tek nükleotid polimorfizmlerinin üzerindeki seçim baskısının, enlemden çok iklimsel olabileceğini göstermiştir. Bunların içinde 17405627 pozisyonundaki SNP özellikle dikkat çekicidir, dişi SKKS ve enlem ile ilişkili olan bu nokta nem ile de anlamlı bir ilişki içinde olarak lokal adaptasyon için önemli bir nokta olabileceğini göstermiştir.

*D. simulans* popülasyonları ile gerçekleştirilen deneylerin tümünün ortak sonucu, popülasyonların enleme bağlı olarak değişen cevaplar verdiği yönündedir. Sahip olduğumuz sonuçlara göre *D. simulans* popülasyonlarının enlem ile ilişkisi *D. melanogaster*'de görülen güçlü ve kademeli bir değişim şeklinde olmasa da enlemsel olarak uç noktalarda bulunan popülasyonlar belirgin şekilde farklılık göstermektedir. Elde edilen enlemsel sonuçlar literatürdeki çalışmalara bakıldığında benzer olmuştur, *D. simulans* doğrusal biçimde olmasa da enlemsellik göstermiştir [14,19,55]. Çalıştığımız popülasyonların bize sunduğu verilere göre, *D. simulans* siblingi *D. melanogaster* gibi lokal adaptasyon gösteren bir türdür.

Sonuçlara göre kontrol grubu olan Napoli, aynı enlemdeki Ankara popülasyonu ile karşılaştırıldığında; daha düşük DF, daha fazla KVA, dişi bireylerde daha hızlı SKKS ve soğuk koşullarda daha yüksek hayatta kalma yüzdesi ile soğuk koşullara daha adapte bir popülasyon olduğunu göstermektedir. Bu sonuç iklimsel veriler ile açıklanamamaktadır. İki olası nedenden biri daha önce belirtilmiş olan mevsimsellik etkisi olabilir. Diğeri ise Napoli popülasyonunun kolonizasyon rotası olabilir. *D.*

*melanogaster* ile yapılan çalışmalara göre, Afrika kıtasından çıkıp Avrupa'ya ulaşması için öne sürülen iki rotadan biri, biri Sina yarımadası-Anadolu üzerinden geçmektedir [2,68]. Siblingi *D. simulans*'ın da benzer bir yol izleyerek Anadolu zerinden Avrupa'ya ulaşması için önce Karpatlar ve sonra Alpler iki dağlık bölgeden geçmesi gerekir. Bu rota önemli bir coğrafi bariyer oluşturmaktadır ve Avrupa'daki kurucu popülasyonun güçlü bir seçilimden geçmiş olması ile sonuçlanır. Bu da günümüzdeki Napoli popülasyonunun aynı enlemdeki Ankara popülasyonuna göre soğuk toleransı daha yüksek sonuçlar vermesine neden olmuş olabilir.

Gerçekleştirilen fenotipik çalışmalar, popülasyonlar doğadan toplanıp, laboratuvarda tek dişinin kurucu olduğu soy hatları halinde sürdürülmeye başlandıktan en az bir yıl sonra başlamıştır. Bir yıl içinde en az yirmi kuşak boyunca laboratuvarda bulunan soyların laboratuvar adaptasyon süresi tamamlanmıştır. Bu durum, incelediğimiz karakterlerin, popülasyonların toplandıkları lokasyona ait çevresel değişkenlerden kaynaklanan fenotipik esneklik, maternal ve paternal etkiler ile epigenetik etkileri popülasyonlar arasında farklılığa neden olacak düzeyde barındırmadığını, popülasyonlar aynı koşullarda tutulduğu için söz konusu tüm bu etkilerin popülasyonlar için eşit olduğunu göstermektedir. Böylece poligenik olarak kalıtıldığı bilinen bu kantitatif karakterlere ait sonuçların popülasyonların genetik özelliklerini yansıttıkları kabul edilebilir. Ayrıca elde edilen *InR* gen bölgesi sekansı sonuçları, kullanılan soyların çok yüksek oranda homozigot olduğunu göstermiştir. alışan fenotipik karakterler her ne kadar poligenik özelliklerde olsalar dahi, *InR* indel polimorfizmi ile ilişkileri gösterilmiştir.

*D. melanogaster* adaptasyonun altında yatan kompleks mekanizmaları çalışmak için oldukça popüler bir organizmadır. Enlemsel varyasyon gösteren *D. melanogaster*'in kardeş türü *D. simulans* ile yapılacak olan karşılaştırmalı çalışmalar bu iki türün klinal varyasyonlar bakımından nasıl ayrıldığının anlaşılması için önemli olduğundan, son yıllarda bilim insanları için heyecan verici bir araştırma konusu olmaya başlamıştır. *D. simulans* ile yapılan çalışmaların çok az olması ve bu nedenle karşılaştırılabilir fenotipik ve genotipik verinin yetersiz olması nedeniyle çalışmamızın, literatürde daha önce var olmayan yeni bilgiler eklemesi oldukça önemlidir. Enlemsel klin çalışmalarında, Orta Afrika'dan başlayıp Orta Doğu'yu kapsayan bir çalışma olması, popülasyonun olası kolonizasyon yolu üzerinde olması özelliği ile, evrimsel adaptasyon perspektifi için araştırmacılara zengin bir veri sağlamaktadır. İleriki çalışmalarda, popülasyon sayıları özellikle kuzey enlemler eklenmesiyle artırılarak, araştırılacak yeni fenotipik karakterler

ve aday gen çalışmaları eklenmesi, çalışmamızda sorduğumuz soruların cevabını net bir şekilde almamıza olanak sağlayacaktır.

Elde ettiğimiz veriler *D. simulans* populasyonlarının göç ederek kışladığı hipotezini tamamen reddetmemize yetmese de, incelenen populasyonların tümünde reprodüktif diyapoz cevabının görülmesi, enleme birlikte değişen kuru vücut ağırlığı, soğuk komasından kurtulma süresi, *InR* alel dağılımı ve son olarak populasyonlar arasındaki mesafenin sabit olduğu Hayfa, Hatay ve Ankara populasyonlarında *InR* gen bölgesine ait elde edilen  $F_{ST}$  değerleri, *D. simulans* populasyonlarının g etmeksizin bulunduğu lokasyonda kışlayabileceğini işaret etmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Singh RS, Choudhary M, David JR. Contrasting patterns of geographic variation in the cosmopolitan sibling species *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*: *Biochem Genet.* 25 (1987) 27–40.
- [2] David JR, Capy P. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations: *Trends Genet.* 4 (1988)106–11.
- [3] Lachaise D, Cariou M-L, David JR, Lemeunier F, Tsacas L, Ashburner M: *Evolutionary Biology.* (1988)159–225.
- [4] Endler JA. Geographic variation, speciation, and clines. *Monogr Popul Biology*: 10 (1977) 1–246.
- [5] Umina PA, Weeks AR, Kearney MR, McKechnie SW, Hoffmann AA. A Rapid Shift in a Classic Clinal Pattern in *Drosophila* Reflecting Climate Change. *Science*: 308 (2005):691–3.
- [6] Azevedo RBR, James AC, McCabe J, Partridge L. Latitudinal Variation of Wing:Thorax Size Ratio and Wing-Aspect Ratio in *Drosophila melanogaster*: *Evolution.* 52 (1998) 1353–62.
- [7] Robinson SJW, Zwaan B, Partridge L. Starvation Resistance and Adult Body Composition in Latitudinal Cline of *Drosophila melanogaster*: *Evolution.* 54 (2000)1819–24.
- [8] Hoffmann AA, Anderson A, Hallas R. Opposing clines for high and low temperature resistance in *Drosophila melanogaster*: *Ecol Lett.* 5 (2002) 614–8.
- [9] Schmidt PS, Paaby AB. Reproductive Diapause and Life-History Clines in North American Populations of *Drosophila melanogaster*: *Evolution.* 62 (2008) 1204–15.
- [10] Machado HE, Bergland AO, O'Brien KR, Behrman EL, Schmidt PS, Petrov DA. Comparative Population Genomics of Latitudinal Variation in *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*: *Mol Ecol.* 25 (2016) 723–40.
- [11] Mallard F, Nolte V, Tobler R, Kapun M, Schlötterer C. A Simple Genetic Basis of Adaptation to A Novel Thermal Environment Results in Complex Metabolic Rewiring in *Drosophila*: *Genome Biol.*19 (2018)119.
- [12] Önder, B.S., and Pasyukova, E.G., Latitudinal, seasonal, and year-to-year changes in genome, transcriptome, and life history traits variation in *Drosophila melanogaster* populations, Project report, 2017.

- [13] Davidson J. Nonparallel Geographic Patterns for Tolerance to Cold and Desiccation in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*: Aust J Zool. 38 (1990) 155–61.
- [14] Capy P, Pla E, David J. Phenotypic and genetic variability of morphometrical traits in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D simulans*: I. Geographic variations. Genet Sel Evol. 25 (1993) 517.
- [15] Capy P, Gibert P. *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*: So Similar, So Different: Springer, Dordrecht. (2004) 5–16.
- [16] Paaby AB, Blacket MJ, Hoffmann AA, Schmidt PS. Identification of a candidate adaptive polymorphism for *Drosophila* life history by parallel independent clines on two continents: Mol Ecol. 19 (2010) 760–74.
- [17] Zhao L, Wit J, Svetec N, Begun DJ. Parallel Gene Expression Differences between Low and High Latitude Populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: Plos Genet. 11 (2015) e1005184.
- [18] Sedghifar A, Saelao P, Begun DJ. Genomic Patterns of Geographic Differentiation in *Drosophila simulans*: Genetics. 202 (2016) 1229–40.
- [19] Lirakis M, Dolezal M, Schlötterer C. Redefining reproductive dormancy in *Drosophila* as a general stress response to cold temperatures: J Insect Physiol. 107 (2018) 175-185.
- [20] Kubrak OI, Kučerová L, Theopold U, Nässel DR. The Sleeping Beauty: How Reproductive Diapause Affects Hormone Signaling, Metabolism, Immune Response and Somatic Maintenance in *Drosophila melanogaster*: Plos One. 9 (2014) e113051.
- [21] Zonato V, Collins L, Pegoraro M, Tauber E, Kyriacou CP. Is diapause an ancient adaptation in *Drosophila*?: J Insect Physiol. (2017) 98.
- [22] Schmidt PS, Paaby AB, Heschel MS. Genetic Variance for Diapause Expression and Associated Life Histories in *Drosophila melanogaster*: Evolution. 63 (2005) 2616.
- [23] Emerson KJ, Uyemura AM, McDaniel KL, Schmidt PS, Bradshaw WE, Holzapfel CM. Environmental control of ovarian dormancy in natural populations of *Drosophila melanogaster*: J Comp Physiology. 195 (2009) 825–9.
- [24] Reis M, Vieira CP, Morales-Hojas R, Aguiar B, Rocha H, Schlötterer C, et al. A Comparative Study of the Short Term Cold Resistance Response in Distantly

- Related *Drosophila* Species: The Role of regucalcin and Frost: Plos One. 6 (2011) e25520.
- [25] David RJ, Gibert P, Pla E, Petavy G, Karan D, Moreteau B. Cold stress tolerance in *Drosophila*: analysis of chill coma recovery in *D. melanogaster*. J Therm Biol. 23 (1998) 291–9.
- [26] Gibert P, Moreteau B, Ptavy G, Karan D, David JR. Chill-Coma Tolerance, A Major Climatic Adaptation Among *Drosophila* Species: Evolution. 55 (2001) 1063–8.
- [27] Herrewege J van, David JR. Starvation and desiccation tolerances in *Drosophila*: Comparison of species from different climatic origins: Écoscience. 4 (1997) 151–7.
- [28] Hoffmann AA, Harshman LG. Desiccation and starvation resistance in *Drosophila*: patterns of variation at the species, population and intrapopulation levels: Heredity. 83 (1999) 637–43.
- [29] Häder T, Müller S, Aguilera M, Eulenberg KG, Steuernagel A, Ciossek T, et al. Control of triglyceride storage by a WD40/TPR-domain protein: Embo Rep. 4 (2003) 511–6.
- [30] Goenaga J, Fanara JJ, Hasson E. Latitudinal Variation in Starvation Resistance is Explained by Lipid Content in Natural Populations of *Drosophila melanogaster*. Evol Biol. 40 (2013) 601–12.
- [31] Kučerová L, Kubrak OI, Bengtsson JM, Strnad H, Nylin S, Theopold U, et al. Slowed aging during reproductive dormancy is reflected in genome-wide transcriptome changes in *Drosophila melanogaster*. BMC Genomics. 17 (2016) 50.
- [32] Subaşı BS. *Drosophila melanogaster*'de coğrafi ve mevsimsel diyapoz değişimi ve insülin-benzeri reseptör (InR) polimorfizmi ile ilişkisinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2017.
- [33] Davis JC. Minimal Dissolved Oxygen Requirements of Aquatic Life with Emphasis on Canadian Species: A Review: J Fish Res Board Can. 32 (1975) 2295–332.
- [34] Ruiz A, Heed WB, Wasserman M. Evolution of the Mojavensis Cluster of Cactophilic *Drosophila* with Descriptions of Two New Species: J Hered. 81 (1990) 30–42.

- [35] Takeuchi K, Fujioka Y, Kawasaki Y, Shirayama Y. Impacts of High Concentration of CO<sub>2</sub> on Marine Organisms; A Modification of CO<sub>2</sub> ocean sequestration: *Energy Convers Manage.* 38 (1997) S337–41.
- [36] Kankare M, Salminen T, Laiho A, Vesala L, Hoikkala A. Changes in Gene Expression Linked with Adult Reproductive Diapause in A Northern Malt Fly Species: A Candidate Gene Microarray Study: *Bmc Ecol.* 10 (2010) 3.
- [37] *Verduijn* Mh, *Dijk* Pjv, *Damme* Jmmv. Distribution, Phenology and Demography of Sympatric Sexual and Asexual Dandelions (*Taraxacum officinale* s.l.): Geographic Parthenogenesis on A Small Scale: Geographic Parthenogenesis in Dandelions: *Biol J Linn Soc.* 82 (2004) 205–18.
- [38] Lachaise D, Silvain J-F: *Genetica.* 120 (2004) 17–39.
- [39] Harpke D, Peruzzi L, Kerndorff H, Karamplianis T, Constantinidis T, Randelović V, et al. Phylogeny, geographic distribution, and new taxonomic circumscription of the *Crocus reticulatus* species group (Iridaceae): *Turk J Bot.* 38 (2014) 1182–98.
- [40] David Jr, Bocquet C. Similarities and differences in latitudinal adaptation of two *Drosophila* sibling species: *Nature.* 257 (1975) 588–90.
- [41] Caine Ea. Habitat Adaptations of North American Caprellid Amphipoda (Crustacea): *Biological Bulletin.* 155 (1978) 288–96.
- [42] Lyman JC, Ellstrand NC. Clonal diversity in *taraxacum officinale* (compositae), an apomict: *Heredity.* 53 (1984) 1–10.
- [43] Peltonen L, Arieli Y, Pyörnilä A, Marder J. Adaptive changes in the epidermal structure of the heat-acclimated rock pigeon (*Columba livia*): A comparative electron microscopy study: *J Morphol.* 235 (1998) 17–29.
- [44] Eller F, Skálová H, Caplan JS, Bhattarai GP, Burger MK, Cronin JT, et al. Cosmopolitan Species as Models for Ecophysiological Responses to Global Change: The Common Reed *Phragmites australis*: *Front Plant Sci.* 8 (2017) 1833.
- [45] H. Wickham, C. Winston, Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics, Packag. “Ggplot2.” (2019). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr406>
- [46] Behrman EL, Watson SS, O’Brien KR, Heschel MS, Schmidt PS. Seasonal variation in life history traits in two *Drosophila* species: *J Evolution Biol.* 28 (2015) 1691–704.

- [47] Signor SA, New FN, Nuzhdin S. A large panel of *Drosophila simulans* reveals an abundance of common variants: *Genome Biol Evol.* 10.1 (2018) 189-206
- [48] Munjal A, Karan D, Gibert P, Moreteau B, Parkash R, David J. Thoracic trident pigmentation in *Drosophila melanogaster*: latitudinal and altitudinal clines in Indian populations: *Genet Sel Evol.* 29 (1997) 601.
- [49] Tyukmaeva VI, Salminen TS, Kankare M, Knott KE, Hoikkala A. Adaptation to a seasonally varying environment: a strong latitudinal cline in reproductive diapause combined with high gene flow in *Drosophila montana*: *Ecol Evol.* 1 (2011) 160–8.
- [50] Mitrovski P, Hoffmann AA. Postponed reproduction as an adaptation to winter conditions in *Drosophila melanogaster*: evidence for clinal variation under semi-natural conditions: *Proc Royal Soc Lond Ser B Biological Sci.* 268 (2001) 2163–8.
- [51] Schmidt PS, Matzkin L, Ippolito M, Eanes WF. Geographic Variation in Diapause Incidence, Life-History Traits, And Climatic Adaptation In *Drosophila melanogaster*. *Evolution.* 59 (2005) 1721–32.
- [52] Durmaz E, Benson C, Kapun M, Schmidt P, Flatt T. An inversion supergene in *Drosophila* underpins latitudinal clines in survival traits: *J Evolution Biol.* 31 (2018) 1354–64.
- [53] Kapopoulou A, Pfeifer SP, Jensen JD, Laurent S. The demographic history of African *Drosophila melanogaster*. *Biorxiv.* (2018) 340406.
- [54] Singh RS, Long AD. Geographic variation in *Drosophila*: From molecules to morphology and back: *Trends Ecol Evol.* 7 (1992) 340–5.
- [55] Gibert P, Capy P, Imasheva A, Moreteau B, Morin JP, Pétavy G, et al. Comparative Analysis of Morphological Traits Among *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: Genetic Variability, Clines and Phenotypic Plasticity: *Genetica.* 120 (2004) 165–79.
- [56] Arthur AI, Weeks Ar, Sgrò Cm. Investigating latitudinal clines for life history and stress resistance traits in *Drosophila simulans* from eastern Australia: *J Evolution Biol.* 21 (2008) 1470–9.
- [57] Austin CJ, Moehring AJ. Optimal temperature range of a plastic species, *Drosophila simulans*: *J Anim Ecol.* 82 (2013) 663–72.



- [58] Garrigan D, Kingan SB, Geneva AJ, Andolfatto P, Clark AG, Thornton KR, et al. Genome sequencing reveals complex speciation in the *Drosophila simulans* clade: *Genome Res.* 22 (2012) 1499–511.
- [59] Santos M. Resource subdivision and the advantage of genotypic diversity in *Drosophila*: *Heredity.* 78 (1997) 302–10.
- [60] H. S. A. A New Species Closely Resembling *Drosophila melanogaster*: *Psyche J Entomology.* 26 (1919) 153–5.
- [61] Davis RL. Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants: *Physiol Rev.* 76 (1996) 299–317.
- [62] Markow Ta, Beall S, Matzkin Lm. Egg size, embryonic development time and ovoviviparity in *Drosophila* species: *J Evolution Biol.* 22 (2009) 430–4.
- [63] Petavy G, David JR, Gibert P, Moreteau B. Viability and rate of development at different temperatures in *Drosophila*: a comparison of constant and alternating thermal regimes: *J Therm Biol.* 26 (2001) 29–39.
- [64] Dean MD, Ballard JWO. Linking phylogenetics with population genetics to reconstruct the geographic origin of a species: *Mol Phylogenet Evol.* 32 (2004) 998–1009.
- [65] Palmieri N, Nolte V, Chen J, Schlötterer C. Genome assembly and annotation of a *Drosophila simulans* strain from Madagascar: *Mol Ecol Resour.* 15 (2015) 372–81.
- [66] Veuille M, Baudry E, Cobb M, Derome N, Gravot E. Historicity and the Population Genetics of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: *Genetica.* 120 (2004) 61–70.
- [67] Kapopoulou A, Kapun M, Pavlidis P, Pieper B, Wilches R, Stephan W, et al. Early split between African and European populations of *Drosophila melanogaster*. *Biorxiv.* (2018) 340422.
- [68] Sprengelmeyer QD, Mansourian S, Lange JD, Matute DR, Cooper BS, Jirle EV, et al. Recurrent Collection of *Drosophila melanogaster* from Wild African Environments and Genomic Insights into Species History: *Mol Biol Evol.* 37 (2019) 627–38.
- [69] Ambrosi P, Chahda S, Yang E, Sousa-Neves R, Mizutani CM. *Evolutionary Biology: Exobiology and Evolutionary Mechanisms.* (2013) 269–80.
- [70] Stephan W, Li H. The recent demographic and adaptive history of *Drosophila melanogaster*. *Heredity.* 98 (2007) 65–8.

- [71] Watanabe Tk, Kawanishi M. Colonization of *Drosophila simulans* in Japan: P Jpn Acad. 52 (1976)191–4.
- [72] Hadley Wickham, Romain François, Lionel Henry and Kirill Müller. A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.0.0. “dplyr” (2020).
- [73] Hyndman R, Athanasopoulos G, Bergmeir C, Caceres G, Chhay L, O'Hara-Wild M, Petropoulos F, Razbash S, Wang E, Yasmeeen F. Forecasting functions for time series and linear models. “forecast” (2020)
- [74] Haudry A, Laurent S, Kapun M. Population Genomics on the Fly: Recent Advances in *Drosophila*: Methods Mol Biology Clifton N J. 2090 (2020) 357–96.
- [75] Achim Zeileis, Torsten Hothorn. Diagnostic Checking in Regression Relationships: R News 2(3) (2020) 7-10.
- [76] Russell V. Lenth. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. Journal of Statistical Software, 69(1) (2016) 1-33.
- [77] Parkash R, Aggarwal DD, Singh D, Lambhod C, Ranga P. Divergence of water balance mechanisms in two sibling species (*Drosophila simulans* and *D. melanogaster*): effects of growth temperatures: J Comp Physiology B. 183 (2013) 359–78.
- [78] Boulétreau-Merle J, Fouillet P, Varaldi J. Divergent strategies in low temperature environment for the sibling species *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: overwintering in extension border areas of France and comparison with African populations: Evol Ecol. 17 (2003) 523–48.
- [79] Pavković-Lučić, Sofija, et al. "Mating success and copulation duration in *Drosophila melanogaster* flies having different mating experience: a brief experimental note." Turkish Journal Zoology 41.6 (2017) 1010-1023.
- [80] Parsons P, Stanley S, Spence G. Environmental Ethanol at Low Concentrations: Longevity and Development in the Sibling Species *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: Aust J Zool. 27 (1979) 747–54.
- [81] Nielsen K, Hoffmann A. Numerical Changes and Resource Utilization in Orchard Populations of *Drosophila*: Aust J Zool. 33 (1985) 875–84.
- [82] Bublily OA, Kristensen TN, Loeschcke V. Stress-induced plastic responses in *Drosophila simulans* following exposure to combinations of temperature and humidity levels: J Exp Biol. 216 (2013) 4601–7.

- [83] Ballard JWO, Melvin RG, Simpson SJ. Starvation resistance is positively correlated with body lipid proportion in five wild caught *Drosophila simulans* populations: *J Insect Physiol.* 54 (2008) 1371–6.
- [84] Tantawy AO, Soliman MH. Studies on Natural Populations of *Drosophila* Vi. Competition Between *Drosophila melanogaster* And *Drosophila simulans*: *Evolution.* 21 (1967) 34–40.
- [85] B Rudis. hrbthemes: Additional Themes, Theme Components and Utilities for 'ggplot2'. R package version 0.8.0. “ggplot2” (2020) <https://CRAN.R-project.org/package=hrbthemes>
- [86] Ashburner M, Lemeunier F. Relationships within the melanogaster species subgroup of the genus *Drosophila* (Sophophora). I. inversion polymorphisms in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*: *Proc Royal Soc Lond Ser B Biological Sci.* 193 (1976) 137–57.
- [87] Aulard S, David JR, Lemeunier F. Chromosomal inversion polymorphism in Afrotropical populations of *Drosophila melanogaster*. *Genet Res.* 79 (2002) 49–63.
- [88] Charlesworth B. *Drosophila* Inversion Polymorphism. Edited by Costas B. Krimbas and Jeffrey R. Powell. CRC Press. *Genet Res.* 65 (1995) 247–8.
- [89] Kapun M, Schmidt C, Durmaz E, Schmidt PS, Flatt T. Parallel effects of the inversion In(3R)Payne on body size across the North American and Australian clines in *Drosophila melanogaster*. *J Evolution Biol.* 29 (2016) 1059–72.
- [90] Aulard S, Monti L, Chaminade N, Lemeunier F. Mitotic and Polytene Chromosomes: Comparisons Between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Genetica.* 120 (2004) 137–50.
- [91] Barghi N, Tobler R, Nolte V, Schlötterer C. *Drosophila simulans*: A Species with Improved Resolution in Evolve and Resequencing Studies: G3 Genes Genomes Genetics. 7 (2017) 2337–43.
- [92] Aquadro CF, Lado KM, Noon WA. The rosy region of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. I. Contrasting levels of naturally occurring DNA restriction map variation and divergence: *Genetics.* 119 (1988) 875–88.
- [93] Simon Garnier. Default Color Maps from 'matplotlib'. R package version 0.5.1. “viridis” (2018) <https://CRAN.R-project.org/package=viridis>
- [94] Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence

- Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 34: 3299-3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248
- [95] Nolte V, Weigel D, Schlötterer C. The impact of shared ancestral variation on hybrid male lethality – a 16 codon indel in the *Drosophila simulans* Lhr gene: *J Evolution Biol.* 21 (2008) 551–5.
- [96] Schöfl G, Schlötterer C. Microsatellite variation and differentiation in African and non-African populations of *Drosophila simulans*: *Mol Ecol.* (2006) 15:3895–905.
- [97] McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize: *Proc National Acad Sci.* 36 (1950) 344–55.
- [98] Onder BS, Bozcuk AN. P-M phenotypes and their correlation with longitude in natural populations of *Drosophila melanogaster* from Turkey: *Russ J Genet+.* 48 (2012) 1170–6.
- [99] Kofler R, Hill T, Nolte V, Betancourt AJ, Schlötterer C. The recent invasion of natural *Drosophila simulans* populations by the P-element: *Proc National Acad Sci.* 112 (2015) 6659–63.
- [100] Eeken JCJ, Jong AWM de, Green MM. The spontaneous mutation rate in *Drosophila simulans*: *Mutat Res Lett.* 192 (1987) 259–62.
- [101] David JR, Capy P, Hyytia P, Singh RS. Enzymatic and quantitative variation in European and African populations of *Drosophila simulans*: *Heredity.* 54 (1985) 209.
- [102] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K . *Molecular Biology and Evolution:* 35 (2018)1547-1549
- [103] Chakir M, Chafik A, Moreteau B, Gibert P, David JR. Male Sterility Thermal Thresholds in *Drosophila: D. simulans* Appears More Cold-adapted Than its Sibling *D. melanogaster*: *Genetica.* 114 (2002) 195–205.
- [104] Parsons PA. The Comparative Evolutionary Biology of the Sibling Species, *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: *Q Rev Biology.* 50 (1975) 151–69.
- [105] Hoffmann AA, Parsons PA. Direct and correlated responses to selection for desiccation resistance: a comparison of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: *J Evolution Biol.* 6 (1993) 643–57.
- [106] Schmidt PS, Conde DR. Environmental Heterogeneity and The Maintenance of Genetic Variation for Reproductive Diapause in *Drosophila melanogaster*: *Evolution* 60 (2006)1602–11.

- [107] Samish RM. Dormancy in Woody Plants: *Ann Rev Plant Physiol.* 5 (1954) 183–204.
- [108] Mansingh A. Physiological Classification of Dormancies in Insects: *Can Entomologist.* 103 (1971) 983–1009.
- [109] Campbell HA, Fraser KPP, Bishop CM, Peck LS, Egginton S. Hibernation in an Antarctic Fish: On Ice for Winter: *Plos One.* 3 (2008) e1743.
- [110] Mayhew WW. Hibernation in the horned lizard, *Phrynosoma m'calli*: *Comp Biochem Physiol.* 16 (1965) 103–19.
- [111] Lyman CP, Willis JS, Malan A, Wang Lch. Hibernation & Torpor in Mammals & Birds. (1982) 206–36.
- [112] Herman Ws. Studies on The Adult Reproductive Diapause of The Monarch Butterfly, *Danaus Plexippus*: *Biological Bulletin.* 160 (1981) 89–106.
- [113] Saunders DS, Henrich VC, Gilbert LI. Induction of diapause in *Drosophila melanogaster*: photoperiodic regulation and the impact of arrhythmic clock mutations on time measurement: *Proc National Acad Sci.* 86 (1989) 3748–52.
- [114] Baker DA, Russell S. Gene expression during *Drosophila melanogaster* egg development before and after reproductive diapause. *Bmc Genomics*:10 (2009) 242.
- [115] Begon M. Temporal variations in the reproductive condition of *Drosophila obscura* Fallén and *D. subobscura* collin: *Oecologia.* 23 (1976) 31–47.
- [116] Lumme J, Oikarinen A, Lakovaara S, Alatalo R. The environmental regulation of adult diapause in *Drosophila littoralis*: *J Insect Physiol.* 20 (1974) 2023–33.
- [117] Zhai Y, Lin Q, Zhang J, Zhang F, Zheng L, Yu Y. Adult reproductive diapause in *Drosophila suzukii* females: *J Pest Sci.* 89 (2016) 679–88.
- [118] Zonato V, Fedele G, Kyriacou CP. An Intronic Polymorphism in couch potato is not Distributed Clinally in European *Drosophila melanogaster* Populations nor Does it Affect Diapause Inducibility: *Plos One.* 11 (2016) e0162370.
- [119] Pegoraro M, Zonato V, Tyler ER, Fedele G, Kyriacou CP, Tauber E. Geographical analysis of diapause inducibility in European *Drosophila melanogaster* populations: *J Insect Physiol.* (2017) 98.
- [120] Zonato V, Vanin S, Costa R, Tauber E, Kyriacou CP. Inverse European Latitudinal Cline at the timeless Locus of *Drosophila melanogaster* Reveals Selection on a Clock Gene: Population Genetics of *Is-tim*: *J Biol Rhythm.* 33 (2018) 15–23.

- [121] Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu M-P, Yin C-M, Garofalo RS. A Mutant *Drosophila* Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function: *Science*. 292 (2001) 107–10.
- [122] Schiesari L, Kyriacou CP, Costa R. The hormonal and circadian basis for insect photoperiodic timing: *Febs Lett*. 585 (2011) 1450–60.
- [123] Schiesari L, Andreatta G, Kyriacou CP, O'Connor MB, Costa R. The Insulin-Like Proteins dILPs-2/5 Determine Diapause Inducibility in *Drosophila*: *Plos One*. 11 (2016) e0163680.
- [124] Schmidt PS, Zhu C-T, Das J, Batavia M, Yang L, Eanes WF. An amino acid polymorphism in the couch potato gene forms the basis for climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. *Proc National Acad Sci*. 105 (2008) 16207–11.
- [125] Lee Sf, Sgrò Cm, Shirriffs J, Wee Cw, Rako L, Heerwaarden Bv, et al. Polymorphism in the couch potato gene clines in eastern Australia but is not associated with ovarian dormancy in *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol*. 20 (2011) 2973–84.
- [126] Fabian DK, Kapun M, Nolte V, Kofler R, Schmidt PS, Schlötterer C, et al. Genome-wide patterns of latitudinal differentiation among populations of *Drosophila melanogaster* from North America: *Mol Ecol*. 21 (2012) 4748–69.
- [127] Cogni R, Kuczynski C, Koury S, Lavington E, Behrman EL, O'Brien KR, et al. The intensity Of Selection Acting on The Couch Potato Gene—Spatial—Temporal Variation in A Diapause Cline: *Evolution*. 68 (2014) 538–48.
- [128] Behrman EL, Kawecki TJ, Schmidt P. Natural variation in *couch potato* mediates rapid evolution of learning and reproduction in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Biorxiv*. (2018) 288696.
- [129] Costa R, Peixoto AA, Barbujani G, Kyriacou CP. A latitudinal cline in a *Drosophila* clock gene: *Proc Royal Soc Lond Ser B Biological Sci*. 250 (1992) 43–9.
- [130] Tauber E, Zordan M, Sandrelli F, Pegoraro M, Osterwalder N, Breda C, et al. Natural Selection Favors a Newly Derived timeless Allele in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 316 (2007) 1895–8.
- [131] Tatar M, Yin C-M. Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms: *Exp Gerontol*. 36 (2001) 723–38.

- [132] Flatt T, Tu M, Tatar M. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history: *Bioessays*. 27 (2005) 999–1010.
- [133] Paaby AB, Bergland AO, Behrman EL, Schmidt PS. A highly pleiotropic amino acid polymorphism in the *Drosophila* insulin receptor contributes to life-history adaptation: *Evolution*. 68 (2014) 3395–409.
- [134] Tatar M, Bartke A, Antebi A. The Endocrine Regulation of Aging by Insulin-like Signals: *Science*. 299 (2003)1346–51.
- [135] C. Aktas, Manipulating DNA Sequences and Estimating Unambiguous Haplotype Network with Statistical Parsimony. R package version 1.1.2. “haplotypes” (2020) <https://CRAN.R-project.org/package=haplotypes>.
- [136] Ruan Y, Chen C, Cao Y, Garofalo RS. The *Drosophila* Insulin Receptor Contains a Novel Carboxyl-terminal Extension Likely to Play an Important Role in Signal Transduction: *J Biol Chem*. 270 (1995) 4236–43.
- [137] Anderson AR, Hoffmann AA, Mckechnie SW. Response to selection for rapid chill-coma recovery in *Drosophila melanogaster*: physiology and life-history traits: *Genet Res*. 85 (2005) 15–22.
- [138] Storey KB. Life in a frozen state: adaptive strategies for natural freeze tolerance in amphibians and reptiles: *Am J Physiology-regulatory Integr Comp Physiology*. 258 (1990) R559–68.
- [139] Leather SR. Overwintering in six arable aphid pests: a review with particular relevance to pest management: *J Appl Entomol*. 116 (1993) 217–33.
- [140] Convey P. How are the life history strategies of Antarctic terrestrial invertebrates influenced by extreme environmental conditions?: *J Therm Biol*. 22 (1997) 429–40.
- [141] Ayrinhac A, Debat V, Gibert P, Kister A-G, Legout H, Moreteau B, et al. Cold adaptation in geographical populations of *Drosophila melanogaster*: phenotypic plasticity is more important than genetic variability: *Funct Ecol*. 18 (2004) 700–6.
- [142] Norry FM, Scannapieco AC, Sambucetti P, Bertoli CI, Loeschcke V. QTL for the thermotolerance effect of heat hardening, knockdown resistance to heat and chill-coma recovery in an intercontinental set of recombinant inbred lines of *Drosophila melanogaster*: *Mol Ecol*. 17 (2008) 4570–81.
- [143] Hallas R, Schiffer M, Hoffmann AA. Clinal variation *Drosophila serrata*, for stress resistance and body size: *Genet Res*. 79 (2002)141–8.

- [144] Hoffmann AA, Hallas R, Anderson AR, Telonis-Scott M. Evidence for a robust sex-specific trade-off between cold resistance and starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *J Evolution Biol.* 18 (2005) 804–10.
- [145] Hillesheim E, Stearns SC. Correlated Responses in Life-History Traits to Artificial Selection for Body Weight in *Drosophila melanogaster*. *Evolution.* 46 (1992) 745–52.
- [146] Yoshitake Y, Inomata N, Sano M, Kato Y, Itoh M. The P element invaded rapidly and caused hybrid dysgenesis in natural populations of *Drosophila simulans* in Japan: *Ecol Evol.* 8 (2018) 9590–9.
- [147] Faria VG, Sucena É. From Nature to the Lab: Establishing *Drosophila* Resources for Evolutionary Genetics: *Frontiers Ecol Evol.* 5 (2017) 61.
- [148] Nouhaud P, Tobler R, Nolte V, Schlötterer C. Ancestral population reconstitution from isofemale lines as a tool for experimental evolution: *Ecol Evol.* 6 (2016) 7169–75.
- [149] Boorman E, Parker GA. Sperm (ejaculate) competition in *Drosophila melanogaster*, and the reproductive value of females to males in relation to female age and mating status: *Ecol Entomol.* 1 (1976) 145–55.
- [150] King RC. The meiotic behavior of the *Drosophila* oocyte: *Int Rev Cytol.* 28 (1970) 125–68.
- [151] Williams KD, Sokolowski MB. Evolution: How Fruit Flies Adapt to Seasonal Stresses: *Curr Biol.* 19 (2009) R63–4.
- [152] Yerushalmi GY, Misyura L, MacMillan HA, Donini A. Functional plasticity of the gut and the Malpighian tubules underlies cold acclimation and mitigates cold-induced hyperkalemia in *Drosophila melanogaster*: *J Exp Biology.* 221 (2018) 174904.
- [153] Adrion JR, Hahn MW, Cooper BS. Revisiting classic clines in *Drosophila melanogaster* in the age of genomics: *Trends Genetics Fig.* 31 (2015) 434–44.
- [154] Coyne JA, Beecham E. Heritability of two morphological characters within and among natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 117 (1987) 727–37.
- [155] Land JV 't, Putten PV, Zwaan, Kamping, Delden WV. Latitudinal variation in wild populations of *Drosophila melanogaster*: heritabilities and reaction norms: *J Evolution Biol.* 12 (1999) 222–32.



- [156] Imasheva AG, Bubli OA, Lazebny OE. Variation in wing length in Eurasian natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*. 72 (1994) 508–14.
- [157] James AC, Azevedo RB, Partridge L. Cellular basis and developmental timing in a size cline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 140 (1995) 659–66.
- [158] Gilchrist AS, Partridge L. A comparison of the genetic basis of wing size divergence in three parallel body size clines of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 153(1999) 1775–87.
- [159] James AC, Azevedo RB, Partridge L. Genetic and environmental responses to temperature of *Drosophila melanogaster* from a latitudinal cline: *Genetics*. 146 (1997) 881–90.
- [160] Loeschcke V, Bundgaard J, Barker J. Variation in body size and life history traits in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii* from a latitudinal cline in eastern Australia: *Heredity*. 85 (2000) 423–33.
- [161] Vijendravarma RK, Narasimha S, Kawecki TJ. Plastic and evolutionary responses of cell size and number to larval malnutrition in *Drosophila melanogaster*. *Cell size plasticity and evolution: J Evolution Biol*. 24 (2011) 897–903.
- [162] Sezgin E, Duvernell DD, Matzkin LM, Duan Y, Zhu C-T, Verrelli BC, et al. Single-Locus Latitudinal Clines and Their Relationship to Temperate Adaptation in Metabolic Genes and Derived Alleles in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 168 (2004) 923–31.
- [163] Verrelli BC, Eanes WF. Clinal variation for amino acid polymorphisms at the *Pgm* locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 157 (2001) 1649–63.
- [164] Rand DM, Weinreich DM, Lerman D, Folk D, Gilchrist GW. Three selections are better than one: clinal variation of thermal QTL from independent selection experiments in *Drosophila*: *Evol Int J Org Evol*. 64 (2010) 2921–34.
- [165] Vigue CL, Johnson FM. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. VI. Frequency-property-environment relationships of allelic alcohol dehydrogenases in *D. melanogaster*. *Biochem Genet*. 9 (1973) 213–27.
- [166] Berry A, Kreitman M. Molecular analysis of an allozyme cline: alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* on the east coast of North America.: *Genetics*. 134 (1993) 869–93.

- [167] Russell Lenth Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4.8. “emmeans” (2020) <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- [168] Ong, Cynthia, et al. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity: *Nanotoxicology* 9.3 (2015) 396-403.
- [169] IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- [170] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020. URL <https://www.R-project.org/>.
- [171] Guirao-Rico S, and Agudé M. Positive selection has driven the evolution of the *Drosophila* insulin-like receptor (*InR*) at different timescale: *Molecular biology and evolution* 26.8 (2009) 1723-1732.