

***Gryllus campestris* L. (Orthoptera:Gryllidae)' nin Çeşitli Gelişim Evrelerinde Glikojen Seviyesindeki Değişimler**

M. Ali AKPINAR^{1*}, Nükhet AKPINAR¹, Kubilay METİN²,
A. Emre AKPINAR³, Salih GÖRGÜN¹

¹: Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sivas

²: Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın

³: Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Sivas

*makpinar@cumhuriyet.edu.tr

Received: 19.11.2009, Accepted: 03.12.2009

Özet : Bu çalışmada, *Gryllus campestris*'in yumurta ve birbirini izleyen gelişim evrelerinde glikojen seviyesindeki değişimler araştırılmıştır.

Yumurtadan itibaren gelişimi izlenen *G. campestris*'in yumurta, nimfleri, erkek ve dişi bireylerinin glikojen seviyeleri arasında farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Eşey ayrımının yapılamadığı 1., 2., 3. nimf evreleri arasında glikojen miktarında istatistiksel fark gözlenmemiştir. 5. nimf evresine doğru, glikojen miktarında bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Bu gelişim evresinden sonra, erkek ve dişi bireylerde glikojen seviyesinde artış meydana gelmiştir. En yüksek glikojen seviyesi 8. nimf evresinde gözlenmiştir. Ergin dişi böceklerin glikojen seviyesinde önemli bir düşüş gözlenirken, ergin erkeklerde önemli bir değişim saptanamamıştır.

Anahtar Sözcükler : *Gryllus campestris*, Gelişim Evreleri, Glikojen Seviyesi.

Variations in the Glycogen Level During Its Various Development Stages of *Gryllus campestris* L. (Orthoptera:Gryllidae)

Abstract : In this study, variations in the glycogen level of the egg and successive growth stages of *Gryllus campestris* were investigated.

It was determined that there were differences between glycogen levels of the egg, nymph, male and female individuals of *Gryllus campestris* monitoring their growths from the egg. In the glycogen amount, it was not observed statistical difference between the stages of 1., 2., 3 th. nymph, not carried out sex separation. Toward 5. nymph stage, a decrease in the glycogen amount were determined. After this growth stage, in male and female individuals, the increasing in the glycogen amount came into being. The highest glycogen level were observed in the 8 th. nymph stage. While observed important decrease in the glycogen level of mature female insect, not observed important variation in mature males.

Key words : *Gryllus campestris*, Development Stages, Glycogen Level.

Giriş

Böceklerde yağ doku, lipid, protein, glikojen ve serbest karbonhidratlar gibi enerjice zengin molekülleri sentezler ve depolarlar. Bu maddelerden lipid ve proteinler yağ dokunun en büyük bileşenleridir [1]. Diğer organizmalarda olduğu gibi böceklerde de glikojen yaşam döngüsünün farklı evrelerinde glikoz kaynağı olarak kullanılır. Böcek glikojeni, hemolenf hariç diğer dokularda depolanmasına rağmen en bol yağ dokuda, barsakta ve uçuş kaslarında bulunur [2].

Larvanın ergine dönüşümü sırasında glikojenin enerji kaynağı rolüne ilaveten, pupal kutikula ve imajinal dokuların sentezinde bir substrat olan glikozun da kaynağını oluşturur. Metamorfоз sırasında, özellikle de larvanın pupa değişimi sırasında glikojen metabolizmasıyla ilgili çalışmalar az sayıdadır [3]. Ancak, karbonhidrat kaynaklarının mobilizasyonu adipokinetik ve hipertrehalosemik hormonların kontrolü altında olduğu belirlenmiştir [4 - 6].

Değişik böcek türlerinin, değişik gelişim evrelerinde glikojen seviyelerini saptayan birçok çalışmaya rastlanmaktadır [3, 6-8]. Ancak, bu konuda *Gryllus campestris* L. (Orthoptera:Gryllidae) ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada *Gryllus campestris* L. nin yumurta da dahil çeşitli gelişim evrelerinde glikojen seviyeleri araştırılmıştır.

Materyal ve Metod

Örneklerin Toplanması ve Stok kültürün Yapılması

G. campestris'in ergin erkek ve dişi bireyleri Cumhuriyet Üniversitesi (Sivas) Kampüs alanından 2005 yılı Mayıs ve Haziran aylarında toplanmıştır. Toplanan bu örneklerle, $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık % 45 nem içeren ve günlük 10-12 saat aydınlatmaya koşullandırılmış kültür odasında stok kültür hazırlanmıştır. Stok kültür $15\times 15\times 30$ cm boyutlarındaki cam insektoryumlarda sağlanmıştır. Stok kültür ve nimfler buğday kepeği ve marul karışımı besinle beslenmiştir. Böceklerin su gereksinimleri, pamukla doldurulmuş ve devamlı sulu tutulan suluklardan karşılanmıştır. Ergin dişilerin yumurtalarını bıraktıkları kumlu petri kapları, $30\times 30\times 60$ cm boyutlarındaki insektoryumlara alınmıştır. 12-14 günlük inkübasyon süresinden sonra yumurtalardan çıkan nimfler, ergin oluncaya kadar stok besini ile beslenmişlerdir. Gelişimleri izlenen her nimf evresinden (1-9. nimf evreleri) yeterli sayıda birey alınarak glikojen seviyeleri için analizlenmiştir. Eşey ayrımının yapılabildiği 4. nimf evresinden itibaren erkek ve dişi nimfler ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Glikojen Analizi

Glikojen analizi için alınan örnekler tartılarak yaş ağırlıkları kaydedilmiştir ve %10 luk soğuk Trikloroasetik asit (TCA) içerisinde homojenizasyon yapılanaya kadar buzdolabında ($+ 4^{\circ}\text{C}$) bekletilmiştir. Glikojen özütlenmesinde Roe ve ark. [9], elde edilen glikojenin miktar tayini için Carrol ve ark. [10] yöntemi kullanılmıştır.

Örnekler, 5 ml TCA ile buzlu ortamda homojenize edilmiştir. Özütler filtre edildikten sonra toplam hacim saptanmıştır. Glikojen analizi için uygun hacimlerde alınan homojenat üzerine etil alkol ilave edilerek $35-40^{\circ}\text{C}$ lik su banyosunda glikojenin çökmesi için bir gece bekletilmiştir. İçinde glikojen bulunan tüpler 3500 devirde santrifüj edilerek çöken glikojen supernatantdan ayırt edilmiştir. Elde edilen örneklerle birlikte, bir kör (2 ml distilesu), birde standart örnek (2 ml'de 0.1 mg glikoz içeren) hazırlanmıştır. Bütün örneklerin üzerine 10'ar ml antron belirteci eklenerek, 80°C su banyosunda 30 dak bekletilmiştir. Örneklerin absorbansları 620 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunmuştur. Elde edilen verilerden, böceklerin yaş ağırlığına göre 100 mg'ındaki glikojenin mg cinsinden değeri aşağıdaki formülle saptanmıştır.

$$100 \text{ mg Dokuda Glikojen Miktarı} = \frac{\text{Bilinmeyen absorbansı}}{\text{Standartın absorbansı}} \times 0.1 \times \frac{\text{Eksrakt hacmi} \times 100 \times 0.9}{\text{Doku ağırlığı (mg)}}$$

0.1: 2 ml standart solusyonundaki glukoz miktarı

0.9: glukoz miktarının glikojen miktarına dönüşüm sabitesi

Verilerin Değerlendirilmesi

Örneklerin özütlenmesi sonucunda elde edilen glikojen miktarı üç tekrar üzerinden değerlendirilip ortalaması alınmıştır. Elde edilen verileri karşılaştırmak için varyans analizi [11], ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü için Multiple Range Testi [12] uygulanmıştır

Bulgular

G. campestris'in yumurtaları, çeşitli gelişim evreleri ve erginlerindeki glikojen miktarı Tablo 1 de gösterilmiştir. 1., 2. ve 3. nimf evrelerinde eşey tayini yapılamamıştır. Eşey tayini 4. nimf evresi itibariyle yapılabilmektedir. 4. nimf evresine kadarki evrelerde bireylerin yaş ağırlığında istatistiki olarak önemli artış gözlenmiştir. Bu evrelerde glikojen miktarında yumurtada bulunan miktara göre bir artış olmasına rağmen, 1. nimf evresindeki artış yumurtaya göre önemli bulunmuştur.

Yumurtada bulunan glikojen miktarı 0.39 mg'dır. 4. ve 5. nimf evrelerinde her iki eşeydeki glikojen miktarı ile yumurtadaki miktar arasında istatistiki bir fark bulunamamıştır. Ancak, bu evrelerdeki miktar 1., 2. ve 3. nimf evrelerinden düşüktür. 4., 5. ve 6. nimf evrelerinde yaş ağırlık artışında, dişi ve erkek bireylerde bir paralellik gözlenmiştir. Bu artış 7., 8. ve 9. nimf evrelerinde de devam etmiştir. Ergin dişilerin erkeklerden daha ağır oldukları saptanmıştır.

7. nimf evresinden itibaren dişi bireylerde glikojen miktarında görülen artış erkek bireye göre daha fazladır. 7., 8. ve 9. evrelerdeki dişilerde glikojen miktarının diğer evrelerdeki bireylerden önemli derecede farklı bulunmu, fakat kendileri arasında bir fark gözlenmemiştir. Aynı nimf evrelerinde erkek bireylerin glikojen miktarının, dişilere göre daha az olmasına rağmen, bunlarda 6., 7., 8. ve 9. nimf evreleri arasında bir fark gözlenmemiştir.

Ergin evrede ise dişilerde, erkeklere göre glikojen miktarının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Eşey ayrımının belirginleştiği 4. nimf evresinden, gelişimin sonuçlandığı ve ergin birey oluşumuna geçen 9. nimf evresine doğru hem erkek hem de dişi

bireylerde glikojen miktarında görülen artış, ergin bireylerde özellikle dişilerde önemli ölçüde azalmıştır.

Tartışma ve Sonuç

G. campestris'in çeşitli gelişim evrelerine ait glikojen miktarı ve değişime ait herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız bu çalışma ile yumurtadan itibaren 1.- 9. nimf evreleri ve erginlerinde glikojen seviyesi belirlenmiştir.

Böceklerde önemli enerji kaynakları, glikojen depoları ve yağ dokusudur. Metabolik ve fiziksel faaliyetlerinin yürütülmesinde ilk başvuru enerji kaynağının glikojen olduğu bilinmektedir [13, 14].

G. campestris'in yumurta, nimfler ve erginleri ile yapılan bir çalışmada gelişim evrelerinde fizyolojik gereksinimlerden dolayı yağ asitlerinde azalma meydana geldiği, ancak yağ asit profilleri arasında bir fark gözlenmediği belirlenmiştir [15]. Böceklerin gerekli enzim sistemleriyle yağ asit metabolizmalarını düzenleyebildikleri saptanmıştır [16].

Embriyogenez sonrası 1. nimf evresinde glikojen seviyesinin oldukça yüksek olması, glikojen rezervini oluşturmak için glukoneogenez gereksinim duyulduğu anlaşılmaktadır. 4., hatta 5. nimf evrelerine doğru glikojen miktarında görülen azalma bu gelişim evrelerinde büyük miktarda enerji harcandığı ve bu enerjinin glikojenden sağlandığını göstermektedir. 6. nimf evresinden sonra erkek ve dişi *G. campestris*'lerde glikojen sentezinin artışıyla, yeni nimfal glikojen miktarında artış gerçekleşmiştir. Beslemeye bağlı olarak görülen bu artışta lipid mobilizasyonunda etkili olabileceği söylenebilir [15-17].

Böcek türleri arasında metamorfoz gösterenlerin, glikojen, lipid ve trehaloz rezervlerini kullanmalarına rağmen, enerji kaynağı ve dokuların hücrel bileşenlerinin sentezi için larval periyotlarda karbonhidratları daha çok kullandıkları gösterilmiştir. Katabolik ve anabolik glikojen enzimlerinin aktivitelerinin yanı sıra, glikojenin miktarı ve kalitesinin de larval evrelerde etkin olduğu saptanmıştır [3].

G. campestris'in 9. nimf evresinde hem erkek hemde dişilerde glikojen miktarında görülen azalmanın özellikle ergin dişilerde daha da belirginleştiği gözlenmiştir. Bunda yaşın ilerlemesi ve nimfal gelişimin durması etkin olabilir [4, 18]. Ayrıca glikojen, nimfal evre ile ergine geçiş esnasında enerji kaynağı rolüne ilaveten kutikula ve imajinal dokuların sentezi için bir substrat olarak kullanılan glikozun da kaynağını

oluşturmaktadır [19]. Ancak, böceklerde metamorfoz veya gelişim evreleri sırasında glikojen metabolizması ile ilgili çalışmalar henüz yeterli değildir. Sonuçlarımız *G. campestris*'in gelişiminde nimf evrelerinde görülen glikojen mobilizasyonu ve metabolizmasının daha ayrıntılı incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

Tablo 1. *G. campestris*'in çeşitli gelişim evrelerinde ağırlık ve glikojen miktarı (mg)

	Kullanılan birey sayısı	Yaş ağırlık	Yaş ağırlık	Glikojen miktarı ^z	Glikojen miktarı ^z
		♀ (Ort.*±S.H.) ^t	♂ (Ort.*±S.H.) ^t	♀ (Ort.*±S.H.) ^t	♂ (Ort.*±S.H.) ^t
Yumurta	350	166.30±1.06 b	166.30±1.06 b	0.39±0.02 bd	0.39±0.02 bd
1. nimf	10	11.33±0.66 a	11.33±0.66 a	1.05±0.02 ac	1.05±0.02 a
2. nimf	10	150.00±22.85 b	150.00±22.85 b	0.71±0.10 ab	0.71±0.10 ab
3. nimf	10	267.03±10.71 c	267.03±10.71 c	0.62±0.06 ab	0.62±0.06 ab
4. nimf	5	697.00±44.97 dg	541.06±18.08 d	0.36±0.10 bd	0.52±0.12 bc
5. nimf	3	613.53±32.62 e	646.90±2920 e	0.36±0.04 bd	0.35±0.04 b
6. nimf	3	649.56±38.08 de	694.56±26.03 e	0.72±0.19 ad	0.79±0.21acd
7. nimf	3	700.60±17.94 dg	738.06±38.37 ef	0.85±0.32 ac	1.00±0.13 a
8. nimf	3	783.10±26.26 g	819.33±14.11 fg	1.27±0.14 c	1.06±0.11 a
9. nimf	3	862.60±18.53 f	867.80±11.48 g	1.15±0.18 c	0.85±0.06 ac
Ergin	3	988.16±14.09 h	905.73±18.76 g	0.65±0.02 ad	0.95±0.36 ac

*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

t: Her sütunda aynı harflerle gösterilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir.

z: 100 mg dokuda mg cinsinden glikojen miktarı

Kaynaklar

- [1] Lorenz, M.W. (2003). *Comp. Biochem. Physiol B* 136:197-206.
- [2] Beenackers, A.M.T., Van der Horst, D.J. and Van Marrewijk, W.J.A. (1985). *Prog. Lipid Res.* 24:19-67.
- [3] Tolmasky, D.S., Rabossi, A., Quesada-Allue, L.A. (2001). *Ach. Biochem. Biophys.* 392(1):38-47.
- [4] Chen, A.C. and Friedmann, S. (1977). *J. Insect Physiology* 339-344.

- [5] Steele, J.E. (1982). *Insect Biochemistry* 12, 131-147.
- [6] Zaluska, H. (1959). *Acta Biological Experimental* 19, 339-351.
- [7] Hague, M.S. (1975). *Can. J. Zool.* 53, 290-292.
- [8] Yanıkođlu, A. (1985). *Cum. Üniv. Fen Bil. Derg.* 3(1), 57-68.
- [9] Joseph, H., Roe, J.M., Bailey, R., Richart, G. and Jonh, N.R. (1961). *J. Biol. Chem.* 236, 5. Printed in USA.
- [10] Nicholas, V., Carroll, R., Longley, W. and Josep, H.R. (1956). *J. Biol. Chem.* 220, 583-593.
- [11] Velicangil, S. (1984). *Biyoistatistik, Filizkitabevi.*
- [12] Duncan, D.B. (1955). *Biometrics* 11, 1-41.
- [12] Vardanis, A. (1963). *Biochem. Biophys, Acta* 73, 565-573.
- [13] Lorenz, M.W. and Anand, A.N. (2004). *Arc. Innsect Biochem. Physiol.* 56,110-119.
- [14] Akpınar, M.A., Akpınar, N., Gencer, L. and Turkođlu, Ő. (2003). *Biologia, Bratislava* 58(6), 1053-1059.
- [15] Stanley-Samuelson, D.W., Thomas, O.D., Clyde, L.O. and Melody, A.K. (1992). *Comp. Biochem. Physiol.* 102 A(1), 173-178.
- [16] Nettles, W.C. and Betz, N. (1965). *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 58, 721-726.
- [17] Őeker, D.A. ve Yanıkođlu, A. (1999). *Tr. J. of Zoology* 23 (1), 289-296.
- [18] Chippendale, G.M. (1978). in *Biochemistry of İnsects* (Rockstein, M., Ed.) pp. 1-55. Academic Pres, N.Y.