

GİBBERELLİK ASİT (GA₃)'İN KONAK *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALİDAE) VE PARAZİTOİT *Pimpla turionellae* L. (HYMENOPTERA: ICHNEUMONİDAE) HEMOLEN KİMYASI VE HEMOSİTLERİNE ETKİSİ

Hülya ALTUNTAŞ

Doktora tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Nisan-2011

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 091003.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hülya ALTUNTAŞ'ın "Gibberellik asit (GA₃)'in konak *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ve parazitoit *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) hemolenf kimyası ve hemositlerine etkisi" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Doktora tezi 15.04.2011 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. A. YAVUZ KILIÇ

Üye: Prof. Dr. AHMET ÖZATA

Üye: Prof. Dr. Dilek AK

Üye: Prof.Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL

Üye: Doç. Dr. Ekrem ERGİN

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

GİBBERELLİK ASİT (GA₃)'İN KONAK *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) VE PARAZİTOİT *Pimpla turionellae* L. (HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE) HEMOLENF KİMYASI VE HEMOSİTLERİNE ETKİSİ

Hülya ALTUNTAŞ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ
İkinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN
2011, 144 sayfa

Konak böcek büyük balmumu güvesi, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera; Pyralidae) ve pupal endoparazitoit *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)'nin yetiştirilmesi ve deneyler 25 ± 2 °C sıcaklık, % 60 ± 5 nispi nem ve 12:12 (Aydınlık: Karanlık) fotoperiyot şartlarında yapıldı. Farklı dozlarda (50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 ppm) konağa verilen Gibberellik asit (GA₃)'in, konak *G. mellonella* ve parazitoit *P. turionellae*'nin larval hemolenf proteinleri ve serbest aminoasitleri ile konak hemositlerinin sayısı, apoptozis, mitotik indeks, enkapsülasyon ve melanizasyon tepkilerine etkileri belirlendi. Hem konak da hem de parazitoit larval hemolenfde belirlenen proteinler ve aminoasitlerin bazıları GA₃ uygulamasına bağlı olarak artış gösterirken bazıları ise azalma gösterdi. *G. mellonella* larvalarında hemosit sayısı 50-500 ppm aralığındaki GA₃ dozlarında artış gösterdi. GA₃ uygulaması farklı hemosit tipleri üzerinde etkili olmazken, mitotik indeksin 5000 ppm'de önemli oranda arttığı görüldü. GA₃ uygulamasına bağlı olarak canlı hemositlerin 5000 ppm'lik deney gruplarında önemli bir azalma gösterdiği, erken apoptozis indeksinin değişiklik göstermediği, geç apoptotik indeksinin yüksek dozlarda arttığı ve nekrotik indeksin tüm dozlarda artış gösterdiği tespit edildi. GA₃'ün konak larval hemositlerindeki, enkapsülasyon davranışı üzerine etkisi, enkapsülasyon durumuna ve zamana bağlı olurken deney gruplarıyla bağımlı olmadığı belirlendi. Hemositlerdeki melanizasyon tepkisi ise zamana bağlı olarak farklılık gösterirken 24'üncü saatte genel olarak tüm dozlarda azalma görüldü. Sonuçlar, GA₃ uygulamasının hem konak hem de parazitoitin endokrin metabolizmasında rol oynayan proteinlerle enerji metabolizmasıyla ilişkili aminoasitlerde değişikliğe neden olduğunu ve konağın hücrel immun savunmasını da olumsuz yönde etkileyebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Gibberellik asit, Hemolenf proteinleri, Serbest aminoasitler, Hemosit, Apoptoz, Enkapsülasyon

ABSTRACT

Phd Thesis

EFFECTS OF GIBBERELIC ACID (GA₃) ON HEMOLYMPH CHEMISTRY AND HEMOCYTES OF THE HOST *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) AND PARASITOID *Pimpla turionellae* L. (HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE)

Hülya ALTUNTAŞ

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ
Co-Supervisor: Ass. Prof. Dr. Fevzi UÇKAN
2011, 144 pages

Stock culture pupal endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) and its host greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) were reared in the laboratory at 25 ± 2 °C, 60 ± 5 % relative humidity, and a photoperiod of 12:12 h. Assays with Gibberellic acid (GA₃) were also carried out in the same laboratory condition with stock culture. GA₃ dose-related (50 to 5000 ppm) changes in hemolymph proteins and free aminoacids of both host and parasitoid larvae, and the effects of (GA₃) on the number, apoptotic and mitotic indices, encapsulation and melanization responses of the host hemocytes were detected. Dose-dependent increases and decreases in proteins and free aminoacids in host and parasitoid larval hemolymph were detected. Total hemocyte counts increased in *G. mellonella* larvae at all treatment doses whereas GA₃ application had not effect on the number of different hemocyte type. While the ratio of necrotic hemocytes increased at all GA₃ treatments, that of late apoptotic cells was only higher at doses >200 ppm when compared to untreated larvae. In contrast, a decrease in viable hemocyte indices was observed at the highest dose of 5000 ppm and no difference was observed in early apoptotic indices of larvae at all treatments. The percentage of mitotic index also increased at 5000 ppm. Encapsulation rates of larval hemocytes were dependent on the extent of encapsulation and time but not treatment groups. While the extent of melanization of hemocytes showed differences related to time, in general, a decrease was observed at all doses of GA₃ treated larvae at 24 h. The results indicated that GA₃ treatment affected host and parasitoid protein profiles involved in endocrinal metabolisms and aminoacids associated with energy metabolisms along with its suppression on the cell immune responses of the host.

Key Words: Gibberellic acid, Hemolymph proteins, Free aminoacid, Hemocyte, Apoptosis, Encapsulation

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarımın tüm basamaklarında değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgisini, sabrını ve hoşgörüsünü esirgemeyen ve yanımda olan, çok değerli Danışman Hocalarım Sayın Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tez izleme komisyonunda bulunan ve sunumlarıma özveriyle katılarak değerli görüşlerini paylaşan ve tezime yön veren sayın jüri üyeleri, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet ÖZATA ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilimdalı öğretim üyesi Prof. Dr. Dilek AK'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın deneysel aşamalarında değerli öneri ve bilgilerinden yararlandığım, Yrd. Doç. Dr. Olga SAK ve Arş. Gör. Dr. Aylin ER'e sonsuz teşekkür ederim. Çalışma sonuçlarımın istatistiksel değerlendirilmesinde bana yardımcı olan ve ayrıca desteğiyle beni daima motive eden çok değerli hocam Doç. Dr. Ekrem ERGİN'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, sevgi ve güvenlerini benden hiç esirgemeyen, eğitimimi sürdürebilmem için bana her türlü imkanı tanıyan canım babam Haydar YALÇITAŞ'a, annem Hatice YALÇITAŞ'a ve ablam Hale KORUCUOĞLU'na yürekten minnettar olduğumu belirtmek isterim. Son olarak, çalışmalarım süresince değerli vaktini bana ayıran, tüm sıkıntılarında hep yanımda olan, sevgisini ve manevi desteğini her zaman hissettiren sevgili eşim Önder ALTUNTAŞ'a sonsuz teşekkürler...

Eskişehir, 2011

HÜLYA ALTUNTAŞ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Bitki Gelişim Düzenleyicileri (BGD)	12
1.1.1 Gibberellik asit (GA ₃)	14
1.2 Hemositler	17
1.2.1 Enkapsülasyon	21
1.2.2 Hemositlerde apoptozis ve nekrozis mekanizmaları.....	23
1.3 Hemolenf Proteinleri ve Serbest Aminoasitler	25
1.4 <i>Galleria mellonella</i> Linnaeus, 1758 (Büyük Balmumu Güvesi).....	27
1.4.1 Sistematikteki yeri.....	29
1.5 <i>Pimpla turionellae</i> Linnaeus, 1758.....	29
1.5.1 Sistematikteki yeri.....	31
2. MATERYAL VE YÖNTEM	32
2.1 Laboratuvar	32
2.2 Konak ve Parazitoit Stok Kültürlerinin Kurulması.....	32
2.3 Konak ve Parazitoit Süksesif Kültürlerinin Kurulması	33
2.4 Gibberellik Asit.....	34
2.5 Deney Grupları.....	34
2.6 Hemolenf Toplama	35
2.7 Konak ve Parazitoit Hemolenf Proteinlerinin Analizi	36
2.7.1 Çözeltilerin hazırlanması	36

2.7.2	Protein örneklerinin hazırlanması	38
2.7.3	Jellerin hazırlanması	39
2.7.4	Elektroforez.....	40
2.7.5	Moleküler ağırlık.....	41
2.8	Konak ve Parazitoit Serbest Aminoasitlerinin Analizi	41
2.8.1	Hemolenf ve aminoasit standartlarının hazırlanması.....	42
2.8.2	PITC ile türevlendirme.....	42
2.8.3	HPLC cihazı ve koşulları	43
2.8.4	Kantitatif analiz.....	44
2.9	Konak Hemosit Analizi.....	44
2.9.1	Toplam hemosit sayısı	45
2.9.2	Farklı hemosit sayıları ve mitotik indeks	47
2.9.3	Apoptotik indeks	48
2.9.4	Enkapsülasyon ve melanizasyon analizi	49
2.10	İstatistik.....	50

3. BULGULAR 51

3.1	GA ₃ 'ün Konak Hemolenf Proteinleri Üzerine Etkisi.....	51
3.2	GA ₃ 'ün Parazitoit Hemolenf Proteinleri Üzerine Etkisi	55
3.3	GA ₃ 'ün Konak ve Parazitoit Hemolenf Serbest Aminoasitlerine Etkisi	58
3.3.1	Konak hemolenf serbest aminoasit değişimi	69
3.3.2	Parazitoit hemolenf serbest aminoasit değişimi.....	75
3.4	GA ₃ 'ün Konak Hemositlerine Etkisi	82
3.4.1	Konak toplam hemosit sayısı	82
3.4.2	Konak böceğin farklı hemosit tipleri, sayısı ve mitotik indeks... 83	
3.4.3	Konak hemositlerinde apoptotik indeks.....	88
3.4.4	Konak hemositlerinde enkapsülasyon ve melanizasyon.....	92

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİ 100

KAYNAKLAR 117

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

1.1	Gibberellik asit (C ₁₉ H ₂₂ O ₆)	15
1.2.	Böcek hemolenfindeki hemositlerin genel görünümleri	18
1.3.	Konak <i>Galleria mellonella</i> larva, pup ve ergin bireyi.....	29
1.4.	Parazitoit <i>Pimpla turionellae</i> 'nın larva, pupa ve ergin dönemleri (♀♂).....	31
2.1.	Neubauer hemositometre lamı.....	45
2.2.	Neubauer hemositometresi sayım alanı	46
3.1.	GA ₃ 'le beslenen konak <i>G. mellonella</i> son evre larvalarının hemolenf protein profili.....	52
3.2.	Konak <i>G. mellonella</i> 'ya uygulanan GA ₃ 'ün parazitoit <i>P. turionellae</i> son evre larvalarının hemolenf protein profili	56
3.3.	Amino asit standart karşımının HPLC kromatogramı, her bir aminoasit 2x10 ⁻⁵ mmol konsantrasyondadır	60
3.4.	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi'nde <i>G. mellonella</i> son evre larval hemolenfinin serbest amino asit içeriği.....	61
3.5.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nde <i>P. turionellae</i> hemolenfinin serbest amino asit içeriği	65
3.6.	Konak <i>G. mellonella</i> son dönem larvalarında Giemsa boyama yöntemi ile gözlemlenen farklı hemosit tipleri	83
3.7.	Konak <i>G. mellonella</i> son dönem kontrol grubu larvalarında Faz-Kontrast mikroskopta gözlemlenen farklı hemosit tipleri	85
3.8.	GA ₃ 'ün konak farklı hemosit sayılarına etkileri.....	86
3.9.	Konak <i>G. mellonella</i> son dönem larvalarında mitoz bölünme evresindeki hemositler	87
3.10.	Acridine Orange ve Ethidium Bromide ile boyanmış <i>G. mellonella</i> larval hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri	89
3.11.	<i>G. mellonella</i> larva evresinde erken apoptotik hemosit	90
3.12.	<i>G. mellonella</i> larva evresinde geç apoptotik hemosit.....	90
3.13.	<i>G. mellonella</i> larva evresinde nekrotik hemositler	91

3.14. GA ₃ uygulamasına bağlı olarak konak larvası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları	92
3.15. <i>G. mellonella</i> son evre larvasında 24 saat sonra Sephadex A-25 boncuğu	93
3.16. GA ₃ uygulamasına bağlı olarak <i>G. mellonella</i> larva evresinde enkapsülasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	95
3. 17. Sephadex DEAE A-25 boncuklarının <i>G.mellonella</i> larvalarına enjeksiyona bağlı hemositlerde ve boncuklarında melanizasyon	98
3.18. GA ₃ uygulamasına bağlı olarak <i>G. mellonella</i> larva evresinde melanizasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

2.1. Broskill (1961) tarafından verilen ve Sak ve ark (2006) tarafından modifiye edilmiş yapay konak böcek <i>G. mellonella</i> besini.....	34
2.2. SDS-PAGE jellerinde bant analizinde kullanılan protein standartları ve moleküler ağırlıkları	38
3.1. GA ₃ uygulamasına bağlı olarak SDS-PAGE jellerindeki protein bantlarının optik densitometrik (O.D.) değerleri.....	53
3.2. GA ₃ uygulamasına bağlı olarak SDS-PAGE jellerindeki protein bantlarının optik densitometrik (O.D.) değerleri.....	57
3.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi'nde aminoasit standartlarına ait piklerin alıkonma zamanları ve kalibrasyon eşitlikleri.....	59
3.4. GA ₃ uygulamasına bağlı olarak <i>G. mellonella</i> larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin pik yüzde alanları (%) ve doza bağlı değişimleri.....	70
3.5. GA ₃ uygulamasına bağlı olarak <i>G. mellonella</i> larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin miktarları (ng/μl).....	73
3.6. <i>P. turionellae</i> larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin pik yüzde alanları (%) ve doza bağlı değişimleri	76
3.7. GA ₃ uygulamasına bağlı olarak <i>P. turionellae</i> larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin miktarları (ng/μl).....	79
3.8. GA ₃ 'ün konak böcek <i>G. mellonella</i> son evre larva toplam hemosit sayılarına (x10 ⁶ hücre/ml) etkileri.....	82
3.9. GA ₃ 'ün konak <i>G. mellonella</i> larvalarının farklı hemosit sayılarına etkileri	86
3.10. GA ₃ 'ün konak <i>G. mellonella</i> son dönem larva evresindeki mitotik indeks (%) değişimleri	88
3.11. Farklı GA ₃ dozlarının <i>G. mellonella</i> son dönem larva evresinde erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücre (%) sayısına etkileri	91

3.12. Farklı GA ₃ dozlarının 4 ve 24 saatlik periyotlarda <i>G. mellonella</i> larval hemositlerinin enkapsülasyon davranışlarına etkileri	96
3.13. Farklı deney grupları, zaman, enkapsülasyon durumları ve bunların birbirleriyle ilişkilerinin <i>G. mellonella</i> son dönem larvalarındaki enkapsülasyon davranışına etkilerini gösteren ANOVA tablosu	97
3.14. Farklı GA ₃ dozlarının <i>G. mellonella</i> larval hemositlerinin Sephadex-A25 boncuklarında melanizasyon durumuna (%) etkileri.....	98

1. GİRİŞ

İnsan nüfusunun hızla artış gösterdiği günümüzde tarımsal verimliliği yükseltmek ve elde edilen ürün miktarını hızla arttırmak bir hedef olmuştur. Tarımsal üretimde, ürün kalitesinin artırılması, sınırlı bir alandan yeterli oranda ürün alınması ve elde edilen ürünün zararlılara karşı daha dirençli olması amacıyla gübre, tohum ve pestisitler gibi çeşitli kimyasal bileşiklerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Bu kimyasalların ekosisteme girdilerinin yoğun olmasının yanında halk dilinde HORMON olarak bilinen Bitki Gelişim Düzenleyicileri (BGD) de tarımsal faaliyetlerde değerli bir araç olarak kullanılmaktadırlar (Mickel 1978; McDonald ve ark. 1988). Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de meyve üretimi çalışmalarında gövde uzaması, çimlenme, çiçeklenme ve meyve büyümesini hızlandırmada, meyve olgunlaşma süresinin uzatılmasında, arpanın maltlaşmasında ve bitki ıslahı gibi çok çeşitli ticari alanlarda yaygın olarak kullanılan BGD'lerden birisi de Gibberellinler grubundan olan gibberellik asit (GA_3)'tir (Metzger 1987; Kocaçalışkan 2005). Bu bileşiklerin pestisitler gibi yaygın olarak kullanılması miktarlarının çevresel ortamlarda azımsanmayacak boyutlara ulaşmasına neden olmaktadır. Özellikle de zararlı olan böceklerle karşı kimyasal kısırlaştırıcılar (kemosterillanlar) olarak bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımına ilişkin girişimlerin de giderek artması kullanım miktarlarını daha da yükseltmektedir (Mickel 1978; McDonald ve ark. 1988; Silva ve ark. 2003; Paulson ve ark. 2005). Ayrıca, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bir bitki gelişim düzenleyici olan GA_3 'ü pestisit listeleri içinde değerlendirmektedir (WHO 1990). Bu durum ise, BGD'lerin çevre ve insan sağlığı açısından risk oluşturabileceği hususunu yoğun olarak tartışılır hale getirmiştir.

Tarımsal sistemlerde zararlı böceklerle yapılan kimyasal kontrolün yaygın olarak kullanılması, böceklerin dayanıklılık kazanmaları, çevredeki faydalı böceklerin, bal arılarının, kuşların ve balıkların kitlesel ölmeleri, besin zinciri yoluyla insanlara kadar ulaşarak kanserojen, teratojen ve mutajen etkiler gibi olumsuz sonuçların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Cox 1996; Lee ve ark. 1996; Andow ve ark. 1997; Ahmad ve ark. 1997; Soderlund ve Knipple 1999; Montagna ve ark. 1999; Ribeiro ve ark. 2003). Bu nedenle kimyasal bileşiklerin

kullanımının azaltıldığı ya da hiç kullanılmadığı yeni kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi üzerindeki çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır. Özellikle, gelişmiş ülkelerde, 1980 sonrasında “Birleşik Zararlı Yönetimi (Integrated Pest Management)” (IPM) denilen bir yöntem geliştirilmiştir (Hillocks 1995; Elad ve Shtienberg 1995; Sierpińska 1998; Edge ve ark. 2001). IPM, zararlıların kontrol altında tutulması amacıyla günümüze kadar geliştirilmiş olan yöntemlerden birkaçının bir arada kullanılmasıdır. Bu yöntemde amaç, pestisit kullanımını en aza indirmek, bütün kontrol olanaklarını araştırmak, çevre direncinin arttırmak ve zararlıların doğal düşmanlarından en üst düzeyde yararlanmaktır (Hillocks 1995; Hill ve Foster 2000; Wells ve ark. 2001; Simmonds ve ark. 2002; Tomberlin ve ark. 2002; Schneider ve ark. 2003). Çevre direncinin arttırılmasında zararlılara dayanıklı bitki türlerinin yetiştirilmesinin yanı sıra doğal düşman popülasyonlarının arttırılması ve bunlardan yararlanılması da IPM programlarının temel unsurlarını oluşturmaktadır (Rosen 1985). Tarımsal zararlıların kontrolünde kullanılan IPM programlarında başarı için çoğu kez kimyasal ve biyolojik kontrol yöntemlerinin uygun olarak birlikte kullanımı gerekebilir (Takada ve ark. 2001; Wills ve ark. 2001; Xu ve ark. 2001; Simmonds ve ark. 2002). Kültür bitkilerindeki yabancı otları öldürmek amacıyla bitkisel hormonları içeren kimyasallar da yaygın bir şekilde herbisit olarak kullanılmaktadırlar (Yegen 1993; Kaya ve Yanıkoğlu 1999). *Drosophila melanogaster* Meig. (Diptera: Drosophilidae) ve *Bactrocera cucurbitae* Coquillet (Diptera: Tephritidae) ile yapılan çalışmalarda indol-3-asetik asit (IAA), absisik asit (ABA), kinetin, gibberellik asit, kumarin gibi bitki gelişim düzenleyicilerinin böcek üreme ve gelişmesi üzerinde toksik etkileri olduğu saptanmış ve bu kimyasalların IPM programlarında insektisit olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir (Özmen ve ark. 1995; Yeşilada ve Bozcuk 1995; Kaur ve Rup 2000). Hatta, Posnova (1974), bitki gelişim düzenleyicilerinin böcekleri baskı altına almak amacıyla IPM programlarında kullanılabilmesini bildirmektedir. Tarımsal üretimi arttırma durumundaki ülkeler bitki büyüme hormonlarının yanında bazı pestisit ve herbisitleri de yoğun olarak kullanmaktadır. Ancak, IPM programlarında bu kimyasalları kullanırken sadece zararlı böceklere olan etkilerinin yanında asıl hedef olmayan yararlı böceklere olan etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır.

IPM programlarında kullanılan yöntemler içinde en çok kabul göreni hiç kuşkusuz, doğal dengenin korunmasını sağlayan, canlı ve cansız ortama hiçbir zararı olmayan veya önemsiz derecede olan, doğada bir birikime ve çevresel kirliliğe yol açmayan “Biyolojik Kontrol” yöntemidir (Kansu ve Uğur 1984; Rosen 1985; Hillocks 1995; Andow 1997; Simmons ve ark. 2002).

Biyolojik kontrol, genel olarak zararlı bir türün popülasyonunun, onun doğal düşmanı olan bir başka canlı türün popülasyonu tarafından baskılanmasını ifade etmektedir. Biyolojik kontrolde baskılama aracı olarak kullanılan tür, biyolojik kontrol ajanı olarak adlandırılmaktadır. Biyolojik kontrol ajanı olarak parazitler, parazitoitler, predatörler, bakteriler ve virüsler kullanılabilir (Hajek 2004). Ekosistemin korunmasındaki katkıları ve bu yolla insanlara olan yararları düşünüldüğünde biyolojik kontrolde kullanılan ajanlar içinde belki de en uygunu, en az risk taşıyanı ve en çok spesifik etki yapanı parazitoitlerdir (Andow 1997; Xu ve ark. 2001a). Bu nedenle parazitoitler gizli ekolojik can simitleri olarak nitelendirilmektedir (Uçkan ve Gülel 2002). Parazitoitlerin çoğalması konak ile orantılı olduğundan, konak sayısındaki artış parazitoit sayısını artırmakta, konak sayısındaki azalma ise parazitoit sayısını azaltmaktadır (Faulds 1991). Böylece konak ve parazitoit arasında belli bir denge sağlanmaktadır. Bu dengenin devam ettirilmesi ise kullanılan veya kullanılmaya aday olan parazitoit türlerin mikroçevresi olan konağı ve makroçevresi olan ekosistemden kaynaklanan çevresel faktörlerle ilişkilidir (Uçkan ve Gülel 2002; Chen ve Welter 2002). Parazitoit kullanarak yapılacak olan biyolojik kontrol çalışmalarının yapılacağı çevresel ortamda konağı etkileyebilecek her türlü olumsuz koşul, yaşamı konağına bağlı olan parazitoiti de etkileyecektir (Cox 1996; Xu ve ark. 2001a; Ribeiro ve ark. 2001; Xu ve ark. 2001b). Genel olarak, çevresel kirleticilere karşı Hymenoptera takımına ait parazitoitler, Lepidoptera takımına ait konak böcekler göre daha fazla duyarlıdır ve daha fazla etkilenirler (Büyükgüzel 2006; Uçkan ve ark. 2007). Çünkü, parazitoitler, hem ergin öncesi gelişimlerini tamamlayabilmek için değişik böcek takımlarına ait türlerin yumurta (Doutt 1959; Hamerski ve Hall 1988), larva (Obrycki ve ark. 1985; Peter ve David 1990; Şengonca ve Peters 1993; Ramadan ve ark. 1995), prepupa (Gülel 1982; Wharton 1993), pupa ya da erginlerini (Kansu ve Uğur 1984) konak olarak kullanırlar hem

de ergin dönemde besinlerini çiçek özü ve nektar gibi çeşitli besinlerden sağlamaktadırlar. Böylece parazitoidler, bu çok çeşitli beslenme şekilleriyle hem beslenme sırasında hem de temas yoluyla kirleticilere daha fazla maruz kalırlar (Büyükgüzel 2006). Bu nedenle, tarımsal verimi artırmak amacıyla kullanılan GA₃ ve diğer BGD'lerinin, biyolojik kontrol ajanlarını olumsuz yönde etkilemesine, doğal düşmanın zararlı böcekler üzerindeki baskınlığının azalmasına ve zararlı populasyonun giderek artmasına neden olabileceği düşünülmelidir.

Bitki gelişim düzenleyicilerinin tarımda oldukça yaygın kullanılması, bu bileşimlerin aynı zamanda böceklerin farklı biyolojik dönemlerinin gelişmesi üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığı konusunu gündeme getirmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda bitki gelişim düzenleyicilerinin, böcekler üzerinde toksik etki sonucu ölümlere (Honeyborne 1969; Önder ve ark. 1987), deformasyonlar ve ağırlık azalmasına (Carlisle 1969; Awad ve Taha 1976), besin almayı engelleme (Antifedant) (Tahori ve ark. 1965; Mansour ve Dimetry 1976), morfolojik ve eşeysel gelişmede yavaşlamaya (Van Emden 1969; Awad ve Taha 1976), kısırılık ve yumurta üretiminde azalmaya (Bhalla ve Robinson 1968; Honeyborne 1969; El-Ibrashy 1972; Awad ve Taha 1976; Scheurer ve Aschermann 1976; Prasad ve ark. 1977; Dreyer ve ark. 1984), diyapoza girmeyi engellemeye (Bariola ve ark. 1976) neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, BGD'lerin konak bitki dokularında ve besin içeriğinde değişiklikler oluşturarak bitki dayanıklılığının artırılmasında (Honeyborne 1969; Dreyer ve ark. 1984) ve insektisitlerin bitkiye penetrasyonunu artırması (Richter ve Cecada 1984) şeklinde etkilerinin de olduğu ifade edilmiştir.

GA₃'ün farklı böcek türlerinin üreme ve çoğalmaları üzerinde zararlı etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Visscher 1980; Kaur ve Rup 2000). Bu çalışmalarda GA₃'ün Lepidoptera ve Diptera takımlarına ait bazı türlerin yumurta bırakma davranışı üzerindeki etkilerinin böceklerin endokrin sistem ile ilgili olduğu özellikle de bir terpenoid bileşik olan GA₃'ün kimyasal yapısının juvenil hormon ile benzerlik göstermesine bağlı hormonal mekanizmayı etkilediği vurgulanmıştır. Uçkan ve ark. (2008)'lerinin yaptığı çalışmada, GA₃ uygulaması ile *Apantales galleriae*'nin F₂ döllerinin sayısında meydana gelen azalmanın nedenleri, dişilerde embriyonik gelişimin zarar görmesi ya da oogenez veya

spermatogenez sırasında hatalı bir oluşumun meydana gelebileceği şeklinde yorumlanmıştır.

GA₃'ün ve bazı BGD'lerin konak besini ile alınması ile birlikte hem konak hem de parazitoit üzerindeki etkileri de son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Gibberellik asit ve indol-3-asetik asit (IAA)'in farklı dozlarının larval endoparazitoit olan *Apantales galleriae* üzerindeki biyolojik etkilerinin belirlendiği çalışmalarda, konak *Achroia grisella*'nın besinine farklı dozlarda verilen GA₃ ve IAA'nın, endoparazitoit *A. galleriae*'nin yumurtadan ergin oluşuncaya kadar geçen süre üzerinde yüksek konsantrasyonlarda etkili oldukları ve bu süreyi %40 daha fazla uzattıkları tespit edilmiştir (Uçkan ve ark. 2008; Uçkan ve ark. 2011). Buna benzer sonuçlar *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) ve *Bactocera cucurbitae* Coquillet (Diptera: Tephritidae) türleri üzerinde yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (Harikesh ve Bhattacharya 2003; Kaur ve Rup 2003a; 2003b). Ayrıca Uçkan ve ark. (2008), GA₃ uygulamasının anormal larval gelişimlerini arttırdığı ve bu durumun başarılı parazitlenme oranını da azaltabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmalarda, GA₃'ün sadece ergin öncesi büyüme ve gelişme sürelerinin uzunluğuna değil, aynı zamanda ergin evredeki yaşama süresi üzerine de etkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle yüksek konsantrasyonlardaki (50-1000 ppm) GA₃ parazitoitlerin her iki eşeyinde de toksik etki göstermiştir (Uçkan ve ark. 2008; Uçkan ve ark. Basılmadı). Daha önce yapılan bu çalışmalar GA₃'ün sadece fitofag özellikte olan konak böcek üzerinde değil konakla besinsel ilişkisi olan doğal düşman parazitoit böcekler üzerinde de gelişim ve büyüme oranı üzerinde de etkili olduğuna işaret etmektedir. Ancak, bu çalışmalarda böceklerin biyokimyasal faaliyetlerinin gerçekleşmesinde gerekli olan metabolitlerin depolandığı ve gerekli dokulara taşınmasını sağlayan hemolenfte meydana gelebilecek değişikliklerle ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır. Özellikle GA₃'ün hem konak hem de parazitoitin hemolenf protein profili, serbest aminoasit içeriği ve hemositleri üzerinde toksikolojik etkilerinin belirlenmesine ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır.

Tarımsal üretimi artırma durumundaki ülkeler BGD'lerin yanında bazı pestisit ve herbisitleri de yoğun olarak kullanmaktadır. Bu maddelerin yarılanma ömürleri oldukça uzun olup toprak, sebze ve meyveler üzerinde kalmakta ve besin

zinciri ile insana kadar ulaşmaktadır. Özellikle bitki büyüme hormonları canlı sistemden tamamen atılmayıp organlarda depolanmakta ve fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. Bu nedenle etkileri sadece canlı organizma üzerinde değil çevre kirliliğine de sebep olmaktadır (WHO 1984; Göze ve ark. 1995). Çevresel kirlenmeye neden olan bu kimyasal ve fiziksel faktörler genel olarak Arthropodlar'da fizyolojik strese neden olmaktadır. Böylece hücresel olarak moleküler düzeyde etkilere, doku seviyesinde organik değişikliklere ve sonuçta bireyleri etkileyerek popülasyon seviyesinde ölümlere neden olabilmektedirler (Sancho ve ark. 1998). Toksik maddeye maruz kalan canlılar maddeden uzaklaşmak, vücudundan atılımını sağlamak veya toksik maddenin neden olduğu zararları ve buna bağlı olarak ortaya çıkabilecek patolojik etkileri onarmak için doğrudan enerjisini kullanabilirler. Normal yaşamda kullanılmak üzere biriktirilen enerjinin bu şekilde kullanılarak harcanması ise daha sonra karşılaşılan diğer stres durumlarında ölüm olasılığını arttıracaktır (Ribeiro ve ark. 2001; Korsloot ve ark. 2004). Bu durum besinine yüksek dozlarda GA₃ verilmiş olan *Zaprionus paravittiger* Godbole (Diptera: Drosophilidae) ile yapılan bir çalışmada da gösterilmiştir. GA₃ uygulamasına bağlı olarak *Z. paravittiger* larvalarındaki glikojen içeriği önemli oranda azalmıştır (Rup ve ark. 1998). *Bactocera cucurbitae* ile yapılan bir çalışmada ise benzer dozlardaki GA₃'ün total lipit ve total karbohidrat seviyesinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Kaur ve Rup 2003a, 2003b). Uçkan ve Ergin (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, ergin parazitoit *A. galleria*'nın yaşam süresinin uzamasında karbohidratların gerekli olduğu belirtilmiştir. GA₃ miktarına bağlı olarak ergin dönem süresinin azalmasının nedenleri ise aynı araştırmacıların yaptıkları diğer bir çalışmada, konakta spesifik olmayan toksik bileşenin etkisinden dolayı besin kalitesinin azalması ve parazitoitin gerekli besini konaktan yetersiz oranda almasından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır (Uçkan ve ark. 2008). İnsektisitlerle ilgili yapılan çalışmalarda da, insektisitlerin böcekler üzerindeki toksik etkilerinin oksidatif strese neden oldukları gösterilmiştir. Bu çalışmalarda insektisit tarafından oluşturulan oksidatif stres koşullarında hemolenf ve yağ doku proteinlerinin kilit rol oynadığı da belirtilmiştir (Harper ve ark. 1979; İçen ve ark. 2005; Büyükgüzel 2006). Çeşitli zararlı ve yararlı böcek türleri üzerinde yapılan

bu çalışmalarda pestisit toksitesine bağlı olarak hemolenfdeki ve yağ dokudaki total protein miktarının azaldığı, serbest aminoasit konsantrasyonunun ve proteaz aktivitesinin ise arttığı belirlenmiştir (Nath ve ark. 1997; Sak ve ark. 2006). İnsektisite bağlı olarak dokulardaki protein katabolizmasının artması fizyolojik bir mekanizma olarak ortaya çıkmaktadır ve bu koşullarda onarım mekanizmaları önemli rol oynamaktadır. Total hemolenf proteinlerinin azalması ve serbest aminoasit miktarının artması ise onarım mekanizmalarında gerekli olan enerjinin sağlanması amacıyla krebs döngüsünde gerekli olan ara ürünler için aminoasitlerin keto asitlere dönüştürülmesinde kullanılmasından kaynaklanmaktadır (Rambabu ve Rao 1994; Sancho ve ark. 1998; Sak ve ark. 2006). Bunun yanında toksik bileşiklerin protein sentezini engellemesi de söz konusudur (Sancho ve ark. 1998). Pestisit çalışmaları sonucunda elde edilen tüm bu verilere rağmen, GA₃'ün de hemolenf proteinleri ve serbest aminoasitler üzerinde benzer değişikliklere neden olabileceği hakkında bir bilgi bulunmamaktadır.

Çeşitli BGD'lerin toksikolojik özellikleriyle ilgili çalışmalar daha çok memeliler üzerinde yapılmıştır. Çelik ve ark. (2002)'nin yapmış oldukları çalışmada bitki gelişim düzenleyicilerden absisik asit ve gibberellik asit ile 25 gün boyunca muamele edilen sıçanların çeşitli dokularında lipit peroksidasyonuna neden olarak antioksidan savunma sistemindeki enzimlerin [indirgenmiş glutatyon (GSH), glutatyon reduktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST) ve katalaz (CAT)] aktivitelerini değiştirdikleri belirlenmiştir. SOD değeri, GA₃ uygulanan sıçanların dalaklarında ve böbreklerinde anlamlı bir artış gösterirken, yardımcı enzim glutatyon reduktaz (GR) aktivitesinin böbrekte artmasına ve dalakta azalmasına neden olmuştur. Biyotransformasyon enzimi olan glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesi ise GA₃ uygulanan sıçanların kalbinde anlamlı bir şekilde azalmıştır (Çelik ve ark. 2002; Tuluçe ve Çelik 2006). İndol-3-asetik asitin sıçan karaciğer ve böbreğinde malondialdehit (MDA) seviyesini artırdığı, fare böbreğinde katalaz aktivitesini inhibe ettiği, SOD, glutatyon peroksidaz (GPx), heksokinaz (HK), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD), malat dehidrogenaz (MDH) ve laktat dehidrogenaz (LDH) enzimlerinin aktivitelerini değiştirmedeği belirtilmiştir (Çelik

ve ark. 2002; Yılmaz ve ark. 2004, Yılmaz ve Yüksel 2004). İndol-3-asetik asitin sıçan nötrofillerinde ve lenfositlerinde oksidatif stresin meydana gelmesini sağlayacak enzimlerin aktivitelerinin artışına ve nötrofillerin sayısında azalmaya neden olduğu diğer çalışmalarda gösterilmiştir (Çelik ve ark. 2002; Furukawa ve ark. 2004; Tuluçe ve Çelik 2006). İnsanlar için tehlikeli bir karsinojen olduğu gösterilen ve oksinler grubundan bir bitki gelişim düzenleyicisi olan 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ile yapılan çalışmalarda, bu maddenin çeşitli yumuşak doku sarkomaları ve malignant lenfoma gibi kanserlerle ilişkisi ortaya konulmuştur (Bloemen ve ark. 1993; Palavan 1993). 2,4-diklorofenoksiasetik asitin sıçan, kedi ve köpeklerde şartlı refleksleri ve beyin elektrofizyolojisini değiştirdiği (Elo ve ark. 1988), glikolat oksidaz aktivitesini düşürdüğü (Abdellatif 1990), fare 3T3 hücrelerinde doza bağlı olarak DNA sentezinin inhibe olduğu (Zhao ve Chou 1987), deneysel hayvanlarda ve insanlarda nörotoksik etkiye, öğrenmede azalmaya, hafıza kaybına, koordinasyonun azalmasına sebep olduğu rapor edilmiştir (Kim ve ark. 1994). GA_3 'ün kara kurbağası *Bufo regularis*'de hepatoselüler karsinoma'yı, farelerde akciğer adenokarsinomayı artırdığı ve insan lenfositlerinde kromozomal bozukluklara neden olduğu da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Zalinian ve ark. 1990; El-Mofty ve ark. 1994; Bakr ve ark. 1999).

Parazitoit ve konağın özellikleri, parazitoitin sadece ergin öncesi gelişim süresini değil ergin olduktan sonraki bazı fizyolojik aktivitelerini de etkilemektedir. Özellikle de holometabol türlerin ergin öncesi evrelerdeki besinsel ihtiyaçları fazlasıyla değiştiğinden, besin çeşidi ergin büyüklüğü ve eşeyssel verim gibi birçok fizyolojik aktivite üzerinde etkilidir (Hajek 2004). Parazitoitin ergin öncesi gelişiminde vücudunda depolanan besin miktarı ve besin kalitesi, konağının ona sağladığı besin ile yakından ilgilidir. Ergin parazitoitlerin bir çoğu yaşamlarını sürdürebilmek, üreyebilmek ve diğer bir çok biyolojik aktiviteyi gerçekleştirebilmek için karbohidrat, lipit ve proteine ayrıca belirli tuzlara ihtiyaç duyarlar. Bu ihtiyaçlarının bir kısmını çevredeki kaynaklardan karşılarken bir kısmını ergin öncesi evrede depoladıkları temel besin maddelerinden sağlamaktadır (Dahlman ve Vinson 1979; Yazgan 1981; Beckage 1993; Beckage ve Kanost 1993; Nakamatsu ve ark. 2002; Magrove Parra 2004; Nakamatsu ve Tanaka 2004).

Hymenopter endoparazitoit larvaları gelişimleri sırasında temel besin kaynaklarını konaklarından sağlarlarken, konakta bazı biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler ise konağın gelişim oranına, besin kullanımına ve başkalaşımına etki etmektedir (Dahlman ve Vinson 1979). Bu değişimlerde sadece parazitoit değil aynı zamanda konağın besini ile aldığı kimyasal bileşiklerde önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda bu değişimlerden parazitoitler de dolaylı olarak etkilenmektedir. Çünkü, konak türün larval beslenmesi sırasında alınan kimyasallar konak bünyesine alınmakta ve buradan parazitoite geçiş yapmaktadır. Endoparazitoit böcek tarafından giderek artan oranda konaktan alınan bu kimyasallar ise toksik etki göstererek birçok patolojik sorunlar meydana getirmektedir (Sak ve ark. 2006). Özellikle de bu bileşiklerden olan pestisitlerin böcek hemolenfinde meydana getirdiği toksikolojik değişikliklerle ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen (Ortel 1991; Cox 1996; Lee ve ark. 1996; Ahmad ve ark. 1997; Androw 1997; Nath ve ark. 1997; Özkan ve Emre 1997; Biddinger ve Hull 1999; Montagna ve ark. 1999; Özkan ve Yanıkoğlu 1999; Soderlund ve Knipple 1999; Suh ve ark. 2000; Tillman ve Mulrooney 2000; Takada ve ark. 2001; Usmani ve Knowles 2001; Ribeiro ve ark. 2003; Ahmad 2008; Liu ve ark. 2008), BGD'lerin etkisi ile ilgili bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Parazitoit türlerin yaşamını devam ettirebilmelerinde konakları ile olan besinsel ilişkiler ve bu stres koşulları önemli rol oynamaktadır. Çünkü ortaya çıkabilecek bu koşullar parazitoitin ergin döneme geçişinde zaman değişimlerine neden olabilir. Bu durum ise, ergin evrenin konak bulma açısından uygun olmayan bir zamanda ve uygun olmayan bir çevresel koşulda geçirilmesine neden olacaktır (Kaur ve Rup 2000; Uçkan ve ark. 2008).

Parazitoitlerin konak böcek içinde gelişimi, biyokimyasal ve hormonal etkileşimlerle ve konak bağışıklık sisteminin baskılanması gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Gupta ve Ferkovich 1998). Bağışıklığın baskılanması parazitoitlerin başarılı olarak gelişebilmelerine yardımcı olan kompleks mekanizmalarla düzenlenir (Lavine ve Beckage 1995). Parazitoit böcekler konaklarında var olan bağışıklık tepkilerinden korunmak için çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir (Vilmos ve Kurucz 1998; Richards ve Parkinson 2000; Schmidt 2001; Penacchio ve ark. 2003; Turnbull 2004). Bu stratejiler:

Enkapsülasyondan pasif olarak kaçınma ve

- ✓ fonksiyonel bağışıklık sisteminden yoksun konak evrelerinde ovipozisyon ve gelişme,
 - ✓ konak bağışıklık hücrelerinin ulaşamadığı bir yere ovipozisyon,
 - ✓ yabancı olarak tanımlanamayan yüzey faktörlerinin varlığı,
- Aktif olarak enkapsülasyonu önleme
- ✓ konak hemositlerinde apoptozisi tetikleme,
 - ✓ konak hemosit fonksiyonunun bozulması,

olarak iki grupta toplanabilir (Schmidt 2001; Penacchio ve ark., 2003). Bağışıklık tepkisi gösteremeyen konak yumurtalarına yumurta bırakan parazitoitler, bağışıklık sistemi olmayan konak evresine yumurta bırakma ve gelişme için iyi bir örnektir. Diğer yandan, konak vücudunun dışına ovipozisyonunu gerçekleştiren ve larvaları konak vücudunun dışında kalmak üzere beslenen ektoparazitoitler de konak bağışıklık hücre ve efektör molekülleri ile parazitoit oğul dölü arasındaki temasın engellendiği bir yerde üremeye örnek verilebilir. Parazitoitlerin büyük çoğunluğu ise konaklarının tam bir bağışıklık fonksiyonuna sahip olduğu larva döneminde konak içinde gelişimini sürdürür. Bazı endoparazitoitler dolaşımdaki hemosit enkapsülasyonundan korunmak için sinir gangliyonu gibi organlarda gelişimlerini sürdürürler ancak büyük çoğunluğu konak vücut boşluğunda gelişerek hemositlere maruz kalırlar (Schmidt 2001). Endoparazitoit yumurta ve larvaları genellikle konak tarafından yabancı olarak tanımlanmayan yüzey faktörlerine sahiptirler (Asgari ve Schmidt 1994; Vilmos ve Kurucz. 1998; Richards ve Edwards 1999a; Richards ve Edwards 1999b; Schmidt 2001; Lavine ve Strand 2002; Glatz 2004; Ribeiro ve Brehelin 2006).

Hemositlerin böceklerin bağışıklık sistemindeki birçok fonksiyonda rol oynaması, bunları çevresel faktörlere karşı diğer hücelere oranla daha duyarlı hale getirmekte ve hücrel oksidatif stresin ortaya çıkmasını hızlandırmaktadır. Bu durumda hücrelerde geri dönüşümsüz olarak hasarlar meydana gelebilir ve hücreler hızla Apoptotik veya Nekrotik mekanizmalarla ölüme sürüklenirler. BGD'ler gibi çevresel kirleticilerin neden olduğu bu değişiklikler morfolojik olarak gözlemlenebilmektedir. Bu değişiklikler hücre hacmindeki artış (hipertrofi), hücrelerin sayıca artması (hiperplazi), hücrelerin boyutundaki azalma

(atrofi), hücre çoğalmasının durması (aplazi), hücre sayısının azalması (hipoplazi) ve normal dışı hücre gelişimi (diplazi) şeklinde meydana gelebilir (Brown 2002). Farelerle yapılan bir çalışmada, BGD'lerinden İndol-3-asetik asidin hamilelerde deri altına uygulandığında, üçüncü nesil fare kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksi kontrol grubuna göre arttırdığı gözlenmiştir (Yılmaz ve Yüksel 2005). Sıçanlarla yapılan bir çalışmada ise deri altına enjeksiyon veya sonda ile besleme yoluyla yapılan İndol-3-asetik asit uygulamasının nötrofillerdeki fagositik kapasiteyi artırdığı belirlenmiştir (Pugine ve ark. 2007). Aynı BGD'nin insan fibroblast kültüründe DNA ve RNA miktarını arttırdığı, farelerde ise bazı dokulara ait hücrelerdeki apoptotik aktiviteyi artırarak sıçan fetüslerinde mikroensefaliye neden olduğu belirtilmiştir (Kowalska 1991; Furukawa 2004).

Böcek hemositleri ile ilgili çalışmaların çoğunda ise, açlık, enfeksiyon ve yaralanma gibi durumlarda hemosit miktarındaki değişiklikler (Lastra ve ark. 2001; Sewify ve Hashem 2001), mitoz bölünme, hemositlerin farklılaşması (Yamashita ve Iwabuchi 2001) gelişimin farklı evrelerinde mitoz bölünme geçiren hemosit sayıları (Jones ve Liu, 1968) ve hemosit fonksiyonları sırasında görülen apoptozis olayı araştırılmıştır (Pech ve Strand 2000; Le ve ark. 2003; Teramoto ve Tanaka 2004; Suzuki ve Tanaka, 2006). Hemositler, yabancı organizmalara veya toksik maddelere karşı bağışıklık tepkilerini ortaya koyarken programlanmış hücre ölümlerinin (apoptozis) görüldüğü (Pech ve Strand 2000; Le ve ark. 2003; Sung ve ark. 2003a ve 2003b), hemosit şekillerinde ve mitotik indekste farklılaşmalar olduğu (Gupta 1985; Teramoto ve Tanaka 2004) belirlenmiştir. Ancak, GA₃ gibi BGD'ye maruz kalmış zararlı ve yararlı böceklerin hemositlerinde sitolojik değişiklikler olup olmadığına ilişkin bir çalışma yoktur.

Çalışmamızda parazitoit tür olarak kullanılan *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) birçok lepidopter türünün prepup ve pupunda soliter, idiobiont ve endoparazitoit olarak gelişen bir türdür (Kansu ve Uğur 1984; Uçkan ve Gülel 1990). *P. turionellae* çok geniş bir konak aralığına sahiptir ve konak türlerinin çoğunluğu larval gelişimleri süresince çeşitli bitkiler üzerinden özellikle de meyve ağaçlarından beslenmektedirler. Bu nedenle *P. turionellae* erginlerinin hem meyve özleri üzerinden beslenmeleri hem de konaklarının yayılış özelliklerinden dolayı, erginleri meyve bahçelerinde yaygın olarak

bulunmaktadırlar. Bu parazitoitin konaklarından biri olan ve çalışmamızda konak tür olarak kullanılan büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella* ise larval dönemde arı kovanlarında ekonomik açıdan önemli zararlara yol açan zararlı bir kelebek türüdür. Larvaları hem kovanlardaki peteklerden ve baldan beslenmektedirler hem de peteğin orta taban kısmında tüneller açarak yıkıntı ve döküntüler meydana getirerek zararlı olurlar (Öder 1983). Hem konak hem de parazitoit türler beslenmeleri sırasında birçok çevresel kirleticilere de maruz kalmaktadırlar. Aynı zamanda bu kirleticiler hem *P. turionellae* larvalarının konaktan beslenmesi sırasında parazitoite geçiş yapmakta hem de parazitoit erginleri meyve özleri üzerinden beslenirken direkt olarak besinle birlikte alınmaktadırlar (Sak ve ark. 2006; Ergin ve ark. 2007). Bu bilgilerden yola çıkılarak çalışmada, değerli bir tarımsal araç olan, özellikle de meyve yetiştiriciliğinde önemli yeri olan gibberellik asit (GA_3)'in hem konak *G. mellonella* hem de parazitoit *P. turionellae* üzerindeki fizyolojik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu etkilerin bilinmesi ise hem biyolojik kontrol programların başarısı hakkında hemde ekosisteme yoğun olarak giriş yapan bu kimyasalların toksikolojik etkilerinin olup olmadığı hakkında önemli bir kaynak olacaktır. Ayrıca bir model olarak böcek bağışıklık sisteminin çalışılması, omurgasız ve omurgalı hayvanlar için ortak olan bağışıklık tepkilerinin evriminin ortaya konması ile ilgili çalışmalara da yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

Elde edilen verilerin böcek biyokimyası, fizyolojisi, gelişim biyolojisi, biyolojik kontrol ve ekolojik denge ile ilgili çalışmalara da ışık tutacağı düşünülmektedir. Bunun yanında çalışmamızın sonuçları ile en az böcekler kadar doğrudan ve dolaylı olarak GA_3 'e maruz kalan hayvan ve insanların sağlığı üzerinde yapabileceği etkiler hakkında da yorumlar yapılmasına olanak sağlayacaktır.

1.1. Bitki Gelişim Düzenleyicileri (BGD)

Doğal olarak bitkilerde sentezlenen, bitkide büyüme, gelişme ve fizyolojik faaliyetleri kontrol eden ve oluştukları yerden bitkinin başka yerlerine taşınabilen, çok az miktarda bile etkilerini gösterebilen organik maddelere Bitkisel

Hormonlar" adı verilir (Bidwell 1974; Dobrev ve ark. 2005). "Bitki Büyüme Düzenleyicileri" ya da "Büyüme Düzenleyici Maddeler" terimleri ise doğal bitki hormonlarının yanı sıra, son yıllarda sayıları giderek artan ve sentetik olarak elde edilebilen, bitki büyüme ve gelişmesi üzerine etkili diğer kimyasal maddeleri de kapsamına almaktadır. Yani her "Bitki Hormonu" bir "Büyüme Düzenleyici Madde" olduğu halde, her "Büyüme Düzenleyici Madde" bitki hormonu değildir (Ünal 1998). Bu nedenle ister sentetik olsun isterse doğal olarak sentezlensin bu maddeler bitkilerde büyüme ve gelişme olaylarını düzenlemeleri nedeniyle **büyüme regülatörleri** veya **büyüme düzenleyici maddeler** olarak da isimlendirilmektedirler (Kadıoğlu 2004). Tanımlarından anlaşıldığı gibi BGD'lerin bazıları bitkilerde gelişmeyi teşvik ederken bazıları ise engelleyici etki gösterirler (Bidwell 1974; Ünyayar 2000). Bitkideki büyüme ve gelişimi uyaran veya hızlandıranlara stimülatör (teşvik edici), yavaşlatan veya durduranlara ise retardan (inhibitör ya da engelleyici) denilmektedir. Bitki gelişim düzenleyicileri bu özelliklerinden dolayı tarımda, tohumların çimlendirilmesinden doku kültürüne kadar birçok alanda kullanılmaktadır.

Bitki gelişimini düzenleyiciler, etki ve kimyasal yapılarına göre

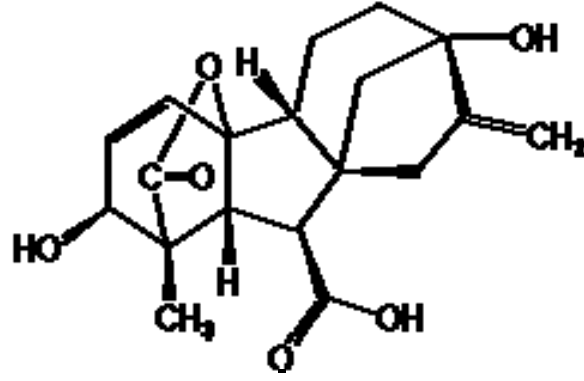
1. Büyüme hormonları
 - a. Stimülatörler (Uyarıcılar),
 - ✓ Oksinler
 - ✓ Gibberellinler
 - ✓ Sitokininler
 - b. İnhibitörler (Engelleyiciler),
 - ✓ Absisik asit
 - ✓ Etilen
2. Organ yapıcı Hormonlar,
 - ✓ Florigen
 - ✓ Vernalin
 - ✓ Rizokalin
3. Yara hormonları
 - ✓ Trauma
 - ✓ Nekro

şeklinde sınıflandırılabilir (Bidwell 1974; Sun ve Gubler 2004; Campbell ve Reece 2008).

Bitki büyüme hormonlarının fizyolojik etkileri, konsantrasyonlarına, çevresel faktörlere, bitki türlerine ve bitkinin yaşına bağlı olarak değişmektedir. Başlıca fizyolojik etkileri; hücre bölünmesi, hücre uzaması ve genişlemesi, morfogenez, tohum ve tomurcuk dormansisi, embriyo gelişimi ve tohum çimlenmesi, çiçeklenme, büyüme, meyve oluşumu, gelişimi ve olgunlaşması, partenokarpik meyve oluşumu, apikal dormansi, senesens, kloroplast gelişimi ve klorofil sentezi, nükleik asit ve protein sentezi, enzim sentezi ve aktivasyonu, tuber oluşumu, kök oluşumu, kambiyal aktivite, absisyon, strese adaptasyon mekanizması ve osmoregülasyon olarak sıralanabilir (Kim 1992; Hiroyasu 1997; Sun ve Gubler 2004). Başlangıçta yalnız tohumların çimlenmesinde, meyve, fidan ve çeliklerin köklendirilmesinde kullanılan BGD'ler, daha sonraları tohumdan hasada, hatta tüketime ve pazara sunuluncaya kadar geçen her devrede çok değişik amaçlar doğrultusunda tüm dünya ülkelerinde geniş çaplı kullanılmaktadır.

1.1.1. Gibberellik asit (GA₃)

BGD'lerin en geniş gruplarından birisi olan gibberellinler bitkilerin birçok büyüme ve gelişme mekanizmalarında rol oynayan tetrasiklikditerpenoid yapısındaki yaklaşık 346 Da moleküler ağırlığındaki bitkisel hormonlardır. Şekil 1.1'de görüldüğü gibi giberellinler, 19 veya 20 karbonlu Giberellan iskeletine sahiptir ve çok sayıda karboksil grupları ile farklı sayı ve konumlarda hidroksil grupları içermektedir. Gibberellinler vejetatif ve reproduktif evrede bitkilere uygulanırsa teşvik edici etki gösterdiklerinden dolayı ticari değere sahiptirler (Carlsol ve Crovetti 1988).



Şekil 1.1. Gibberellik asit ($C_{19}H_{22}O_6$) (Kacar ve ark. 2002'den).

Yabuta (1935), Gibberellinleri, *Gibberella fujikori* denilen fungustan ilk defa izole etmiş ve GA şeklinde isimlendirmiştir. Özellikle bu madde çeltik köklerine verildiği zaman çok hızlı bir büyümeye neden olmaktadır. 1954–1955 yıllarında birçok Amerikan bilim adamı A'dan G'ye kadar değişik GA formları keşfetmiş Japon bilim adamları ise her bir gibberellin tipinin (örneğin A ve B gibi) değişik türlerinin olduğunu bulmuş GA_1 , GA_2 , GA_3 gibi isimlendirme yapmışlardır. 1957'de Takahashi GA_4 'ü bulmuştur. Gibberellinlerin büyüme ve gelişmeyi arttırıcı etkisinin saptanması, ilk defa Japonya'da rastlanan ve normal bitkilere göre daha ince uzun boyları ile dikkati çeken çeltik fidelerindeki "Bakanae Hastalığı"nın nedenleri ve denetimi üzerindeki çalışmalar ile başlamıştır (Güven 1988; Vardar ve Güven 1996). Günümüzde ise 200'ün üzerinde GA bilinmektedir. Aktif büyüme döneminde su ile parçalanarak birçok gibberellin türleri çok hızlı etkili olurlar. Bazı kimyasallar inaktif bağlar oluşturarak gibberellinlerin ortaya çıkmasını yavaşlatırlar. İnaktif bağlar floem ve ksileme taşınma veya depolama sırasında yeni hazırlanan dokulara ve yeni oluşan dokulara etkilidir.

Gibberellinler GA_3 , GA_4 , GA_7 karışımı ve potasyum gibberellat formlarında ticari olarak kullanılmaktadırlar (EPA 1995). Çalışmamızda kullanılan GA_3 ($C_{19}H_{22}O_6$) ise bir tetrasiklikditerpenoid asit olup, AsetilCo-A'dan sentezlenir ve bitkilerde birçok önemli fizyolojik işlevleri bulunmaktadır. Bu işlevler,

✓ Birçok otsu çok yıllık bitkilerin ve tanesiz hububatların uzayan gövdelerindeki genişleme ve hücre bölünmesi olaylarının başlatılması,

- ✓ Meyve büyümesi ve tohum çimlenmesinin uyarılması,
- ✓ Tohum dormansisinin kırılması, çiçeklenmek için uzun gün veya düşük sıcaklığa ihtiyaç duyan bitkilerin bu şartlara ihtiyaç duymadan çiçeklenmelerinin sağlanması,
- ✓ İlkbaharda ılıman bölge odunsu bitkilerinde dormansi kırılmasının uyarılması şeklinde özetlenebilir (Salisbury ve Ross 1992).

Gibberellinlerin çiçeklenme, hücre büyümesi, karbonhidrat metabolizması, α -amilaz aktivitesi ve parteneokarpi gibi biyolojik davranışlar üzerindeki etkileri de çeşitli tarımsal bitkilerde amaca uygun kullanım alanları bulmuştur (Weaver 1972; Luckwill 1981; Nowak ve Lawson 1984; Nickell 1985).

Ülkemizde hemen hemen en yaygın kullanılan BGD GA_3 'tür. Zira kirazdan üzüm, elmadan süs bitkilerine kadar geniş bir biçimde kullanım alanı bulmuştur. Birçok kültürde çeşitli amaçlarla kullanılmakta olan GA_3 'ün en önemli kullanım alanları ve amaçları şöyle verilmektedir (Kocaçalışkan 2005, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı 2011);

- ✓ Üzümde salkım gelişmesini ve tane iriliğini artırmak,
- ✓ Limonda meyve olgunluğunu geciktirmek,
- ✓ Marulda tohum hasadı yönünden çiçeklenmeyi teşvik,
- ✓ Patateste uyku dönemini kıırarak çimlenmeyi teşvik,
- ✓ Çeşitli süs bitkilerinde çiçek verimini ve kalitesini artırmak,
- ✓ Navel portakallarında ve altıntoplarda kabuk lekesini ve yaşlanmasını önlemek,
- ✓ Kerevizde gelişmeyi teşvik etmek,
- ✓ Kirazda daha iyi renk ve iri tane elde etmek, hasat süresini uzatmak,
- ✓ Enginarda hasat süresini uzatmak için olgunlaşmayı geciktirmek,
- ✓ Fasulye, bezelye, pamuk, çeltik, soya ve buğdayda çabuk çimlenmeyi teşvik,
- ✓ Şerbetçi otunda verimi yükseltmek,
- ✓ İtalyan erik çeşitlerinde iç kararmasını önlemek ve verimi artırmak,
- ✓ Mandarinlerde meyve tutumunu artırmaktır.

1.2. Hemositler

Böceklerde ve açık dolaşım sistemine sahip diğer hayvanlarda, omurgalılarda olduğu gibi kan ve lenfatik sıvıların ayrımı olmadığı için vücut sıvıları hemolenf olarak adlandırılmaktadır. Hemolenf dolaşımında yer alan hücreler de hemositler olarak isimlendirilmektedir (Rowley ve Ratcliffe 1981). Böceklerde, hemositler embriyonik gelişim sırasında baş veya dorsal mezodermden gelişirler (Rowley ve Ratcliffe 1981; Tepass ve ark. 1994). Mezodermal olarak türemiş hematopoietik organlarda var olan kök hücrelerin bölünmesi yoluyla ve/ veya dolaşımdaki hemositlerin bölünmeye devam etmesiyle böceklerde hemositler üretilmeye devam eder (Jones 1970; Rowley ve Ratcliffe 1981). Birçok böcek türünde hematopoietik organlar farklı vücut kısımlarında tespit edilmiştir (Rowley ve Ratcliffe 1981). Lepidoptera takımına ait türlerinin larvalarında protoraksik spiraküllerin yakınında yerleşim gösteren bir kapsül içinde bulunan hücrelerin hemosit oluşumuyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle Lepidopterler'de hemopoietik organın genellikle toraksta imajinal kanat diski ile beraber, bazı Dipterler'de ise abdomenin posterior segmentinde buldukları bildirilmiştir (Nation 2002).

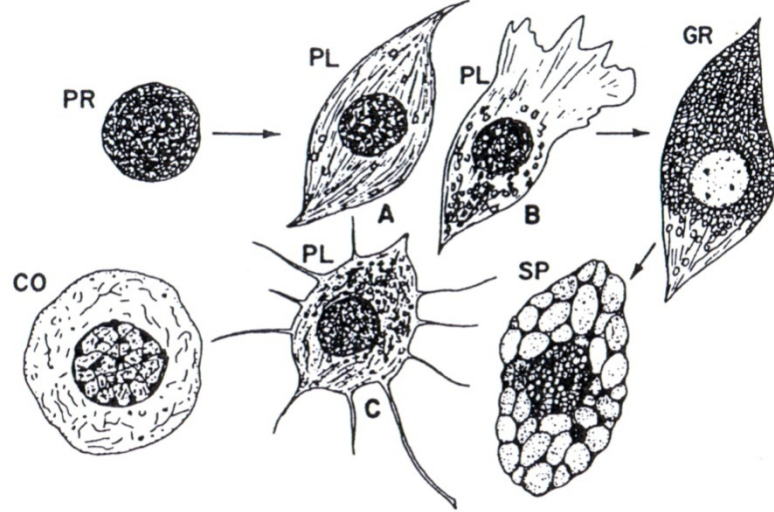
Günümüzde hemositlerin oluşumu ve farklılaşması hakkında farklı teoriler olsa da genel kanı;

- (1) prohemositlerin hematopoietik organlarda ilk olarak plazmatositlere farklılaştığı diğer hemosit tiplerinin ise dolaşıma salındıktan sonra farklılaştığı,
- (2) dolaşımdaki hemosit popülasyonlarının hücre farklılaşmalarından sonra devam eden hücre bölünmeleri ile sağlandığı şeklindedir (Lavine ve Strand 2002).

Galleria mellonella'da hematopoietik organın varlığına ait bir veriye literatürde rastlanmamıştır. Bununla beraber *G. mellonella*'da mitotik indeksin araştırıldığı bir çalışmada dolaşımdaki hemositlerin %1 oranında mitotik fazda olduğu ve bu oranın larval evre boyunca hücre sayılarını devam ettirmede yeterli olduğu belirlenerek bir hematopoietik organa ihtiyaç olmadığı belirtilmiştir (Jones ve Liu 1968). Morfolojik, histokimyasal ve fonksiyonel karakterlerine göre,

Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattaria, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Collembola gibi çeşitli takımlarda tanımlanan en genel hemosit tipleri genel olarak;

- prohemositler,
- plazmatositler,
- granüler hücreler (granülositler),
- siferul hücreler (spherulocyte)
- oenositoidler olarak sınıflandırılmaktadır (Gupta 1985; Schmidt ve ark. 2001; Vilmos ve Kurucz. 1998; Lavine ve Strand 2002; Silva ve ark. 2002; Glatz ve ark. 2004; Turnbull ve ark. 2004).



Şekil 1.2. Böcek hemolenfindeki hemositlerin genel görünimleri. PR: Prohemosit, PL: Plazmatosit, GR: Granülosit, SP: Siferülosit, O: Oenositoid (Nation 2002'den).

Hemolenfte düzgün şekilli, en küçük hemositler prohemositlerdir. Çalışılan tüm Lepidoptera türlerinde rastlanmıştır ve bunlar farklı hemosit tiplerinin öncüleri olduğu düşünüldüğü için prohemositler olarak isimlendirilmiştir. Ancak prohemosit tanımı sitolojik özelliklerine bakılarak verilmiştir ve bu hipotezin doğruluğu için daha çok çalışma yapılmalıdır (Ribeiro ve Brehelin 2006). Prohemositler tipik olarak yuvarlak veya oval şekilli olabilen oldukça küçük (4-10 µm genişliğinde ve 4-14 µm uzunluğunda) ve oransal olarak büyük çekirdekli hücrelerdir (Gupta 1985; Brehelin ve Zachary 1986; Chapman 1998; Silva ve ark.

2002; Giulianini ve ark. 2003). Ribozom ve mitokondri içerirler ancak endoplazmik retikulum ve golgi organelleri çok azdır. (Rowley ve Ratcliffe 1981; Levin 2007). Sentioller ve mikrotübüller içerdikleri için bu hemositlerin aktif mitotik hücreler olduğu belirtilmekte ve prohemositlerin diğer hemosit tiplerinin öncüleri olduğu savunulmaktadır (Rowley ve Ratcliffe 1981; Gupta 1985; Ribeiro ve Brehelin 2006; Levin 2007). Bu nedenle, temel fonksiyonları bölünmek ve yeni hemositler oluşturmaktır. Prohemositlerin dolaşımdaki oranları böceğin gelişim ve fizyolojik durumuna göre değişiklik gösterebilmektedir ancak bu oran genellikle % 5'i geçmez (Rowley ve Ratcliffe 1981; Gupta 1985).

Plazmatositler, küçük veya büyük polimorfik hücrelerdir. Lepidoptera'da uygun fiksasyondan sonra plazmatositler boyları 3 µm'den 40 µm'ye kadar ulaşabilen küresel veya oval hücreler olarak görülürler (Rowley ve Ratcliffe 1981; Gupta 1985; Chapman 1998; Silva ve ark. 2002; Lavine ve Strand 2002; Ribeiro ve Brehelin 2006). Transmisyon elektron mikroskopunda birkaç yalancı ayak, pinositotik veziküller, vakuoller ve poliribozomlar gözlenebilir. Golgi aparatı az gelişmiştir (Ribeiro ve Brehelin 2006). Birçok Lepidopter türünde plazmatositler granüllerden yoksundur (Ribeiro ve ark., 1996), ancak *Galleria mellonella*'da bu hücreler granül içerebilir (Ribeiro ve Brehelin 2006). Lizozomal enzimler içerirler ve genellikle dolaşım sıvısında en çok bulunan hemositlerdir. Plazmatositler, fagosite edilemeyecek kadar büyük olan yabancı cisimlerin, bakteri topluluklarının veya nekrotik melanize olmuş materyallerin etrafında kapsüller ve nodüller oluşturabilirler (Lavine ve Strand 2002; Ribeiro ve Brehelin 2006). Plazmatositlerin fagositozdaki rolü henüz tam netliğe kavuşmamıştır, bazı araştırmacılar bu hücrelerin fagositozda rol oynadıklarını savunurken (Tojo 2000; Ling ve Yu 2006), bazıları bunların fagositik hücreler olmadıklarını savunmaktadırlar (Costa 2005).

Granüositler sferik ya da oval biçiminde, çekirdekleri küçük ve sitoplazmaları granüllüdür. Granüler hemositler Lepidopterlerde uygun fiksasyondan sonra çapları 4-45 µm arasında değişebilen küresel hücreler olarak görülebilirler. Transmisyon elektron mikroskopunda ise gelişmiş granüllü endoplazmik retikulumları, birçok pinositotik vezikülleri, ince ve uzun yalancı ayakları tespit edilmiştir (Ribeiro ve Brehelin 2006). Histokimyasal analizlere

göre granüller glikoprotein ve mukopolisakkarit yapısındadırlar. Granüler hemositlerin en önemli fonksiyonlarının fagositoz olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Ribeiro ve ark. 1996; Costa 2005). Granülositlerin aynı zamanda kapsül / nodül oluşumu sırasında yabancı cisimlerle ilk temas kuran ve granüler içeriğini dışarı veren hücreler olduğu tespit edilmiştir. Birçok araştırmacı, granülosit içeriğinin bu şekilde ekzositozunun plazmatositleri o bölgeye çekmekte iş gördüğünü (Ribeiro ve Brehelin 2006) veya en azından kapsül veya nodül oluşumu sırasında plazmatositlere yardımcı olacağını (Pech ve Strand 1996) düşünmektedir. Farklı böcek türlerinde granülositler toplam hemosit sayısının %30-60'ını ihtiva ederler ve plazmatositlerle birlikte birçok böcek türünde en fazla bulunan hemosit tipidir (Rowley ve Ratcliffe 1981; Chapman 1998).

Siferüositler, çapları 5-25 μm arasında değişebilen oval veya küresel hücrelerdir (Gupta 1985; Chapman 1998). Lepidopter siferül hücreleri az sayıda asit mukopolisakkaritlerle boyanabilen 1,5-3 μm çapında kürecikler (siferüller) içerirler (Rowley ve Ratcliffe 1981). Bu durum hücrelerin düzgün şekilli olmamasına yol açar. Dolaşımında görülme sıklıkları tüm hemosit populasyonu içinde %5'ten azdır (Rowley ve Ratcliffe 1981). Sitoplazma aynı zamanda ribozomlar, golgi, lizozomlar, mitokondri ve endoplazmik retikulum içermektedir (Levin 2007). Bazı araştırmacılar siferüositlerin ipek üretimi, melanizasyon, fagositoz ve pıhtılaşmanın düzenlenmesinde görev aldıklarını savunsalar da siferüositlerin bağışıklık sistemindeki fonksiyonları henüz netlik kazanmamıştır (Gupta 1985; Brehelin ve Zachary 1986; Chapman 1998).

Önositoidler çapları 54 μm 'yi bulan yuvarlak veya oval şekilli hemositler içindeki en büyük boyutlara sahip hücrelerdir (Rowley ve Ratcliffe 1981; Levin 2007). Binükleat olabilirler ve kolaylıkla lizis olabilirler. Ancak lizise uğradıklarında hemolenfin koagülasyonuna neden olmazlar. Fagositik özellikleri yoktur. Çekirdekleri merkezi değildir ve transmisyon elektron mikroskobu görüntülerine göre sitoplazmalarında birçok serbest ribozom içerirler ancak diğer tipik sitoplazmik organelleri az gelişmiştir (Ribeiro ve Brehelin 2006). Bazı önositoidler çubuk, iğne veya kristal şeklinde sitoplazmik inklüzyonlar içerebilirler. Örneğin *Drosophila*'da inklüzyonların şekli nedeniyle önositoidler kristal hücreler olarak adlandırılırlar (Gupta 1985; Tepass ve ark. 1994).

Önositoidler toplam hemosit popülasyonunun %1-2'sini oluştururlar (Rowley ve Ratcliffe 1981) ve Lepidopterlerde diğer hemosit tiplerine kıyasla en büyük hemositler oldukları belirtilmiştir (Gupta 1985; Chapman 1998). Birçok Lepidopter türünde hazırlanan preparatlarda önositoidler oldukça nazik ve in vitroda hemen lizise uğrayan hücreler olarak göze çarpmaktadırlar (Strand ve Noda 1991; Kanost ve ark. 2004). Ancak *G. mellonella* önositoidlerinin daha dayanıklı hücreler oldukları bildirilmiştir (Rowley ve Ratcliffe 1981). Lepidopterlerde bağışıklık sisteminde ve yara iyileştirmede oldukça önemli rol oynayan hemolenfin koyulaşmasından (melanizasyon) sorumlu olan fenoloksidaz bu hemositlerde mevcuttur (Ashida ve ark. 1988; Ribeiro ve ark. 1996; Da Silveira ve ark. 2003; Kanost ve ark. 2004). Ashida ve ark. (1988) fenoloksidazın *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae)'de önositoidler içinde sentezlendiğini ve bu hücrelerin parçalanması sırasında plazmaya salındığını tespit etmişlerdir (Ashida ve ark. 1988).

G. mellonella hemosit tiplerinin belirlendiği bir çalışmada Ashhurst ve Richards (1964), temel hemosit tiplerinin prohemositler, plazmatositler, adipohemositler, siferül hücreler ve önositoidler olduğunu belirtmişlerdir. Jones (1967) ise, prohemositler ve plazmatositlerin ayrımı çok zor olduğu için her iki hücre grubunu tek bir kategoriye alarak plazmatositoid terimini kullanmıştır. Neuwirth (1973), *G. mellonella*'da daha önceki çalışmalarda yağ damlaları içerdiği için adipohemosit olarak adlandırılan hemosit tiplerinin aslında granüler hemositler olduğunu ve pup evresine yaklaştıkça bu yağ damlalarının genişleyerek sayılarının arttığını belirtmiştir.

1.2.1. Enkapsülasyon

Böceklerde doğal bağışıklık sistemi humoral bağışıklık ve hücresel bağışıklık olmak üzere iki kısma ayrılmıştır (Hirashima ve ark. 1990; Faulds 1991; Canyurt 1994; Godfray 1994; Androw ve ark. 1997; Uçkan ve Gülel 2002; Wharton 2003;). Humoral bağışıklık hemolenfin pıhtılaşması veya melanizasyonunu düzenleyen kompleks enzimatik olayları ve antimikrobiyal peptitlerin sentezini içermektedir (Canyurt 1994; Uçkan ve Gülel 2002). Hücresel bağışıklık tepkileri ise fagositoz, enkapsülasyon, nodül oluşumu ve koagülasyon

gibi savunma mekanizmalarını gerçekleştiren hemositler tarafından oluşturulur (Hirashima 1990; Faulds 1991; Canyurt 1994; Uçkan ve Gülel 2002; Wharton 2003). Bu hücrel savunma tepkilerinde rol alan hemositler plazmatositler ve granülosit olup önositoidler ise melanizasyonda görev alırlar (Levin 2007).

Hemosit aracılı enkapsülasyon böcek bağışıklık sisteminin en önemli unsurlarından biridir (Rowley ve Ratcliffle 1981; Gupta 1985; Schmidt ve ark. 2001; Richards ve Edwards 2002). Bu tepki yabancı patojenin kendinden olmayan olarak algılanması, bunun etrafında çok yoğun yassılaştırmış hemosit tabakalarının oluşması ve hemosit tabakalarında kısmi veya komple melanizasyon sonucu patojenin öldürülmesi şeklinde tarif edilmektedir (Rowley ve Ratcliffle 1981; Gupta 1985; Schmidt ve ark. 2001; Richards ve Edwards 2002). Enkapsülasyon tepkisi genellikle hemositler tarafından fagosite edilemeyecek kadar büyük olan partiküller için gerçekleştirilir (Rowley ve Ratcliffle 1981; Richards ve Edwards 2002). Enkapsülasyon hedefi biyotik organizmalar (Trematodlar, Nematodlar, parazitoitler, parazit ve parazitoit yumurta ve larvaları, mantarlar) olabildiği gibi dışarıdan enjekte edilen deneysel objelerde (sephadex boncukları, naylon boncuklar, pamuk lifleri) olabilmektedir (Rowley ve Ratcliffle 1981; Götz ve Boman 1985). Kapsül morfolojileri genellikle taksonlar arasında benzerlik gösterir bununla beraber kapsüllerin oluşum hızı, rol alan hemosit tipleri ve kapsüllerin melanize olup olmaması gibi durumlarda türler arasında varyasyonlar görülebilir (Schmidt ve ark. 2001). Yabancı organizma etrafında oluşturulmuş genel bir kapsül üç bölge içermektedir. En alt kapsül tabakası yaklaşık on hücre kalınlığında olup yassılaştırmamış ancak otoliz belirtileri gösteren granüler hücrelerden oluşmaktadır. Orta tabaka yaklaşık 20-40 hücre kalınlığında ve hücreler arası boşlukları elektron yoğunluğunda materyal ihtiva eden yassılaştırmış plazmatositlerden oluşmaktadır. En dış katman ise on tabaka kalınlığında granülositlerden oluşmaktadır (Gillespie ve ark. 1997; Chapman 1998). Bazı araştırmacılar enkapsülasyon tepkisine tek bir hemosit tipinin aracılık ettiğini, bazıları ise en az iki hemosit tipinin enkapsülasyonun gerçekleştirilebilmesi için gerekli olduğunu savunmaktadır (Canyurt 1994; Androw ve ark. 1997; Uçkan ve Gülel 2002). Örneğin *Pseudoplusia includens*'de kapsül oluşumu granülositlerin ilk olarak yabancı yüzeye tutunması ve ilk kapsül tabakasını oluşturması, ardından

plazmatositlerin birçok tabaka halinde granüositlere tutunması ile gerçekleşir (Lavine ve Strand 2002). Enkapsülasyonun tamamlanması oluşan kapsülün etrafının ince bir granüosit tabakası ile kaplanması ile sona erer (Strand ve Pech 1995; Pech ve Strand 1996; Schmidt ve ark. 2001; Luo ve Pang 2006). Sonuç olarak, kapsülün melanize olması bu prosese eşlik eder ve enkapsüle olan organizma çoğunlukla ölür (Schmidt ve ark. 2001; Lavine ve Strand 2002). Enkapsüle olmuş hedef organizmanın ölümünden sorumlu olan faktörler çok iyi bilinmemekle beraber (Schmidt ve ark. 2001), boğulma, melanizasyon esnasında gerçekleşen profenoloksidaz aktivasyonu yoluyla lokal olarak oluşan sitotoksik kinonlar ve semikinonlar, serbest radikaller ve antibakteriyel peptitlerin ölüm ajanları olarak fonksiyon gösterdikleri savunulmuştur (Nappi ve ark. 1995; Gillespie ve ark. 1997; Nappi ve ark. 2000; Lavine ve Strand 2002; Jiravanichpaisal ve ark. 2006).

1.2.2. Hemositlerde apoptozis ve nekrozis mekanizmaları

Hemositlerde yabancı organizmalara veya toksik maddelere karşı bağışıklık tepkilerini ortaya koyarken programlanmış hücre ölümlerinin (apoptozis) ya da nekrozun meydana geldiği (Pech ve Strand 2000; Le ve ark. 2003), hemosit şekillerinde ve mitotik indekste farklılaşmalar olduğu belirlenmiştir (Gupta 1985; Teramoto ve Tanaka 2004). Apoptozis hücrenin içsel intihar mekanizmasıdır. Ancak, apoptoz sırasında hücre içeriği dış ortama bırakılmaz ve genel olarak çevredeki hücreler etkilenmez (Aldırmaz 2004; Halliwell ve Gutteridge 2007). Apoptoz'a giden hücrede büzülme, sitoplazmada balonlaşma ve sitoplazmik içerikte büzülme gözlenir. Çekirdek zarının çevresinde heterokromatin birikimler, kromatinde yoğunlaşma ve DNA'nın parçalanması meydana gelir (Pech ve Strand 2000; Terahara ve ark. 2003). Son olarak, hücre küçük fragmentlere ayrılarak apoptotik cisimcikleri oluşturur (Haschek ve Rousseaux 1998).

Apoptozis geçiren hemositlerin morfolojisinde de tipik olarak küçülme, hücre zarında kabarcıklaşma, kromatinde yoğunlaşma ve DNA'nın parçalanması dikkat çekmektedir (Pech ve Strand 2000; Terahara ve ark. 2003). Hücre ölümü, özellikle konak – parazitoit ilişkisi içinde genel bir özelliktir ve apoptozis ve/veya onkozis parazitoit larvasının konak içinde başarılı bir şekilde gelişebilmesi için

konak uygunluğunun (ör: gelişimin durması, konak bağışıklık sisteminin baskılanması, konak metabolizmasının indirgenmesi veya yeniden düzenlenmesi, konak lipitlerinin larval beslenme için salınması) düzenlenmesinde oldukça önemli görünmektedir (Rivers ve ark. 2007).

Nekrotik hücre ölümü sırasında organellerde şişme, mitokondri, peroksizom ve lizozom membranlarının yapısal bütünlüğünde bozulma meydana gelir. Sonunda hücre zarında meydana gelen parçalanma ile birlikte çeşitli enzimleri ve pro-oksidanları bulunduran hücre içeriği dağılarak komşu hücreleri etkilemektedir. Ribozomların kaybına bağlı olarak bazofilik özellik azalır. Sitoplazmadaki vakuollerde artış ve mitokondrilerde şişme gözlenir (Kumar ve ark. 2003; Halliwell ve Gutteridge 2007).

Hücre apoptozuna ve nekrozuna özgü özelliklerin belirlenebilmesi için floresans mikroskopisi yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel olarak, apoptotik indeksin belirlenmesinde hücre DNA'sını boyayan Acridine Orange (AO) ve sadece membran bütünlüğü bozulmuş geç apoptotik veya nekrotik hücreleri boyayan Ethidium Bromide (EB) boyaları kullanılmaktadır. Bu boyalarla çift boyama tekniği kullanılarak hazırlanan preparatlar ise floresans mikroskopunda incelenmektedir. Acridine orange'ın canlı ve ölü hücrelerin içerisine girip çift zincirli DNA'ya bağlanması yeşil floresans, tek zincirli RNA'ya bağlanması ve lizozomlarda birikmesi sonucu kırmızı veya turuncu floresans yayılmaktadır (Kosmider ve ark. 2004). Ethidium bromide ise membran bütünlüğü bozulmuş hücrelere girerek DNA'ya bağlanıp kırmızı floresans yaymaktadır (apoptozisin geç evresi ve nekroz). Bu çift boyama tekniği ile 4 hücre grubu tespit edilebilmektedir;

- Canlı hücreler (Yeşil nükleus, stoplazma turuncu veya kırmızı görünebilir)
- Erken apoptozis (Hücre membran bütünlüğü bozulmamıştır ancak kromatin yoğunlaşması ve fragmentasyonu vardır, nükleus parlak yeşil görünür)
- Geç apoptozis (sekonder nekroz veya apoptotik nekroz da denmektedir. Ethidium Bromide membran bütünlüğü bozulmuş hücrelere girerek nükleusu turuncu renge boyamaktadır. Kromatin yoğunlaşması ve fragmentasyonu vardır).

- Nekroz (Şekil olarak normal olan turuncu nükleus gözlenir) (Cendoroglo ve ark. 1999; Kosmider ve ark. 2004; Uçkan ve ark. 2010).

1.3. Hemolenf Proteinleri ve Serbest Aminoasitler

Böceklerde dolaşım sıvısı “hemolenf” olarak adlandırılmaktadır. Böcek hemolenfi genellikle renksiz veya bazı pigmentlerden dolayı çok az yeşil veya sarı renkli bir sıvıdır (Romoser 1994). Böcek türüne göre vücut ağırlığının yaklaşık olarak %5-40’ını oluşturmaktadır. Böceklerde metamorfoz süresince metabolitlerin gerekli yerlere taşınması ve depolanmasında hemolenfin çok önemli görevleri vardır (Gupta 1985; Romoser 1994).

Böceklerin hemolenfi gelişimsel, fizyolojik ve immunolojik faaliyetlerde önemli rolleri olan çok sayıda protein içermektedir. Özellikle de bazı proteinler hemolenfin fonksiyonları üzerinde oldukça etkilidirler (Lee ve ark. 2000; Park ve ark. 2005). Hemolenfteki protein miktarı, gelişme sırasında, özellikle de metamorfozdan önce ya da metamorfoz sırasında büyük değişimler gösterir (Orth ve ark. 2003).

Böcek hemolenfi çeşitli proteinler içermektedir. Bunlar vitellogenler, depo proteinleri, enzimler, hormonlar ve konağın humoral savunma reaksiyonları ile ilgili proteinlerdir (Riddiford ve Law 1983). Haunerland (1996), böceklerde protein granüllerinin pup evresinde yağ dokuda depo edildiğini belirtmiştir. İlk kez larvanın yağ dokusunda sentezlenen bu proteinler, özellikle son larval evrenin beslenme fazı boyunca hemolenfte bol miktarda bulunmuştur. Holometabol böceklerin gelişim dönemlerinde larval evrenin plazma proteinleri, başkalaşımın devam edebilmesi için oldukça önemlidir. Hemolenf proteinlerinin büyük bir bölümü özellikle de depo proteinleri, böceğin larval gelişimi sırasında yağ doku tarafından sentezlenirler ve hemolenfe salınırlar. Böceğin gelişiminin devam etmesi ile birlikte, bu proteinler pupal dönemde yağ doku içerisinde protein granülleri şeklinde çökerler. Daha sonra da ergin gelişiminde gerekli olan amino asit kaynaklarını sağlayabilmek için proteolitik olarak amino asitlerine parçalanırlar (Riddiford ve Law 1983; Levenbook 1985; Haunerland 1996). Hemolenf proteinlerinin içinde çok farklı enzimlerde bulunmaktadır. Bunlar

arasında literatürlerde belirlenmiş lizozim, antibakteriyel, antifungal ve taşıyıcı proteinlerdir. Ayrıca bir diğer hemolenf enzimi ise fenoloksidazdır. Bu enzim kutikulanın sertleşmesinde ve böceğin yabancı ajanlara karşı korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Riddiford ve Law 1983; Nation 2002).

Böceklerde enfeksiyona karşı geliştirilen humoral reaksiyonlarda da antimikrobiyal peptitler sentezlenmektedir (Marmoras ve ark. 1996; Vilmos ve Kurucz 1998; Schmidt ve ark. 2001; Lavine ve Strand 2002). Bu sitotoksik moleküller temel olarak yağ dokuda sentezlenmektedir (Vilmos ve Kurucz 1998), ancak yapılan çalışmalarda epidermis hücrelerinde (Brey ve ark. 1993; Lee ve Brey 1995), orta bağırsakta (Dunn ve ark. 1994; Russel ve Dunn 1996), tükrük bezlerinde (Kylsten ve ark. 1992), üreme sisteminde (Samakovlis ve ark. 1991; Rosetto ve ark. 1996) ve hemositlerde (Gillespie ve ark. 1997) sentezlendikleri gösterilmiştir. Son yıllarda böceklerde antimikrobiyal peptitlerin sentezi ile ilgili çalışmalar arttıkça moleküler ağırlıkları 5 kDa'dan küçük 170'den fazla sitotoksik peptit ve protein bulunmuştur (Levin 2007). Bu peptitler yapısal olarak farklılık gösterebilir de tümü amfipatik özelliktedir ve membranlar üzerinde etkili olarak hedef hücrenin lizis ile ölmesine neden olurlar (Cociancich ve ark. 1993; Lockey ve Ourth 1996). Böcekler enfeksiyona karşı bu antibakteriyel peptitlerin bir kombinasyonunu sentezleyerek bakteri kılıfının farklı bileşenleri üzerinde etkili olurlar (Morishima ve ark. 1995). Antimikrobiyal proteinler yapısal ve dizilim özelliklerinin benzerliklerine göre ve bakteri hücre duvarındaki hedef bölgelerine göre sınıflandırılmaktadırlar (Vilmos ve Kurucz 1998). Böceklerin fizyolojik olarak oluşturduğu en iyi bilinen antibakteriyel proteinler attasinler, lizozimler, sekropinler, defensinler ve dipterisinlerdir (Boman ve ark. 1991). Bu antibakteriyel peptitler enfeksiyonu takiben 2 saat sonra ortaya çıkarlar ve 24 saat içerisinde en üst seviyeye ulaşırlar. Bazı böceklerde aktiviteleri dört gün gibi kısa süreli olmakla beraber diğerlerinde aktiviteleri aylarca sürebilir (Marmaras ve ark. 1996).

G. mellonella'nın hemolenf proteinleri üzerine yapılan bir çalışmada, depo proteinleri, arilforin, lipoforin, juvenil hormon bağlayıcı proteinler ve diapozla ilişkili proteinler gibi birçok hemolenf proteinlerinin böceklerin yağ dokuları tarafından sentezlenmekte ve hemolenfe serbest bırakılmalarının yanında bazı

proteinlerinde epidermis tarafından sentezlendiği ve hemolenfe salındığı üzerinde durulmuştur. Bu nedenle aynı çalışmada *G. mellonella*'nın larval hemolenfde 47 kDa moleküler ağırlığında epidermis orjinli hemolenf proteini (EOHP) belirlenmiş ve bu protein izole edilmiştir. Bu proteinin amino asit içeriğinin aspartik asit ve glutamik asitçe zengin fakat tirozin, methionin ve triptofanca fakir olduğu belirtilerek, larval dönemler süresince proteinin hemolenfteki konsantrasyonunun yüksek iken, pupal ve ergin dönemlerde azaldığı gösterilmiştir (Lee ve ark. 2000).

Hemolenfin önemli özelliklerinden birisi diğer hayvanların vücut sıvılarına oranla çok yüksek miktarda serbest aminoasit içermesidir. Bu aminoasitler hemolenfin ozmotik değerlerinin sağlanmasında ve hemolenfin hem anyonik hemde katyonik özelliklerinin oluşmasında önemli rol oynamaktadırlar (Florkin ve Jeuniaux 1974). Aminoasitlerin hemolenf içinde bu kadar yüksek miktarda olmasının tam bir fizyolojik açıklaması olmamasına rağmen, yağ doku hücrelerindeki protein sentezi için kaynak olabilirler. Böcekler için esansiyel aminoasitler genel olarak L-formundaki arjinin, histidin, izolösin, lösin, lizin, metionin, fenilalanin, triptofan, treonin ve valindir (Nation 2002). Hanzal ve Jegorov (1991)'un yaptığı çalışmada *G. mellonella*'nın larval hemolenfde esas olarak glutamik asit, serin, asparajin, glutamin, treonin, glisin, histidin, alanin, arjinin, gamaaminobütirik asit (GABA), valin, fenilalanin, lösin ve lizin belirlenmiştir. Bu aminoasitlerden hemolenfteki konsantrasyonu en yüksek seviyede olanların Glutamin ve Alanin olduğunu bildirmişlerdir.

1.4. *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Büyük Balmumu Güvesi)

Bu çalışmada konak tür olarak kullanılan büyük bal mumu güvesi *G. mellonella* larval dönemde zararlı olan bir kelebek türüdür. Arı bulunan her yerde yaşarlar ve dişileri yumurta bırakmak için akşam karanlığında arı kovanlarına girerler. Kovan içinde yumurtadan çıkan larvalar bal peteklerine büyük oranda zarar verirler. Larvalar peteğin orta taban kısmında tüneller açarak yıkıntı ve döküntüler meydana getirmek sureti ile zararlı olurlar (Öder, 1983). Bu tür, tipik birçok fizyolojik ve anatomik özellik göstermeleri, aynı zamanda çoğalma yeteneklerinin fazla olmasından dolayı da araştırmalarda deney hayvanı olarak

tercih edilmektedir. Larval dönemleri böceklerin hem hücrel hem de humoral savunma mekanizmalarında uygun model oluşturmaktadırlar.

Erginleri çalılık arazide yaşamlarını sürdürürler. Erginlerin boyutları yaklaşık olarak kanatlar kapalıyken 12-18 mm iken, kanatlar açıkken 20-25 mm uzunluğundadırlar. Ön kanatları çoğunlukla grimsi renkte ve kırmızımsı kahverengi tonlarda desenler vardır. Genellikle akşamüstü saatlerde ergin dişiler kovanlara girerek bal arılarının ulaşamayacakları yarık ve deliklere yumurta bırakırlar. Yumurtalar pembemsi krem veya beyazımtırak renkte olup boyu eninden biraz uzun, 0.5 mm'den biraz küçüktür. Normal koşullarda (24–26 °C) bu yumurtalardan yaklaşık 5-10 gün içinde larvalar çıkar. *G. mellonella* larvaları yumurtadan yeni çıktıklarında sarımtırak beyaz renkte ve oldukça hareketlidir. Gelişmesini tamamlayan larva beyazımtırak kül renginde ve dorsal yüzeyi daha çok sarımtırak siyah renktedir. Larvalar polen, bal mumu, bal arısı larval gömlekleri ve bal arısı atıkları ile beslenirler. Beslendikleri besinin miktarına ve kalitesine göre boyutları 21.7-31.7 mm arasında değişmektedir. Larvalarda 3 çift ön üye ve bir takım yalancı abdominal üye vardır. Sıcaklık ve besin varlığına bağlı olarak larval gelişim 1-5 ay arasında gerçekleşmekte ve larvalar pup oluncaya kadar yedi kez gömlek değiştirirler (Şekil 1.3). Larval gelişimin arkasından pupal dönemleri başlar. Puplar öncelikle sarımsı veya açık kestane renginde olup pupal dönemin sonuna doğru koyulaşırlar (Şekil 1.3). Pupun dorsal yüzeyinde bariz bir orta çizgi vardır. Bu çizgi ergin çıkışında yırtılır. Pupun ventral yüzeyinde kanat, anten, hortum ve çiftleşme organları farkedilir. Ayrıca V. ve VI. segmentler üzerinde yalancı abdomen üyeleri görülür. Pupal dönem sıcaklık ve neme bağlı olarak 8-14 gün devam etmektedir. Pupadan yeni çıkış yapan erginlerin kanatları henüz tam kurumamıştır ve bulunduğu ortamın ısısına bağlı olarak iki saat içinde kurur (Şekil 1.3). Erginler gündüzleri karanlık ve arı kovanının karanlık köşelerinde gizlenirken, geceleri aktiftirler. Pupadan çıkış yapan ergin dişi ve erkekler 24 saat içinde çiftleşirler. Dişiler çiftleştikten 4-10 gün sonra yumurtlamaya başlarlar. Bir dişi tek seferde paketler halinde 100 yumurta bırakabilirler ve hayatları süresince yaptıkları yumurta sayısı 300-600 arasında değişmektedir. Ergin dönemde beslenmeyen bireyler yaklaşık olarak 3-

30 gün yaşarlar ve çiftleşen dişiler yumurtalarını bıraktıktan sonraki 7 gün içinde ölürlür (Özer 1961).

1.4.1 Sistematikteki yeri

Alem: Animalia

Şube: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: Lepidoptera

Üstfamilya: Pyraloidea

Familya: Pyralidae

Altfamilya: Galleriinae

Cins: *Galleria* Fabricius, 1798

Tür: *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)



Şekil 1.3. Konak *Galleria mellonella* larva, pup ve ergin bireyi.

1.5. *Pimpla turionellae* Linnaeus, 1758

Çalışmamızda parazitoit tür olarak kullanılan *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) birçok lepidopter türünün prepup ve pupunda soliter, idiobiont ve endoparazitoit olarak gelişen bir türdür (Kansu ve Uğur 1984; Uçkan ve Gülel 1990). *P. turionellae* çok geniş bir konak aralığına sahiptir. Konakları arasında *Lymantria dispar* (Lep: Lymantridae), *Peris rapae* (Lep: Pieridae), *Agrotis segetum* (Lep: Noctuidae), *Euproctis chrysorrhoea* (Lep: Lymantridae), *Malacosoma neustria* (Lep: Lasiocampidae), *Cydia pomonella* (Lep: Olethreutidae), *Yponomeuta malinellus* (Lep: Yponomeutidae), *Ephestia kuehniella* (Lep: Pyralidae), *E. cautella* (Lep: Pyralidae) ve *Galleria mellonella*

(Lep: Pyralidae) türü vardır (Kansu ve Uğur 1984). Bu konak türlerin çoğunluğu larval gelişimleri süresince çeşitli bitkiler üzerinden özellikle de meyve ağaçlarından beslenen zararlı kelebeklerdir. *P. turionellae* yüksek derecede bir pup parazitoiti olup, çok sayıdaki Lepidoptera takımına ait türlerin pupal dönemini parazitlemektedir (Kansu ve Uğur 1984; Uçkan ve Gülel 1990). Parazitoitin yumurtalarından çıkan larvalar konakları olan pupların dokularından ve vücut sıvılarından beslenerek larval gelişimlerini devam ettirirler. Kış dönemini olgun larvalar olarak pupların içinde geçirirler. Ergin dişilerin yumurta bırakacak döneme ulaşmaları yaklaşık 3-6 gün sürerken, dişiler yaklaşık 50 gün süreyle yumurta koyabilirler. Ergin dişiler çoğunlukla konak büyüklüğüne göre yumurtalarını bırakırlar ve konaktan çıkan erginin cinsiyeti de konak büyüklüğü ile ilişkilidir. Yumurta ve ergin dönem arasındaki gelişim süresi de konağa bağlı olarak değişiklik göstermektedir. *G. mellonella*'nın pupalarında gelişme süresi dişiler için ortalama 17-19 gün iken, erkeklerde 16-18 gün arasındadır. *P. turionellae* erginleri hem meyve özleri, bal ve nektarla beslenirler hemde dişiler konaklarına yumurta bıraktıktan sonra ovipozitörle deldikleri bölgeden dışarı sızan hemolenften beslenirler. Erginlerin büyüklükleri 4.5-12 mm arasında ve kanatların uzunlukları da 3-11.6 mm arasında değişmektedir. Dişilerde yumurta bırakmaya yarayan belirgin bir ovipozitör bulunmaktadır. Larval dönemde konak vücudunda gelişme olduğu için hareket etmeye yarayan üyeler bulunmamaktadır ve kutikulası çok ince olup kolaylıkla gaz değişimini vücut yüzeyinden gerçekleştirmektedir. Yumurtadan çıkan larvalar yaklaşık 10 gün içinde pupal döneme ulaşırlar ve bu dönemin sonuna doğru ergine ait antenler ve gözler belirginleşir. Konaklarının ölümüyle sonuçlanan bu ilişkide konaklarını ergin olarak terk ederler (Şekil 1.4) (Kılınçer 1975; Osman 1978; Yazgan 1981; Kansu ve Uğur 1984; Uçkan ve Gülel 1990).

1.5.1 Sistematikteki yeri

Alem: Animalia

Şube: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: Hymenoptera

Üstfamilya: Ichneumonoidea

Familya: Ichneumonidae

Altfamilya: Pimplinae

Cins: *Pimpla*

Tür: *Pimpla turionellae* (Linnaeus, 1758)

Sinonimi *Coccygomimus turionellae*'dir.



Şekil 1.4. Parazitoit *Pimpla turionellae*'nin larva, pupa ve ergin dönemleri (♀♂).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Laboratuvar

Konak ve parazitoit kültürlerinin yetiştirilmesinde ve deneylerin devamında 2.50 x2.75x1.30 m boyutlarında iki oda laboratuvar olarak kullanıldı. Kültürlerin yetiştirilmesi ve tüm deneyler süresince, laboratuvarında 25±2°C sıcaklık, %60±5 bağıl nem ve 12: 12 saat (Aydınlık: Karanlık) fotoperiyot şartları devam ettirildi. Laboratuvarında sıcaklık termostatlı radyatör kullanılarak, nispi nem ise nem cihazları ve gerektiğinde laboratuvar zeminine su serpilerek sağlandı. Sıcaklık ve nem değerleri maksimum-minimum termometre ve higrometre ile devamlı olarak takip edildi. Aydınlık ve karanlık süresi fotoperiyot cihazları ile ayarlandı.

2.2. Konak ve Parazitoit Stok Kültürlerinin Kurulması

Konak *Galleria mellonella* ve parazitoit *Pimpla turionellae* türlerinin stok kültürlerinin oluşturulması, Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarından getirilen erginlerin laboratuvarımızda beslenmesi ile sağlandı.

Konak stok kültürünün sürdürülmesi için, doğal koyulaşmış petek bulunan 5 L'lik cam kavanozlara 5 dişi ve 5 erkek *G. mellonella* erginleri bırakıldı. Kavanozların ağzı hava sirkülasyonunu önlemeyecek şekilde bez ve üstüne delikler açılmış kapaklar (larvaların bezi delip kaçmalarını önlemek için) ile kapatıldı. Kavanozlar 25±2°C sıcaklık, %60±5 bağıl nem ve günlük 12:12 (K:A) fotoperiyot uygulanan laboratuvar koşullarında bekletildi. Larvaların beslenebilmesi amacıyla populasyon yoğunluğuna bağlı olarak, kavanozlara zaman zaman yeterli miktarda petek ilave edildi. Bu şekilde elde edilen konak larva ve pupları, parazitoit ve konak kültürlerinin devamında, erginler ise GA₃ dozlarının uygulamalarının yapılacağı süksesif kültürlerin kurulmasında kullanıldı.

P. turionellae stok kültürünün laboratuvarımızda devam ettirilebilmesi için; besin olarak doğal petek kullanılarak yetiştirilen konak larvaları son larva

evrelerine doğru kültürden alınıp içerisinde sadece katlanmış parşömen kağıdı bulunan kavanozlara bırakıldı. Kavanozlar üzeri delinmiş kapak ile kapatılarak konak stok kültürlerinin yetiştirildiği laboratuvara ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, $\%60\pm 5$ bağıl nem ve günlük 12:12 (K:A) fotoperiyot) alındı. Larvalardan elde edilen bu puplar, *P. turionellae* stok kültürünün hazırlanmasında kullanıldı. Parazitoit üretimi için konak pupları *P. turionellae* ergin dişileri tarafından parazitlendirildi. Elde edilen ergin bireyler parazitoit kültürünün devamında kullanıldı. Parazitoit kültürleri, konak kültürleri ile aynı laboratuvar koşullarında tutuldu. *P. turionellae* erginleri her gün $\%30$ bal çözeltisi ve 2-4 günde bir konak pup hemolenfi ile beslendi. Ergin bireyler 20x20x20 cm boyutlarındaki tel kafeslerde tutuldu.

2.3. Konak ve Parazitoit Süksesif Kültürlerinin Kurulması

Konak süksesif kültürlerini oluşturmak için, belli aralıklarla stok kültürden alınan birer tane en çok iki günlük dişi ve erkek *G. mellonella* ergini, içerisinde 10 gr yapay besin (Tablo 2.1) bulunan bir litrelik cam kavanozlara bırakıldı. Kavanozlar üzeri delinmiş kapak ile kapatılarak konak stok kültürlerinin yetiştirildiği laboratuvara ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, $\%60\pm 5$ bağıl nem ve günlük 12:12 (K:A) fotoperiyot) alındı. Populasyon yoğunluğuna bağlı olarak, azalan konak besinini karşılamak için kavanozlara zaman zaman yeterli miktarda besin ilave edildi. Bu şekilde elde edilen konak larva ve pupları, parazitoit ve konak süksesif kültürlerinin sürdürülmesinde ve GA_3 çalışmalarında kullanıldı. GA_3 'lü gruplarda kullanılan besinde sadece saf su yerine değişik oranlarda hazırlanan GA_3 çözeltileri kullanıldı.

Parazitoit süksesif kültürünü oluşturmak için 10-15 gün yaşlı dişi ve erkek *P. turionellae* erginleri kullanıldı. *P. turionellae* süksesif kültürünün hazırlanması ve GA_3 çalışmaları için konak larvaları son evreye doğru kültürden alınıp içinde katlanmış kağıt bulunan bir litrelik cam kavanozlara bırakıldı ve puplaşmaları sağlandı. Elde edilen pupların haftada iki gün ve her parazitoite beş konak pupu düşecek şekilde parazitoitler tarafından parazitlenmeleri sağlandı. Bu şekilde parazitoit kültürleri oluşturuldu ve çalışma boyunca devam ettirildi. Parazitoit

süksesif kültürleri de konak kültürleri gibi aynı fotoperiyodik koşullarda devam ettirildi.

Tablo 2.1. Broskill (1961) tarafından verilen ve Sak ve ark (2006) tarafından modifiye edilmiş yapay konak böcek *G. mellonella* besini.

Kullanılan Besin	
Ufalanmış petek	200 g
Kepek	860 g
Süzme Bal	150 ml
Gliserin	300 ml
Saf su	150 ml

2.4. Gibberellik Asit

Çalışmada kullanılan gibberellik asit (GA_3 , $C_{19}H_{22}O_6$) (Merck) saf, toz halinde ticari olarak alındı. Deney gruplarının oluşturulması için gibberellik asit, saf su ile seyreltilerek 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 ppm oranlarında çözeltiler hazırlandı. GA_3 çözeltileri 100 gr petek, 250 gr kepek, 75 ml bal, 150 ml gliserin ve 75 ml saf su içeren 10 gr yapay besiyerlerine saf su oranı kadar ilave edildi.

2.5. Deney Grupları

Her bir GA_3 dozu (50, 100, 200, 500, 1000, 2000 ve 5000 ppm) için 10 gr yapay besiyeri içeren beşer adet 1000 ml'lik cam kavanoz içerisine *G. mellonella*'ya 1-2 günlük bir dişi ve bir erkek ergin bireyler çiftleşmek ve yumurta bırakmak üzere bırakıldı. Kavanozların ağzı hava sirkülasyonu önlemeyecek şekilde bez ve üzerlerinde hava delikleri bulunan kapaklar ile kapatılarak, $25\pm 2^\circ C$ sıcaklık, 60 ± 5 bağıl nem ve 12: 12 saat (Aydınlık: Karanlık) fotoperiyot şartları içeren ortamda yedi gün bekletildiler. Kontrol gruplarının oluşturulmasında ise, deney grupları için verilen yöntem izlendi. Ancak kontrol gruplarına GA_3 yerine

saf su verilmiş besin eklendi. Yedinci günün sonunda ergin bireyler kavanozlardan alındı. Kavanozlara bırakılan yumurtalardan açılan larvaların gelişimi ise aynı koşullar altında gerçekleştirildi. Belirli bir büyüklüğe ulaşmış olan (ortalama 30 günlük) son dönem larvalardan (0.18 ± 0.2 gr), kavanozun tümünü temsil edecek şekilde seçilerek bu larvaların bir kısmından hemolenf alınırken bir kısmı da parazitlenme işlemi için kullanıldı.

Parazitlenme işleminde kullanılacak olan konak larvaları besiyerinden alınıp içerisinde sadece katlanmış kağıt bulunan kavanozlarda puplaştırıldı. Puplar ise çiftleştirilmiş dişi parazitoit *P. turionellae* erginleri için kullanıldı. Parazitlenmiş olan konak pupları da konak larvalarına sağlanan fotoperiyodik koşullar altında bekletildi. Bütün deney grupları, beşerli seri halinde farklı zamanlarda üç kez tekrar edildi. Tekrar gruplarında kullanılan konak bireylerin farklı zamanlarda ve farklı kültürlerden alınmasına özen gösterildi.

2.6. Hemolenf Toplama

GA₃ uygulamasının *P. turionellae* ve *G. mellonella* larvalarında hemolenf proteinleri ve serbest aminoasitleri ile *G. mellonella*'nın larval hemositlerine etkilerinin belirlenmesi için 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 ve 5000 ppm'lik dozlar ve kontrol grubu ile çalışıldı. Deney grupları olarak hazırlanan kavanozlardan 0.18 ± 0.2 gr ağırlıkları arasında tartılan konak larvaları seçildi. Alınan larvalar üç kez distile suda yıkandıktan sonra hareket yeteneklerinin azalması için kısa bir süre buz üzerinde bekletildi. Hemolenf almak için larvalar üçüncü ön bacak bölgesinden ince uçlu diseksiyon iğnesi ile delindi. Bu delikten çıkan hemolenften her bir birey için 10 µl hemolenf mikrokapiller tüp ile çekildi ve içinde 0.001 mg N-phenylthiourea (Sigma) olan buzda soğutulmuş ependorf tüplerine alındı. Bir deney serisinin tekrarında on birey olacak şekilde deneyler değişik zamanlarda üç kez tekrar edildi. GA₃ uygulamalarında kullanılan *G. mellonella* son evre larvalarının farklı zaman ve farklı süksesif kültürlerden alınmasına özen gösterildi.

Konakta olduğu gibi *P. turionellae*'da da GA₃'ün hemolenf protein ve serbest aminoasitleri üzerindeki etkilerini belirlemek için 0.18 ± 0.2 gr arasında

değişen konak larvaları puplaştırıldı ve bir parazitoite 5 pup olacak şekilde haftada iki gün parazitlenme yapıldı. Parazitlenmiş olan konak puplarında gelişen son dönem parazitoit larvalarından hemolenf alınması için, puplar stereo mikroskop altında disekte edildi ve çıkarılan parazitoit larvalarından mikrokapiller tüp ile yaklaşık 3 µl hemolenf alındı. Konak hemolenfinde olduğu gibi içinde 0.001 mg N-phenylthiourea (Sigma) olan buzda soğutulmuş ependorf tüplerine alındı. Bir deney serisinde on birey olacak şekilde değişik zamanlarda üç kez tekrar edildi. Toplanan konak ve parazitoit hemolenfleri, protein ve serbest aminoasit analizleri yapıncaya kadar -20°C’de saklandı.

2.7. Konak ve Parazitoit Hemolenf Proteinlerinin Analizi

GA₃’ün hem konak hemde parazitoit larvalarının total hemolenf proteinleri üzerindeki etkileri “Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforetik (SDS-PAGE)” ayırım yöntemi kullanılarak yapıldı (Laemmli 1970). Bu yöntemde öncelikle standardizasyon çalışmaları için farklı por çaplarında ayırma jelleri hazırlanarak, en iyi elektroforetik ayırımın yapıldığı ayırma jeli yüzdesinin %10 olduğu belirlendi. Bu nedenle çalışmalarda hemolenf proteinleri %10’luk ayırma jelinde yürütüldü ve jeller coomassie blue boyama yöntemi ile boyandı.

2.7.1. Çözeltilerin hazırlanması

SDS-PAGE’de ayırma jeli tamponu olarak 1.5 M Tris pH 8.8 kullanıldı. Bu amaçla, Tris base (Sigma) (18.16 g) deiyonize su ile 100 ml’ye tamamlandı ve 3N HCl (Fluka) ile pH’ı 8.8’e ayarlandı. Yükleme jeli tamponu olarak ise 1M Tris pH 6.8 kullanıldı. Tris base (12.11 gr) deiyonize su ile 100 ml’ye tamamlandı, 3 N HCl ile pH’ı 6.8’e ayarlandı. Hazırlanan çözeltiler Whatman no:1 filtre kâğıdından filtre edilerek, otoklav edildi ve oda sıcaklığında karanlıkta saklandı. 5 gr sodyum dodesil sülfat (Fluka) deiyonize su ile 50 ml’ye tamamlanarak %10’luk sodyum dodesil sülfat hazırlandı, oda sıcaklığında karanlıkta saklandı. 0.1 gr amonyumpersülfat (Sigma) deiyonize su ile 1 ml’ye tamamlanarak deneylerde polimerizasyon başlatıcısı olarak kullanılan %10 amonyum persülfat hazırlandı.

Koşturma tamponu (pH 8.3) hazırlamak için tris base (3.75 gr), glisin (18 gr) (Fluka) ve SDS (5 gr) tartılıp 250 ml'lik balon jöjeye konularak deiyonize su (250 ml) ile çözdürüldü. Hazırlanan çözeltilinin pH'ı 1 N NaOH (Fluka) veya 1 N HCl kullanarak 8.3'e ayarlandı. Tampon 5X olarak hazırlandığı için kullanılmadan önce 5 kez sulandırılarak 1X'e ayarlandı. Örnek uygulama tamponu (2X) [0.125 M Tris, % 4 SDS, % 20 gliserol, % 10 2-merkaptoetanol, % 0.2 Bromfenol mavisi (Sigma) pH 6.8] için 1M Tris (2.5 ml), %10 SDS (4 ml), gliserol (2 ml) (Amresco), 2-merkaptoetanol (1 ml) (Sigma), Bromfenol mavisi (0.02 gr) (Sigma) deiyonize su (10 ml) içinde karıştırılıp çözdürüldü ve pH 1 N HCl ile 6.8'e ayarlandı. Çözelti küçük eppendorflarla eşit hacimlerde bölündü ve -20°C'de saklandı.

Hazırlanan jeller, coomassie Brilliant Blue (1 gr) (Sigma), Metanol (500 ml) (Fluka) ve glasiyel asetik asit (100 ml) (Sigma) karışımı deiyonize su 1 L'ye tamamlanarak hazırlanan çözelti ile boyandı. Boya çözüldükten sonra Whatman No:1 filtre kâğıdından filtre edilerek karanlıkta oda sıcaklığında saklandı. Jellerin yıkanması için metanol (125 ml), glasiyal asetik asit (175 ml) ve deiyonize su (2200 ml) kullanılarak hazırlanan çözelti kullanıldı. Jellerde bant analizinde standart olarak geniş aralıklı protein moleküler ağırlık standartı (6.5 – 205 kDa) (Sigma) ve düşük aralıklı protein moleküler ağırlık standartı (6.5 – 66 kDa) (Sigma) kullanıldı (Tablo 2.2). Standart proteinler 100 µl steril deiyonize su içinde çözdürülerek eşit hacimlerde eppendorf tüplere bölündü ve -20°C'de saklandı.

Tablo 2.2. SDS-PAGE jellerinde bant analizinde kullanılan protein standartları ve moleküler ağırlıkları

Proteinler	Moleküler Ağırlık (kDa)	Geniş moleküler ağırlıklı standart	Düşük moleküler ağırlıklı standart
Miyozin	200	X	
β -Galaktosidaz	116	X	
Fosforilaz b	97	X	
Laktoferrin	66	X	X
Sığır serum albumin	55	X	
Glutamik dehidrogenaz	45	X	X
Ovalbumin	36	X	X
Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz	29	X	X
Karbonik anhidraz	24	X	X
Tripsinojen	20	X	X
Tripsin inhibitor	14	X	X
α -laktalbumin	6.5	X	X

2.7.2. Protein örneklerinin hazırlanması

Hem konak hem de parazitoite ait deney ve kontrol gruplarından daha önce alınarak -20°C’de saklanan hemolenf örnekleri eppendorf marka mikrosantrifüj aletinde 3000 rpm (1000 g)’de +4°C’de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüjlenen eppendorf içindeki örneğin supernatant kısmı ikinci bir eppendorfa alındı ve ikinci eppendorftaki hemolenf pipet ucuyla hafifçe karıştırıldı. İşlemler sırasında hemolenfin buzlu ortamda tutulması sağlandı.

Analizler için işlem gören hemolenf örnekleri steril deiyonize su ile 1:10 oranında sulandırıldı. Bu çalışma ile eşgüdümlü olarak yapılan bir diğer

çalışmadaki (Uçkan ve ark. basılmadı) spektrofotometrik sonuçlar kullanılarak sulandırılmış örneklerden her bir kuyucukta 40 µg olacak şekilde hesaplama yapıldı. Bu sonuçlara göre örnek alınarak üzerlerine hemolenfin üç katı oranında örnek yükleme tamponu eklendi ve eppendorf içindeki son hacim steril distile su ile 30 µl'ye tamamlandı. Eppendorflar içerdikleri hemolenfe göre etiketlenerek, 100°C'de kaynatılmış su içinde beş dakika süreyle bekletildi. Bu sürenin sonunda hemolenf örnekleri yükleme jelindeki kuyucuklara yüklendi.

2.7.3. Jellerin hazırlanması

Öncelikle standardizasyon çalışmaları yapılarak farklı por çaplarında ayırma jelleri hazırlandı. En iyi elektroforetik ayırmanın %10'luk jel ile yapıldığı belirlendi. Ayırma jeli; akrilamid / N, N'-metilenbis (akrilamid) (BIS) (%30) (1.9 ml) (Sigma), distile su (1.7 ml), 1.5 M Tris pH 8.8 (1.3 ml) (Sigma), %10 SDS (0.05 ml), amonyum persülfat (APS) (0.05 ml) ve tetrametiletildiamin (TEMED) (0.002 ml) (Sigma) kullanılarak hazırlandı. Çözeltilerden APS ve TEMED haricindekiler steril bir cam behere konulduktan sonra karıştırıldı ve vakumlu hava ile karışımın havası alındı. Bu işlemde hemen sonra APS ve TEMED hızlı bir şekilde ilave edilip karıştırıldı. Elde edilen karışım mini jel elektroforezin 0.75 mm aralığa sahip iki cam plağı arasına dökülerek jelin yüzeyinin düz olması ve polimerizasyon için üst kısma su ile doyurulmuş n-bütanol (Sigma) döküldü. Bu işlemler tamamlandıktan sonra polimerizasyon için beklendi. %5'lik yükleme jeli (3 ml) için akrilamid / BIS (%30) (0.5 ml), distile su (1 ml), 1M Tris pH: 6.8 (0.38 ml), %10 SDS (0.03 ml), amonyum persülfat (APS) (0.03 ml), tetrametiletildiamin (TEMED) (0.003 ml) kullanılarak hazırlandı. Ayırma jeli polimerizasyonu tamamlandıktan sonra, jelin üzerinde bulunan n-bütanol, distile su ile yıkandı. Bu yıkama işlemi üç kez tekrarlanarak n-bütanolün iyice uzaklaşması sağlandı. Yükleme jeli için hazırlanan yukarıdaki karışım, ayırma jelinin üzerine dökülerek hemen tarak yerleştirildi ve polimerizasyonun tamamlanması beklendi. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra cam plaklar elektroforez tankına yerleştirilerek tarağın meydana getirdiği çukurlukların seviyesini geçecek şekilde 1X koşturma tamponu konuldu.

2.7.4. Elektroforez

1X koşturma tamponu elektroforez tankına konulduktan sonra tarak bir uçtan başlayarak kuyucukların bozulmamasına dikkat edilerek yavaşça kaldırıldı. Tarak çıkartıldıktan sonra boşalan kuyucuklar tampon ile dolduğundan akımın tam olarak geçmesi için elektroforez tankına bir miktar daha 1X koşturma tamponu eklendi. Daha sonra birinci kuyucuğa mikropipetör ile (örnek uygulama tamponu ile 3:1 oranında hazırlanmış) düşük aralıklı (Low range, Sigma) moleküler ağırlık standardından (LM) 10 µl, ikinci kuyucuğa ise geniş ağırlıklı moleküler ağırlık standardından (Wide range Sigma) (WM) 10 µl (örnek uygulama tamponu ile 3:1 oranında hazırlanmış) yüklendi. Diğer kuyucuklara ise sırasıyla, kontrol, 50 ppm GA₃, 100 ppm GA₃, 200 ppm GA₃, 500 ppm GA₃, 1000 ppm GA₃, 2000 ppm GA₃ ve 5000 ppm GA₃'e maruz kalmış larval hemolenf örneklerinden 10 µl yüklendi. Konak ve parazitoite ait olan larval hemolenf örnekleri ayrı jellerde yürütüldü. Her deney grubu için SDS-PAGE çalışması 3 defa tekrarlandı. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra tankın kapağı kapatılarak sistem güç kaynağına bağlandı. Jelin yürümesi sırasında, boya, yükleme jelinden ayırma jeline gelene kadar güç kaynağı 90 volta, ayırma jelinden sonra 120 volta ayarlandı. Yaklaşık 2.5 saat kadar jel yürütüldü. Yürütme işlemi sonlandırıldıktan sonra jeller, cam plaklar arasından çıkartılarak kapaklı plastik kaplara ayrı ayrı alınarak Coomassie Blue boyama yöntemi ile boyama işlemine geçildi. Jellerin üzeri tamamen kaplanacak şekilde boyama çözeltisi dökülerek, bu şekilde bir gece boyunca 20 devir/dakika hızında çalkalanarak boyandı. Gece boyunca boyanan jellerdeki boyama çözeltisi dökülerek jeller 1 saat boyunca yıkama çözeltisinde çalkalandı. Bir saat sonra yıkama çözeltisi dökülerek tekrar yıkama çözeltisi ilave edildi ve jeller 1 saat daha yıkandı. Bu işlem jellerin zeminindeki boya tamamen çıkana kadar devam etti. Yıkama işlemi sona erdikten sonra jeller üzerindeki bantların moleküler ağırlıklarının hesaplanması için jelin X-ray fotoğrafı çekildi. Daha sonra jeller %7 asetik asit çözeltisi içinde saklandı.

2.7.5. Moleküler ağırlık

Bu analizler için proteinlerin, moleküler ağırlığının logaritması ile jellerdeki rölatif göç hızları (R_f değerleri) arasındaki doğrusal ilişki esasından yararlanıldı. Jeldeki göç hızının bir fonksiyonu olan Rölatif göç hızı (R_f değeri), jelin üst kısmından bandın bulunduğu yere kadar olan uzaklığın, jelin üst kısmından işaret boyasının olduğu yere kadar olan uzaklığa olan oranıdır. Bu formüle uygun olarak standart proteinlerin R_f değerleri belirlendi ve milimetrik kağıdın ordinat bölgesine yazıldı. Bu proteinlerin moleküler ağırlıkları da absise yerleştirilerek standart bir grafik elde edildi. Hemolenf örneklerine ait bantların da R_f değerleri aynı şekilde ölçüldü ve standart grafik üzerindeki doğrudan kesiştirilerek bu bantların tahmini moleküler ağırlıkları tespit edildi. Ayrıca fotoğrafı çekilmiş olan jellerin üzerindeki protein bantlarının moleküler ağırlıkları ve optik densitometrik analizleri (O.D.) Gel-Pro Analyzer Version:4 programı kullanılarak %99 hassasiyetle tekrarlandı. Bu analizler her deney grubu için üç kez tekrarlanarak istatistiksel analizleri yapıldı.

2.8. Konak ve Parazitoit Serbest Aminoasitlerinin Analizi

Deney gruplarını oluşturan farklı GA_3 dozlarının (50-5000 ppm) etkilerinin konak son dönem larvalarına ve konak aracılığıyla aynı dozlarda GA_3 'e maruz kalan parazitoit son dönem larvalarına olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) uygulaması yapıldı. Bu yöntemle, hem konak ve parazitoit larval hemolenfindeki serbest aminoasit içeriği belirlendi hem de GA_3 'e bağlı değişimler belirlendi. Daha önce hemolenf protein analizlerinde kullanılıp kalanı $-20^{\circ}C$ 'de feniltiyöre içerisinde saklanan hemolenf örnekleri 3000 rpm'de $4^{\circ}C$ 'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra yaklaşık 20 μ l süpernatant steril eppendorf tüplere alınarak örnekler $-20^{\circ}C$ 'de HPLC analizine kadar saklandı. Serbest aminoasit (aa) analizlerinde kullanılan tüm kimyasallar ve sarf malzemeler Sigma'dan sağlandı.

2.8.1. Hemolenf ve aminoasit standartlarının hazırlanması

Kromatografi öncesi, konak ve parazitoit hemolenf örneklerine, 20 farklı saf aminoasit standartına (Sigma) ve içerisinde 20 adet aminoasit standartı bulunan karışıma aşağıdaki ön işlemler yapıldı. Standart aminoasitlerin tamamı “L” formunda ve 0.1 M Hidroklorik asit (HCl) içinde 100 mM olarak kullanıldı. Öncelikle, hemolenf örnekleri -20°C’den çıkartıldıktan sonra eriyene kadar oda sıcaklığında bekletildi. Örneklerden ve tüm standartlardan 4’er µl alınarak her biri üzeri içeriği ile ilişkili etiketlenmiş olan 250 µl’lik steril eppendorf tüplere konuldu. Bu örneklerin üzerine de 10 µl saf su ve 87 µl asetonitril eklenerek pipetle çekip bırakılarak karıştırıldı. Örnekler 8000 g’de 1 dak oda sıcaklığında (22°C) santrifüj edildi ve süpernatanttan 95 µl alınarak ikinci bir eppendorfa konuldular. Eppendorflar tekrar 8000 g’de oda sıcaklığında 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatanttan 80 µl alınarak yeni eppendorflara konuldu. Örnekler ağzı açık durumda 2 saat etüvde 65°C’de bekletildi. Kurutma işleminden sonra Phenylisotiocyante (PITC) ile türevlendirilme işlemine geçildi.

2.8.2. PITC ile türevlendirme

Türevlendirme işlemi Vilasoa-Martinez ve ark. (2007)’nin yaptığı çalışmanın modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi. Kurutma işleminin sonunda hemolenf ve standart örneklerinin üzerine 6 µl Metanol – Su – Trietilamin (TEA) (2:2:1) karışımı eklenerek karıştırılmadan ve ağzı açık durumda 10 dakika 65°C’de bekletildi. 10 dakika sonra, üzerlerine 6 µl Metanol – Su – TEA – Fenilisotiyosiyanat (PITC) karışımı (7:1:1:1, v/v-türev reaktifi -) eklenerek en az iki kez pipetleme yapıldı, ağızları kapatılarak 30 sn vortekslendi ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu karışım ağzı açık olarak 15 dak. 65°C de etüvde bekletildi. Bu aşamaya kadar hazırlanan örneklere, enjeksiyondan bir saat önce 150 µl, pH’ı fosforik asitle 7.43’e ayarlanmış %5 asetonitril içeren 5 mM sodyum fosfat (Na₂HPO₄) eklendi ve 15 sn vortekslendi. Bir saat sonra ise tüm örneklerden 30 µl alınarak HPLC viallerine konuldu ve enjeksiyonlar yapıldı.

2.8.3. HPLC cihazı ve koşulları

Hemolenf ve standartlara ait çözeltilerin kromatogramı, dörtlü pompalı (FCV-10AL vp Shimadzu), otomatik enjeksiyonlu (SIL-10AD vp Shimadzu) ve Diode Array Dedektör (SPD-M10A vp) bileşenlere sahip LC-10 AT vp Shimadzu model cihazda, ters fazlı ODS2 (25 cm x 4 cm), 5 µm partikül çapında (GL-Sciences Inc.) HPLC kolonu kullanılarak alındı. Enjeksiyonların yapıldığı kromatogram koşullarında A ve B pompalarından geçirilmek üzere iki ayrı tampon kullanıldı. Hareketli faz (Yürütme çözeltisi) olarak kullanılan bu tamponlardan A çözeltisi %0.05 TEA (v/v) içeren 0.14 M 500 ml sodyum asetatla hazırlandı ve çözeltinin pH derecesi glasiyel asetik asit ile 6.2'ye ayarlandı. Organik çözücü ve kolonun yıkanması amacıyla kullanılan diğer hareketli tampon B çözeltisi ise %60 Asetonitril içeren Asetonitril- Su karışımından (60: 40) hazırlandı. Hazırlanan A ve B tamponları 0.45 µm çapında gözeneklere sahip olan Spartan filtre'den geçirilerek filtre edildiler. Filtrasyon işleminden sonra çözeltilerin ultrasonik banyo içinde 15 dakika gazları giderildi. Hemolenf örnekleri ve amino asit standartlarından oluşan karışım 60 dakika süresince iki basamaklı linear gradient programına göre kolondan geçirildi. Bu programda başlangıçta A tamponu %100'den 55 dakika boyunca %45'e indi ve sonrasında 5 dakika boyunca B tamponu %100 uygulandı (55 dakika %100-45 A, 5 dakika %100 B). Ayrıca her bir enjeksiyon arasında kolon %100 B tamponu ile 30 dakika yıkandı ve tekrar A tamponu ile 30 dakika koşullandırılarak diğer enjeksiyonlar gerçekleştirildi. Enjeksiyonlar ve diğer uygulamalar sırasında kolondaki akış hızı 1.20 ml dak⁻¹ ve sıcaklık 27 ± 2°C olarak ayarlandı. Hemolenf örnekleri ve standartlara ait pikler 254 nm UV ışığında görüntülenerek içerikte bulunan bileşiklere ve standartlara ait piklerinin alıkonma zamanları Shimadzu LC solution versiyon 1.2 programında karşılaştırıldı. Kromatogramlarda veri analizleri ve karşılaştırmalar sonucunda hemolenf örneklerindeki serbest amino asit içeriği belirlendi.

2.8.4. Kantitatif analiz

Hemolenf içeriğindeki varlığı HPLC ile gösterilen aminoasitlerin pik alanı yüzdelerinde, GA₃ uygulanmasına bağlı değişimler belirlenerek her bileşen için ayrı ayrı olmak üzere, serbest aa'lerin pik alanı yüzde değişimleri istatistiksel yöntemler ile karşılaştırıldı. Ayrıca her bir amino asidin ng/ µl'deki miktarının belirlenmesi amacıyla 0.1 M HCl içinde 100 mM konsantrasyonda 20 aminoasit içeren karışımdan 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40x10⁻⁶ mmol konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. Bu standart çözeltilerde hemolenf ve saf aminoasit örnekleri gibi ön işlemlerden geçirilerek türevlendirildi ve aynı koşullarda kolona enjekte edildiler. Aminoasit karışımlarına ait olan bu kromatogramlardaki her bir aminoasidin pik alanı göç zamanlarına oranlanarak pik normalleştirilmeleri yapıldı. Bu işlemden sonra 20 aminoasidin de normalleştirilmiş değerlerine ve konsantrasyonlarına göre kalibrasyon eğrileri belirlendi. Bu eğrilere $y=bx+a$ formülü uygulanarak tüm eğrilerin kalibrasyon eşitlikleri ve determinasyon katsayıları (R²) belirlendi. Ayrıca formülde çıkan verilere göre kalibrasyon eğrilerinin standart sapma (S_{xy}), eğim (b) ve kesim noktaları (a) hesaplandı. Bu değerler üzerinden de standart uygulamalarının saptama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) belirlendi.

$$\text{LOD (saptama sınırı)}=(S_{xy}/b) \times 3.3$$

$$\text{LOQ (tayin sınırı)}=\text{LOD} \times 3$$

Kalibrasyon eğrilerine ve LOD, LOQ değerlerine göre hem konak hem de parazitoit hemolenf örneklerinde belirlenen aminoasitlerin nanogram cinsinden miktarları belirlendi. Bu deneyler üç kez tekrar edilerek elde edilen verilerin istatistiksel analizleri yapıldı.

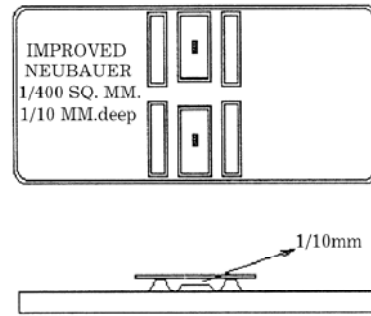
2.9. Konak Hemosit Analizi

50-5000 ppm doz aralığındaki GA₃'ün konak *G. mellonella* son dönem larvalarının hemositleri üzerine etkilerinin belirlendiği çalışmalarda 0.18±0.2gr ağırlığında son evre larvalardan hemolenf alınıp toplam hemosit sayıları, tipleri,

mitotik indeks, enkapsülasyon, melanizasyon durumları ve apoptotik indeks analizleri yapıldı. Bu deneylerde kullanılan kimyasallar Sigma'dan sağlandı.

2.9.1. Toplam hemosit sayısı

Farklı dozlardaki GA₃'ün konak toplam hemosit sayısına etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerde her doz ve kontrol grubu için 15'er larva kullanıldı. Alınan larvaların farklı zamanlarda hazırlanmış olan kavanozlardan olmasına dikkat edildi. Bu nedenle, konak son evre larvaları üçerli gruplara ayrılarak deneyler 5 kez tekrar edildi. Her doz ve her tekrardaki larva hemositleri 3 kez sayılarak ortalaması alındı. 0.18±0.2 gr ağırlığında son evre larvaların birinci ön bacak üzerinden 4 µl hemolenf mikropipet tüp (Sigma) yardımıyla alındı. Elde edilen hemolenf buz üzerinde bekletilen ve içerisinde 36 µl pıhtılaşma engelleyici solüsyon (0.098 M NaOH, 0.186 M NaCl, 0.017 M Na₂EDTA ve 0.041 M Sitrik asit, pH 4.5) (Nealis ve Frankenhyzen 1990; Tojo ve ark. 2000; Teramoto ve Tanaka 2004; Er ve ark. 2010a) bulunan eppendorf tüplerine aktarıldı. 1: 10 oranında seyreltilmiş hücre süspansiyonu mikropipet yardımıyla birkaç kez çekip bırakılarak karıştırıldı ve hücre süspansiyonundan 10 µl mikropipet ile çekilerek 0.100 mm derinliğe sahip Neubauer hemositometresine (Improved Neubauer Hemocytometer; Superior, Germany) (Şekil 2.1) yüklendi. Hemositler Leica DM6000 B marka Faz – Kontrast mikroskobunda sayıldı.



Şekil 2.1. Neubauer hemositometre lamı

Neubauer hemositometresi üzerinde iki farklı sayım alanı bulunan ve bu sayım alanlarının bir çukurlukla birbirinden ayrıldığı sayma lamıdır. Her bir sayım alanında köşelerde dört tane 1 mm²'lik bölümler (büyük kareler) bulunur.

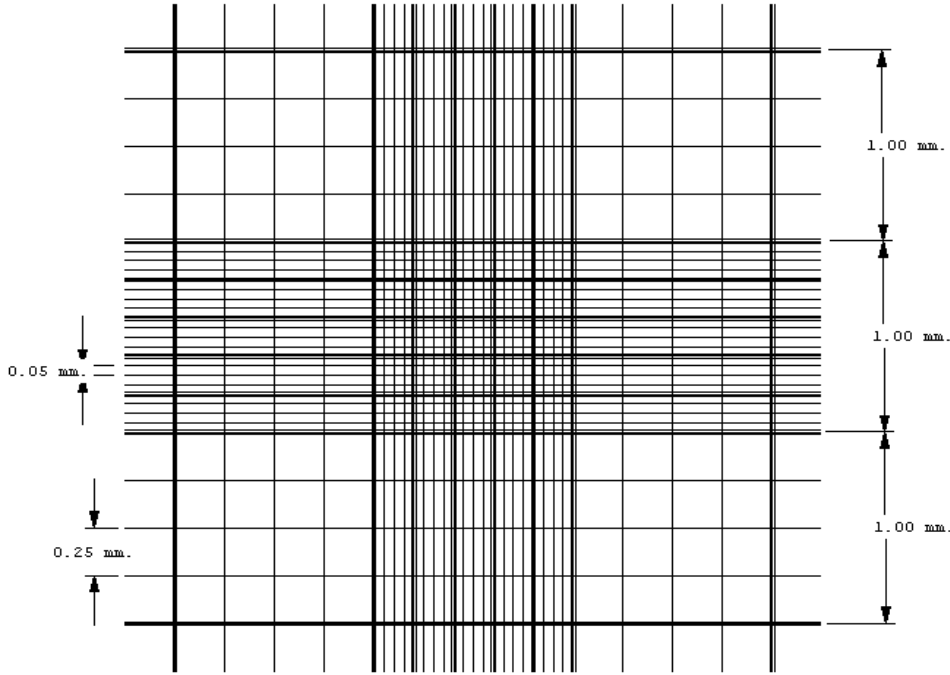
Bunlar 16 orta büyüklükte kareye ayrılmıştır ($1/4 \times 1/4 = 1/16 \text{ mm}^2$). Ortada bulunan büyük kare ise 25 orta büyüklükte kareye ayrılmıştır. Orta büyüklükteki karelerin etrafı çift çizgi ile çevrilmiştir. Her bir orta kare de 16 küçük kareye bölünmüştür (Şekil 2.2). Böylece, ortadaki alanda 25 orta kare, 400 küçük kare vardır. Bir küçük karenin alanı $1/20 \times 1/20 = 1/400 \text{ mm}^2$ 'dir. Sayım alanı dışında kalan kenarlar, sayım alanı yüzeyinden 0.1 mm yüksektir. Sayım alanı üzerine hemositometrenin lameli konulunca, lamel ile sayım alanı yüzeyi arasında 0.1 mm'lik bir boşluk kalır. Böylece lam ve lamel arasında kalan her karenin hacmi hesaplanabilir:

En büyük (1 mm^2 'lik) karenin hacmi, $1 \times 1 \times 0.1 = 0.1 \text{ mm}^3$

$0.1 \text{ mm}^3 = 0.0001 \text{ cm}^3 = 0.0001 \text{ ml}$ 'dir.

Deney gruplarında hemositometre lamının orta kısmında bulunan, 25 orta büyüklükte kareye ayrılmış ve her bir orta karenin de 16 küçük kareye bölündüğü 1 mm^2 'lik büyük karenin tamamı sayılarak toplam hemosit sayıları belirlendi. Mililitredeki toplam hemosit sayılarının hesaplanması için;

Hücre sayısı / ml = Büyük karede sayılan hücre sayısı X Sulandırma katsayısı X 10^4 formülünden yararlanıldı.



Şekil 2.2. Neubauer hemositometresi sayım alanı

2.9.2. Farklı hemosit sayıları ve mitotik indeks

50-5000 ppm doz aralığındaki GA₃'ün konak son evre larvalarının farklı hemosit sayıları üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla *G. mellonella*'nın 0.18±0.2 gr ağırlığındaki son evre larvaları kullanıldı. Hemolenf elde edebilmek için son evre larvalar -20°C'de 3 dakika bekletilerek hareketlerinin yavaşlaması sağlandı. Larvalar %95'lik etanol ile silindikten sonra, birinci arka bacak üstünden ince uçlu diseksiyon iğnesi ile delinip mikrokapiler tüp (SIGMA) yardımıyla 5 µl hemolenf elde edildi. Hemolenf melanizasyona izin vermeden hızlı bir şekilde daha önce alkolle temizlenmiş lamlar üzerine alınarak yayıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Lamaların kurummasını takiben hemositlerin fiksasyonu için lamalar 5 dakika süre ile metanol: asetik asit (3:1) çözeltisi içinde bekletildi ve metanol üzerlerinden akıtılarak kurumaya bırakıldı. Hemositlerin boyanabilmesi için taze olarak hazırlanan Giemsa boya çözeltisi kullanıldı. Boyama çözeltisinin hazırlanabilmesi için, 3 ml giemsa boya solüsyonu (MERCK Giemsa's Azure Eosine Methylene Blue Solution), içerisinde 57 ml PBS (pH 7.4) bulunan lam boyama kaplarına yavaşça damlatılarak karıştırıldı ve 10 dakika bekletildi. Tespit işleminden sonra kurutulan lamalar giemsa boya çözeltisi içine alınarak 15 dakika süresince boyanmaları sağlandı. Boyanma süresi sonunda lamalar saf su ile yıkandı, en son PBS'den (Fosfat buffer saline, Sigma) geçirildi ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamalar entellan ile kapatılarak Leica DM6000 B marka mikroskopta incelendi. Hazırlanan preparatlardaki hemosit tipleri Er ve ark. (2010a)'nın yaptıkları çalışmadan yararlanılarak belirlendi. Ayrıca hemosit tiplerinin belirlenebilmesinde faz- kontrast mikroskobundan da yararlanıldı. Yukarıda anlatıldığı şekilde elde edilen hemolenf direkt olarak lam üzerine yayıldı ve Leica DM6000 B marka faz-kontrast özelliği olan mikroskopta incelendi. Her GA₃ dozu ve kontrol grupları için hazırlanan preparatlarda 1000 hücre sayılarak farklı hemosit tiplerinin sayıları belirlendi. Ayrıca hazırlanan bu preparatlarda mitotik indeksin belirlenmesi için mitoz evresindeki hemositler sayıldı ve sonuçlar (%) oranlar olarak değerlendirildi. Deneyler her biri üç larvadan oluşan gruplarda beş kez tekrar edildi.

2.9.3. Apoptotik indeks

Acridine Orange (AO) ve Ethidium Bromide (EB) genel olarak apoptozisin belirlenmesinde kullanılan floresans boyalar olmasına rağmen böcek hemositlerinde apoptotik indekste bu yöntemin kullanılabilmesi Er ve ark. (2010b)'nın yaptığı çalışmada gösterilmiştir. Daha önce yapılan bu çalışmadan yararlanılarak boyalar PBS içinde 100 µg/ml AO (Sigma) ve 100 µg/ml EB (Sigma) derişimlerinde hazırlandı. *G. mellonella* son dönem larva hemolenfi diğer hemosit analizlerindeki gibi mikrokapiller tüple alınarak lam üzerine yayıldı. Yayma preparat üzerine de sırasıyla 100 µg/ml AO ve 100 µg/ml EB çözeltilerinden 5 µl ilave edilerek preparat bekletilmeden Leica DM6000 B marka floresans mikroskopunda mavi ışıkta incelendi. Preparatlarda incelenen hemositler boyanma özelliklerine göre 4 farklı şekilde sınıflandırıldı:

- Canlı hücreler (Yeşil nükleus, stoplazma turuncu veya kırmızı görünebilir).
- Erken apoptozis (Hücre membran bütünlüğü bozulmamıştır, ancak kromatin yoğunlaşması ve fragmentasyonu vardır, nükleus parlak yeşil görünür)
- Geç apoptozis (sekonder nekroz veya apoptotik nekroz da denmektedir. Ethidium Bromide membran bütünlüğü bozulmuş hücrelere girerek nükleusu turuncu renge boyamaktadır. Kromatin yoğunlaşması ve fragmentasyonu vardır).
- Nekroz (Şekil olarak normal olan turuncu nükleus gözlenir) (Cenderoğlu ve ark. 1999; Kosmider ve ark. 2004).

Her GA₃ dozu ve kontrol grubu için hazırlanan preparatlarda yukarıdaki sınıflandırmaya göre 500 hücre sayıldı ve sonuçlar (%) oranlar olarak değerlendirildi. Deneyler her biri 5 larvadan oluşan gruplarda 4 kez tekrarlandı. Ayrıca hazırlanan bu preparatlarda mitotik evredeki hücrelerin sayıları da belirlendi ve mitotik indeks % oranlar olarak değerlendirildi.

2.9.4. Enkapsülasyon ve melanizasyon analizi

Farklı dozlardaki GA₃'ün konak son dönem larva hemositlerinin enkapsülasyon davranışlarına etkilerinin belirlendiği çalışmalarda enkapsülasyon hedefi olarak Sephadex DEAE A-25 (40-120 µm çapta, Sigma) kromatografi boncukları kullanıldı. Boncukların böcek içerisinde bulunmasını kolaylaştırmak amacıyla boncuklar Coomassie mavisi (Brilliant Blue G Sigma) boyandı. Bunun için boncuklar ependorf santrifüj tüpüne alındı ve PBS içinde hazırlanan %1' lik Coomassie mavisi boncuklar üzerine mikropipet yardımıyla ilave edildi. Sephadex A-25 boncukları 1 saat boya çözeltisi içerisinde bekletilerek boyanmaları sağlandı. 1 saat sonunda süpernatant uzaklaştırıldı ve boncuklar üzerine taze PBS eklenerek boncukların yıkanması sağlandı. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Hazırlanan bu boncuk stoğundan 50 µl'lik ve 22 gauge enjektör ucuna sahip Hamilton mikroenjektör (Sigma) yardımıyla içerisinde 15-20 Sephadex A-25 boncuğu bulunan 10 µl PBS çekilerek kontrol ve 50-5000 ppm aralığındaki GA₃ dozlarına maruz bırakılan konak son dönem larvalarına enjekte edildi. Enjeksiyonu takiben 4 ve 24 saat sonra stereomikroskop altında 40'lık büyütmede larvalar disekte edildi. Larvaların tüm vücut bölgeleri incelenerek bulunan boncuklar ince uçlu diseksiyon iğnesi yardımıyla alınıp üzerinde 1 damla PBS bulunan lam üzerine aktarıldı. Lamlar lamel ile kapatılarak mikroskopta incelendi ve hemositlerin enkapsülasyon davranışları belirlendi. Konak larvaları içerisinden disekte edilerek çıkarılan boncuklar ;

- Boncuk enkapsüle olmamış veya üzerinde birkaç hemosit var ise enkapsüle olmamış
- Boncuk üzerinde 4-9 katman hemosit var ise zayıf enkapüle olmuş
- Boncuk üzerinde 10 ve daha fazla hemosit katmanı var ise güçlü enkapsüle olmuş olarak değerlendirildi (Richards ve Dani 2008, Uçkan ve ark. 2010).

Ayrıca böcek içerisinden alınan ve enkapsüle olmuş boncuklar melanize olup olmamalarına göre de değerlendirildi ve melanizasyon yüzdeleri hesaplandı. Tüm GA₃ dozları ve kontrol gruplarını bulunduran deneyler hem 4 saatlik hem de 24 saatlik gözlemler için her biri 5 larvadan oluşan gruplarda 3 kez tekrar edildi.

2.10. İstatistik

GA₃ uygulaması ve kontrol gruplarından elde edilen ortalamalar bir ve üç yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldı. Ortalamalar arası farklar, varyanslar arasındaki homojenlik durumuna göre, Tukey gerçekten anlamlı farklılık (Tukey HSD) veya Tamhane T2 testleri ile belirlendi. Veri analizinde SPSS istatistik programı (SPSS, versiyon 18.0 , SPSS Science, Chicago, IL) kullanıldı. Sonuçlar $P < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

3. BULGULAR

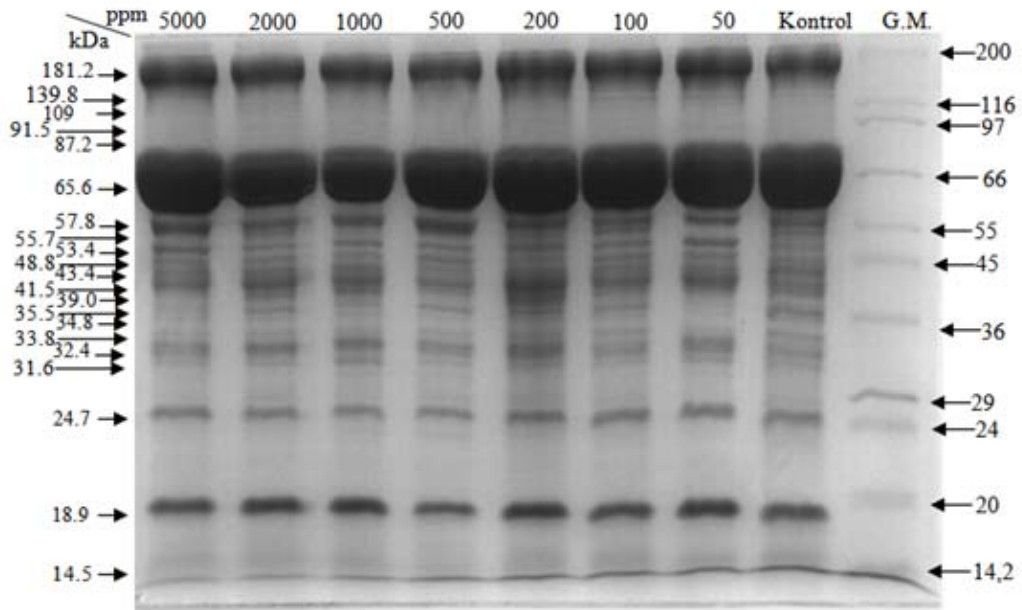
3.1. GA₃'ün Konak Hemolenf Proteinleri Üzerine Etkisi

Farklı dozlardaki (50-5000 ppm) GA₃'ün son evre konak larvalarının hemolenf proteinleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla, hemolenf proteinleri %10'luk SDS-Page jellerde elektroforetik analiz edildi (Şekil 3.1). Jeller üzerindeki protein bantlarının moleküler ağırlıkları belirlendi ve bu proteinlerin densitometrik analizlerine (O.D.) ait değerlerin ortalama ve standart hataları Tablo 3.1'de verilmektedir. Tablo 3.1'de de gösterildiği gibi konak son evre larval hemolenfde 181.2-14.5 kDa aralığında toplam 21 adet protein belirlendi. Bu proteinlerde GA₃ uygulamasına bağlı olarak 91.5, 65.6, 57.8, 53.4, 39.0, 35.5, 34.8, 31.6, 18.9 ve 14.5 kDa'lık proteinlerde önemli kantitatif değişimler görüldü.

GA₃ uygulanmış ve uygulanmamış konak hemolenf proteinlerinden, 91.5 kDa'lık proteinin miktarında 200ppm'lik GA₃ dozunda kontrole kıyasla önemli oranda artış meydana gelirken bu değer 500 ppm'den itibaren doz artışına bağlı olarak tekrar kontrol seviyesine geldiği belirlendi (F= 5.411; df= 7, 16; P<0.05). 91.5 kDa'lık hemolenf proteinlerinde meydana gelen bu değişim 53.4, 35.5, 34.8 ve 31.6 kDa'lık proteinlerde de benzerlik gösterdi. Bu proteinlerden, 57.8 kDa'lık proteinin miktarı 100 ppm'den başlayarak kontrole göre belirgin bir artış gösterdi. Ayrıca aynı proteinin miktarı dozlar arasında da 500 ppm'e kadar önemli değişiklik göstermezken 1000, 2000 ve 5000 ppm'de diğer dozlara göre önemli artış gösterdi (F= 15.288; df= 7, 16; P<0.05). Bir diğer hemolenf proteini olan 53.4 kDa'lık proteinin miktarı da 200 ppm'lik GA₃ dozunda kontrole göre belirgin bir artış gösterdi. Ancak bu artış diğer dozlar arasında hem de kontrole kıyasla düzenlilik göstermedi (F= 4.628; df= 7, 16; P<0.05). 35.5 (F= 16.490; df= 7, 16; P<0.05) ve 34.8 kDa'lık (F= 12.886; df= 7, 16; P<0.05) proteinlerde ise, 200 ve 1000 ppm'lik GA₃ dozlarında kontrole kıyasla belirgin artış olurken bu artışın 2000 ve 5000 ppm'lik deney gruplarında devam etmeyerek tekrar kontrol seviyesine geldiği görüldü. Konak *G. mellonella* son dönem larval hemolenf proteinlerinden 31.6 kDa'lık proteinin miktarı da 200 ppm GA₃ dozundan itibaren

kontrole göre tüm dozlarda belirgin bir artış gösterdi ($F= 10.580$; $df= 7, 16$; $P<0.05$). 18.9 kDa'lık proteinin miktarında ise 100 ppm'den itibaren kontrole oranla anlamlı bir artış meydana geldi ($F= 8.620$; $df= 7, 16$; $P<0.05$).

Konak hemolenf protein profilinde belirlenen 65.6 kDa'lık proteinin miktarında dozlara bağlı bir azalma olmasına rağmen bu azalma sadece 1000, 2000 ve 5000 ppm dozları arasında önemlidir ($F= 15.017$; $df= 7, 16$; $P<0.05$). Ayrıca 14.5 kDa'lık proteinin miktarında da kontrole göre 100 ppm'den itibaren tüm dozlarda bir azalma meydana geldi ($F= 11.252$; $df= 7, 16$; $P<0.05$).



Şekil 3.1. GA_3 'le beslenen konak *G.mellonella* son evre larvalarının hemolenf protein profili. K: kontrol, 50-5000: GA_3 miktarları (ppm), G.M: Geniş moleküler ağırlıklı protein standart (200: Miyozin, 116: β -Galaktosidaz, 97: Fosforilaz b, 66: Laktoferrin, 55: Sığır serum albumin, 45: Glutamik dehidrogenaz, 36: Ovalbumin, 29: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, 24: Karbonik anhidraz, 20: Tripsinojen, 14: Tripsin inhibitor, 6.5: α -laktalbumin, Sigma).

Tablo 3.1. GA₃ uygulamasına bağlı olarak SDS-PAGE jellerindeki protein bantlarının optik densitometrik (O.D.) değerleri.

Dozlar [#]	Bant no (kDa)- O.D. (Ort. ± SH)*					
	GA ₃	181.2	139.8	109	91.5	87.2
Kontrol	0.59±0.12a	0.18±0.03a	0.11±0.01a	0.11±0.01a	0.09±0.02a	0.77±0.05a
50	0.66±0.02a	0.20±0.01a	0.15±0.01a	0.10±0.01a	0.09±0.01a	0.69±0.05a
100	0.60±0.03a	0.19±0.00a	0.18±0.01a	0.11±0.02a	0.10±0.02a	0.70±0.09a
200	0.64±0.04a	0.19±0.04a	0.15±0.03a	0.17±0.00b	0.08±0.01a	0.75±0.06a
500	0.51±0.03a	0.13±0.01a	0.10±0.01a	0.14±0.01ab	0.09± 0.00a	0.71±0.06a
1000	0.61±0.05a	0.24±0.05a	0.17±0.01a	0.13±0.01ab	0.13±0.01a	0.49±0.05b
2000	0.54±0.00a	0.13±0.03a	0.13±0.02a	0.15±0.01ab	0.10± 0.00a	0.46±0.17b
5000	0.60±0.02a	0.17±0.04a	0.13±0.04a	0.14±0.00ab	0.11± 0.01a	0.54±0.06b

Tablo 3.1. (Devam) GA₃ uygulamasına bağlı olarak SDS-PAGE jellerindeki protein bantlarının optik densitometrik (O.D.) değerleri.

Dozlar [#]	Bant no (kDa)- O.D. (Ort. ± SH)*					
	GA ₃	57.8	55.7	53.4	48.8	43.4
Kontrol	0.21±0.03a	0.37±0.06a	0.20± 0.02a	0.22±0.01a	0.22±0.03a	0.21±0.05a
50	0.17±0.02a	0.28±0.05a	0.28±0.01ab	0.25±0.01a	0.26±0.01a	0.28±0.02a
100	0.35±0.01b	0.46±0.05a	0.27±0.01ab	0.27±0.03a	0.26±0.02a	0.28±0.01a
200	0.35±0.02b	0.41±0.04a	0.32± 0.03b	0.26±0.03a	0.32±0.03a	0.36±0.04a
500	0.36±0.03b	0.40±0.05a	0.20± 0.02a	0.24±0.06a	0.21±0.01a	0.32±0.05a
1000	0.49±0.03c	0.45±0.08a	0.30±0.04ab	0.31±0.05a	0.31±0.04a	0.30±0.02a
2000	0.52±0.02c	0.31±0.04a	0.21± 0.03a	0.22±0.02a	0.20±0.04a	0.29±0.02a
5000	0.55±0.04c	0.42±0.06a	0.30±0.00ab	0.28±0.02a	0.28±0.04a	0.27±0.02a

Tablo 3.1. (Devam) GA₃ uygulamasına bağlı olarak SDS-PAGE jellerindeki protein bantlarının optik densitometrik (O.D.) değerleri.

Dozlar [#]	Bant no (kDa)- O.D. (Ort. ± SH)*				
	GA ₃	39.0	35.5	34.8	33.8
Kontrol	0.16±0.02a	0.16±0.01ab	0.11±0.02ab	0.19±0.02a	0.10±0.02a
50	0.20±0.01ab	0.22±0.01bc	0.08±0.01a	0.19±0.01a	0.11±0.00a
100	0.20±0.02ab	0.19±0.03abc	0.17±0.02bc	0.17±0.03a	0.08±0.01a
200	0.39±0.01c	0.31±0.02d	0.24±0.01c	0.18±0.02a	0.12±0.02a
500	0.16±0.04a	0.14±0.01ab	0.08±0.01a	0.19±0.00a	0.11±0.02a
1000	0.28±0.03b	0.26±0.00cd	0.22±0.03c	0.17±0.01a	0.14±0.01a
2000	0.20±0.02ab	0.18±0.01ab	0.13±0.01ab	0.19±0.01a	0.12±0.02a
5000	0.13±0.02a	0.12±0.02a	0.28±0.02a	0.28±0.04a	0.13±0.02a

Tablo 3.1. (Devam) GA₃ uygulamasına bağlı olarak SDS-PAGE jellerindeki protein bantlarının optik densitometrik (O.D.) değerleri.

Dozlar [#]	Bant no (kDa)- O.D. (Ort. ± SH)*			
	GA ₃	31.6	24.7	18.9
Kontrol	0.10±0.01a	0.14±0.00a	0.11± 0.01a	0.14±0.00a
50	0.11±0.02a	0.16±0.01a	0.15± 0.01ab	0.12±0.02ab
100	0.19±0.03abc	0.18±0.02a	0.27± 0.04bc	0.06±0.01b
200	0.22±0.03bc	0.22±0.03a	0.32± 0.05c	0.08±0.00b
500	0.25±0.01bc	0.10±0.01a	0.26± 0.02bc	0.04±0.00b
1000	0.29±0.02c	0.14±0.00a	0.34± 0.02c	0.05±0.00b
2000	0.22±0.01bc	0.09±0.04a	0.29±0.01bc	0.08±0.01b
5000	0.27±0.02bc	0.15±0.01a	0.30± 0.03c	0.08±0.00b

* Her biri 3 farklı jeldeki proteinlerin O.D. değerlerinin ortalamalarını ve standart hatalarını göstermektedir

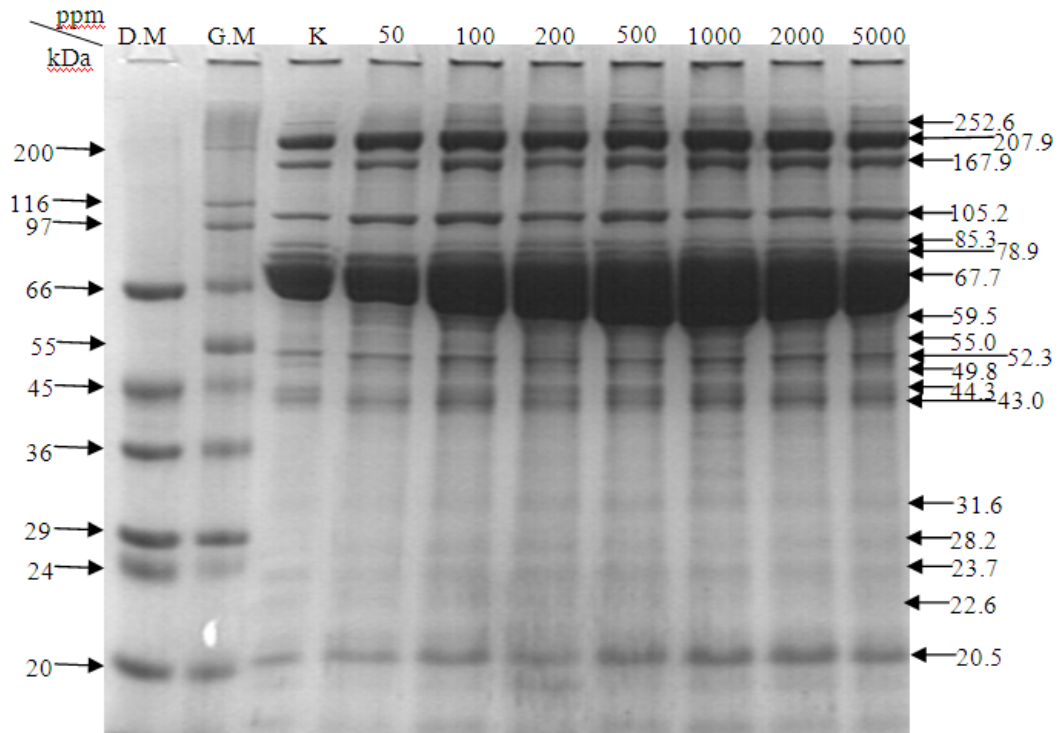
Aynı sütunda (a-d) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05)

3.2. GA₃'ün Parazitoit Hemolenf Proteinleri Üzerine Etkisi

Konak *G. mellonella*'ya uygulanmış farklı dozlardaki (50-5000 ppm) GA₃'ün bu konaklarda yetiştirilen son dönem parazitoit larvalarının hemolenf proteinleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan SDS-PAGE çalışmasında, hemolenf proteinleri %10'luk jellerde elektroforetik olarak analiz edildikten sonra (Şekil 3.2), protein bantlarının moleküler ağırlıkları ve densitometrik analizleri (O.D.) yapıldı. O.D. değerlerinin ortalama ve standart hataları Tablo 3.2'de verilmektedir. Tablo 3.2'de de gösterildiği gibi parazitoit son evre (5. evre) larvalarının hemolenfinde 252.6-20.5 kDa aralığında toplam 18 adet protein belirlendi. GA₃ uygulamasına bağlı olarak 252.6, 207.9, 167.9, 105.2, 59.5, 55.0, 43.0, 31.6, 28.2, 23.7 ve 22.6 kDa'lık proteinlerde önemli kantitatif değişimler görüldü. Ancak hem GA₃ uygulanan hem de uygulanmayan deney gruplarında hemolenfteki protein profilinde kalitatif yönden değişiklik belirlenmedi.

GA₃ uygulanmış ve uygulanmamış konak hemolenf proteinlerinden, 252.6 kDa'lık proteinin miktarında 100, 500, 1000, 2000 ve 5000 ppm'lik GA₃ dozlarında hem kendi aralarında hem de kontrole kıyasla önemli oranda artış meydana gelirken bu değer 500 ppm'de en yüksek değere ulaştığı belirlendi (F= 121.762; df= 7, 16; P<0.05). 207.9 kDa'lık hemolenf proteinin miktarı 50 ppm'de kontrole göre belirgin bir artış gösterirken, bu artış doz artışından 2000 ppm'e kadar etkilenmedi ve 2000 ppm'den itibaren protein miktarı tekrar kontrol seviyesine gelmiştir (F= 5.253; df= 7, 16; P<0.05). 167.9, 105.2 ve 55.0 kDa'lık proteinlerde ise, 50 ppm'lik GA₃ dozunda kontrole kıyasla belirgin artış olurken, bu artışın diğer dozlarda devam etmeyerek tekrar kontrol seviyesine geldiği görüldü (F= 3.813; df= 7, 16; P<0.05, F= 2.750; df= 7, 16; P<0.05, F= 2.958; df=7, 16; P<0.05). Parazitoit *P. turionellae* son dönem larval hemolenf proteinlerinden 59.5 kDa'lık proteinin miktarı da 50, 100 ve 200 ppm GA₃ dozlarında kontrole göre önemli artış gösterirken, 500 ppm'den itibaren protein miktarında doz artışının etkili olmadığı ve protein miktarının tekrar kontrol seviyesine geldiği gözlemlendi (F= 11.129; df= 7, 16; P<0.05). 43.0 kDa'lık proteinin miktarında ise genel olarak kontrole kıyasla 50 ppm'den itibaren artış

meydana geldi ($F= 10.650$; $df= 7, 16$; $P<0.05$). 31.6 kDa'lık proteinin miktarında 100 ppm GA₃ dozundan itibaren doz artışına bağlı olarak azalma belirlendi ($F= 8.037$; $df= 7, 16$; $P<0.05$). Bir diğer hemolenf proteini olan 28.2 kDa'lık proteinin miktarında da benzer değişiklikler olup, kontrole göre tüm dozlarda bir azalma meydana geldi. Ancak bu farklılıklar 100, 500, 1000, 2000 ve 5000 ppm'lik GA₃ dozlarında önemli olarak belirlenirken dozlar arasındaki azalma düzenlilik göstermedi ($F= 36.942$; $df= 7, 16$; $P<0.05$). 23.7 kDa'lık hemolenf proteinin miktarında sadece 100 ppm'lik GA₃ dozunda kontrole kıyasla anlamlı bir azalma meydana gelirken, bu azalma hem diğer dozlar arasında hemde kontrole göre doz artışına bağlı olarak düzenlilik göstermedi ve tekrar kontrol seviyesine geldi ($F= 9.549$; $df=7, 16$; $P<0.05$). 22.6 kDa'lık parazitoit son evre larval proteininin miktarı ise, 50, 100 ve 200 ppm'lik GA₃ dozlarında önemli oranda artış gösterdi. Bu artış 200 ppm'de en yüksek seviyeye ulaşırken, protein miktarı 500 ppm'den itibaren tekrar kontrol seviyesine geldi ve doz artışına bağlı olarak dozlar arasında da değişimler düzenlilik göstermedi ($F= 80.717$; $df=7, 16$; $P<0.05$).



Şekil 3.2. Konak *G. mellonella*'ya uygulanan GA₃'ün parazitoit *P. turionellae* son evre larvalarının hemolenf protein profili. K: kontrol, 50-5000: GA₃ miktarları (ppm), D.M: Düşük moleküler ağırlıklı protein standart (66-14.2 kDa), G.M: Geniş moleküler ağırlıklı protein standart (200-14.2kDa Sigma).

Tablo 3.2. GA₃ uygulamasına bağlı olarak SDS-PAGE jellerindeki protein bantlarının optik densitometrik (O.D) değerleri.

Dozlar [#]	Bant no (kDa)- O.D. (Ort. ± SH)*						
	GA ₃	252.6	207.9	167.9	105.2	85.3	78.9
Kontrol		0.11±0.00a	0.44±0.03a	0.36±0.06a	0.32±0.03a	0.24±0.02a	0.43±0.06a
50		0.12±0.01ab	0.58±0.03b	0.57±0.02b	0.47±0.04b	0.24±0.04a	0.45±0.02a
100		0.14±0.01b	0.56±0.00b	0.43±0.04ab	0.44±0.05ab	0.28±0.04a	0.37±0.01a
200		0.13±0.00ab	0.61±0.03b	0.45±0.05ab	0.42±0.02ab	0.30±0.05a	0.38±0.01a
500		0.31±0.00c	0.56±0.02b	0.43±0.03ab	0.37±0.03ab	0.25±0.02a	0.40±0.02a
1000		0.26±0.01d	0.58±0.02b	0.48±0.01ab	0.40±0.01ab	0.30±0.02a	0.38±0.01a
2000		0.24±0.01de	0.54±0.02ab	0.47±0.04ab	0.39±0.01ab	0.29±0.04a	0.37±0.02a
5000		0.28±0.01e	0.54±0.02ab	0.32±0.03a	0.35±0.02ab	0.26±0.02a	0.37±0.01a

Tablo 3.2. (Devam) GA₃ uygulamasına bağlı olarak SDS-PAGE jellerindeki protein bantlarının optik densitometrik (O.D) değerleri.

Dozlar [#]	Bant no (kDa)- O.D. (Ort. ± SH)*						
	GA ₃	67.7	59.5	55.0	52.3	49.8	44.3
Kontrol		0.70±0.09a	0.36±0.06a	0.30±0.03ab	0.28±0.02a	0.27±0.01a	0.23±0.01a
50		0.82±0.14a	0.63±0.05cd	0.37±0.01b	0.36±0.02a	0.20±0.04a	0.29±0.03a
100		0.80±0.13a	0.60±0.04bcd	0.30±0.05ab	0.34±0.03a	0.20±0.00a	0.20±0.01a
200		0.81±0.13a	0.67±0.02d	0.25±0.02ab	0.35±0.03a	0.25±0.02a	0.29±0.05a
500		0.80±0.14a	0.31±0.00a	0.27±0.02ab	0.31±0.00a	0.27±0.04a	0.24±0.03a
1000		0.86±0.12a	0.44±0.02abc	0.31±0.01ab	0.35±0.02a	0.29±0.03a	0.27±0.02a
2000		0.79±0.15a	0.40±0.09ab	0.28±0.02ab	0.34±0.03a	0.26±0.03a	0.27±0.04a
5000		0.75±0.13a	0.28±0.04a	0.22±0.01a	0.27±0.01a	0.18±0.04a	0.17±0.01a

Tablo 3.2. (Devam) GA₃ uygulamasına bağlı olarak SDS-PAGE jellerindeki protein bantlarının optik densitometrik (O.D) değerleri.

Dozlar [#]	Bant no (kDa)- O.D. (Ort. ± SH)*						
	GA ₃	43.0	31.6	28.2	23.7	22.6	20.5
Kontrol		0.15±0.02a	0.09±0.03ab	0.10±0.00a	0.09±0.00a	0.02±0.00ab	0.21±0.06a
50		0.35±0.01b	0.12±0.02a	0.06±0.01abc	0.05±0.01ab	0.03±0.00cd	0.24±0.04a
100		0.26±0.03c	0.06±0.01bc	0.05±0.00b	0.06±0.00b	0.06±0.00cd	0.20±0.04a
200		0.26±0.02c	0.07±0.01bc	0.07±0.00a	0.08±0.00ab	0.08±0.00de	0.22±0.06a
500		0.21±0.01bc	0.07±0.01bc	0.06±0.00b	0.08±0.01ab	0.04±0.00ac	0.17±0.02a
1000		0.27±0.00bc	0.07±0.02bc	0.04±0.00b	0.05±0.01ab	0.03±0.00ad	0.17±0.02a
2000		0.25±0.02c	0.04±0.00c	0.03±0.00c	0.05±0.01ab	0.02±0.00ac	0.19±0.02a
5000		0.22±0.01bc	0.04±0.01c	0.05±0.00b	0.04±0.00ab	0.02±0.00bce	0.15±0.01a

* Her biri 3 farklı jeldeki proteinlerin O.D. değerlerinin ortalamalarını ve standart hatalarını göstermektedir.

Aynı sütunda (a-e) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

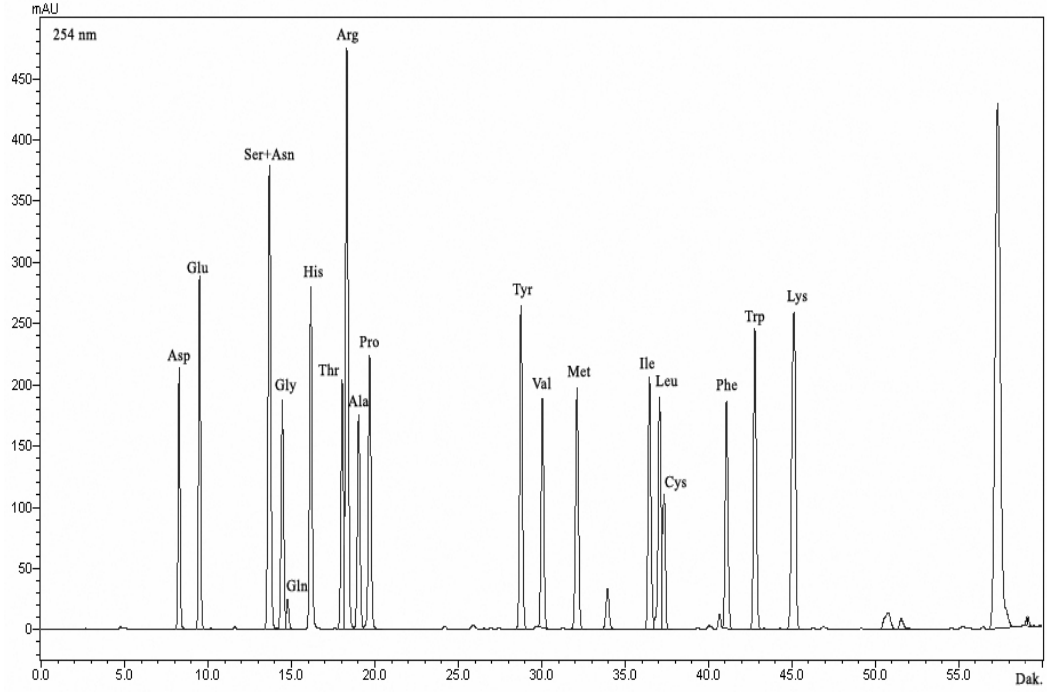
3.3. GA₃'ün Konak ve Parazitoit Hemolenf Serbest Aminoasitlerine Etkisi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanarak yapılan serbest amino asit çalışmalarında öncelikle *G. mellonella* ve *P. turionellae*'nin hemolenf serbest amino asit içerikleri, standartlara ait piklerin (Şekil 3.3) alıkonma zamanları (Tablo 3.3) ile karşılaştırılarak belirlendi. Şekil 3.4'de görüldüğü gibi konak *G. mellonella*'nın son dönem larvalarının hemolenf serbest aminoasit içeriğinde toplam 18 aminoasit belirlendi. Larval hemolenfte, aspartik asit ve sistein hem kontrol gruplarında hem de deney gruplarında belirlenemedi. Parazitoit *P. turionellae*'nin son evre larvalarında ise sistein aminoasidi haricinde diğer 19 aminoasit tespit edildi (Şekil 3.5). Şekil 3.4 ve 3.5'de de görüldüğü gibi hem konak hemde parazitoit hemolenfindeki amino asit bileşiminin kontrol grubuna göre tüm deney gruplarında da değişiklik göstermediği görüldü. Hemolenfteki bazı serbest aminoasitlerin miktarlarının doza bağlı olarak değişiklik gösterdikleri hem % alan değişimleri hem de miktar analizleri ile gösterildi. Her bir amino asidin kalibrasyon grafiklerindeki yeriyle ilgili kalibrasyon eşitlikleri Tablo 3.3'de verilmektedir. Standart konsantrasyonu

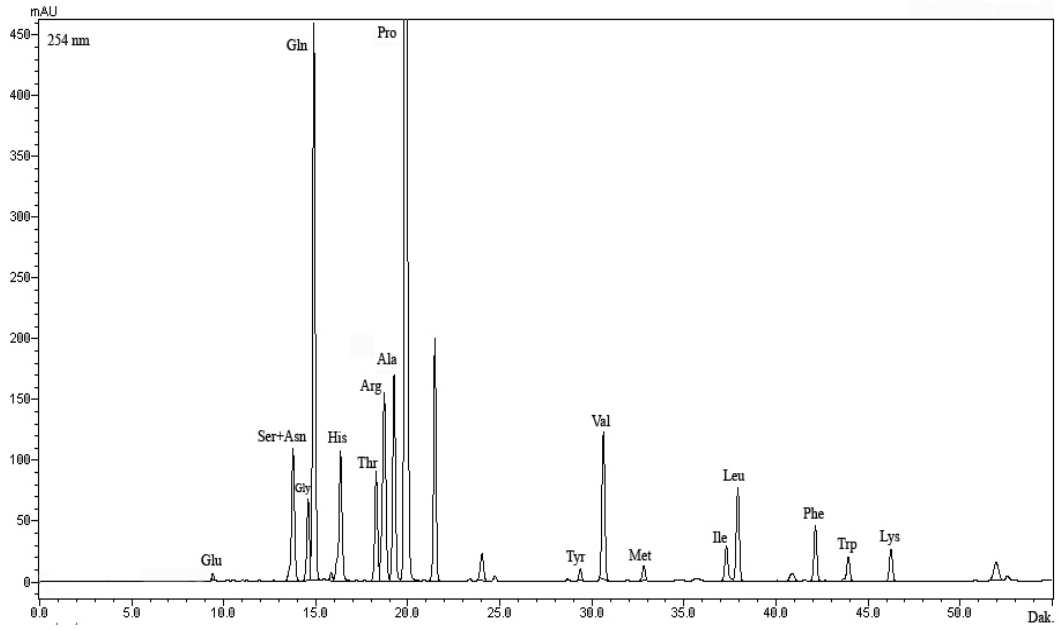
ile alanları arasındaki ilişki tüm amino asitlerde lineerdir ve determinasyon katsayıları 0.99 değerine yakın bulundu.

Tablo 3.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi'nde aminoasit standartlarına ait piklerin alıkonma zamanları ve kalibrasyon eşitlikleri.

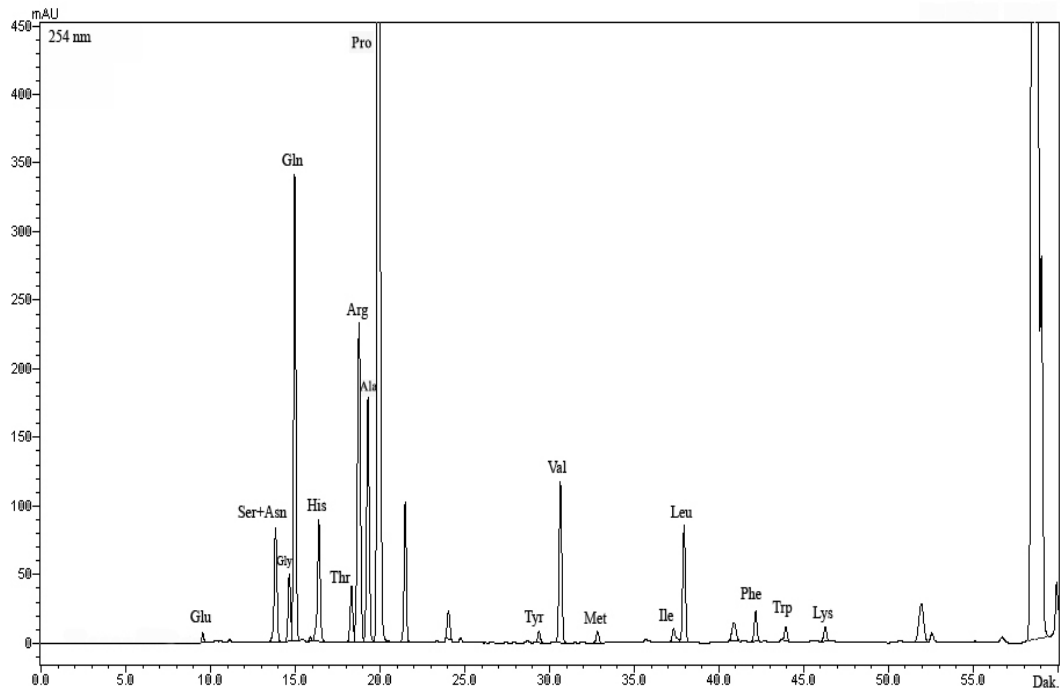
Serbest Aminoasit	Kalibrasyon eşitliği	R ²	Alıkonma zamanı (dk)
Aspartik asit (ASP)	$y=0.0004x-4.9218$	0.9988	8.262
Glutamik asit (GLU)	$y= 0.0003x-10.452$	0.9983	9.489
Asparajin (ASN)	$y=0.0001x-8.3554$	0.9988	13.680
Serin (SER)	$y= 0.0002x-6.6476$	0.9988	13.680
Glisin (GLY)	$y=0.0002x+1.3529$	0.9967	14.449
Glutamin (GLN)	$y=0.0029x-4.7501$	0.9997	14.773
Histidin (HİS)	$y=0.0003x+6.5182$	0.9991	16.929
Treonin (THR)	$y=0.0002x-0.1389$	0.9989	18.037
Arginin (ARG)	$y=0.0001x-8.1749$	0.9991	18.311
Alanin (ALA)	$y=0.0002x-3.0927$	0.9993	19.025
Prolin (PRO)	$y=0.0002x-13.621$	0.9989	19.684
Tirozin (TYR)	$y=0.0002x+7.7501$	0.9983	28.753
Valin (VAL)	$y=0.0002x-9.3375$	0.9986	30.036
Metiyonin (MET)	$y=0.0013x-13.948$	0.9985	32.109
İzolösin (ILE)	$y=0.0002x-9.5084$	0.9978	36.453
Lösin (LEU)	$y=0.0002x+14.481$	0.999	37.060
Sistein (CYS)	$y=0.0003x-12.381$	0.9983	37.332
Fenilalanin (PHE)	$y=0.0003x-6.9075$	0.9991	41.070
Triptofan (TRP)	$y=0.0003x-8.0466$	0.9991	42.769
Lizin (LYS)	$y=0.0002x-6.3692$	0.9983	45.117



Şekil 3.3. Amino asit standart karışımının HPLC kromatogramı, her bir aminoasit 2×10^{-5} mmol konsantrasyondadır. Asp: Aspartik asit, Glu: Glutamik asit, Ser: Serin, Asn: Asparajin, Gly: Glisin, Gln: Glutamin, His: Histidin, Thr: Treonin, Arg: Arginin, Ala: Alanin, Pro: Prolin, Tyr: Tirozin, Val: Valin, Met: Metionin, Ile: İzolösin, Leu: Lösin, Cys: Sistein, Phe: Fenilalanin, Trp: Triptofan, Lys: Lizin.

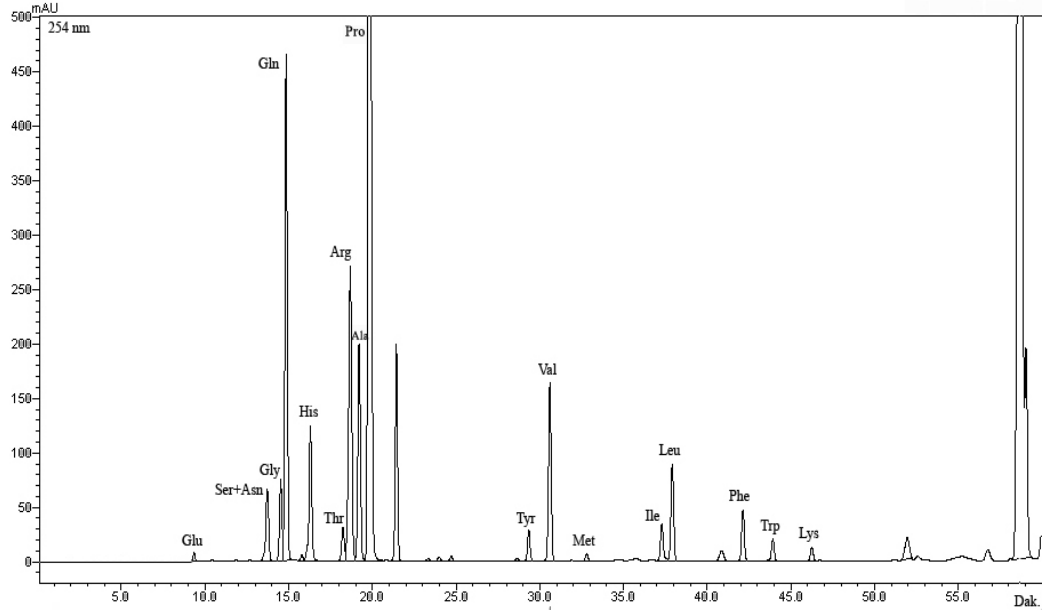


(a)

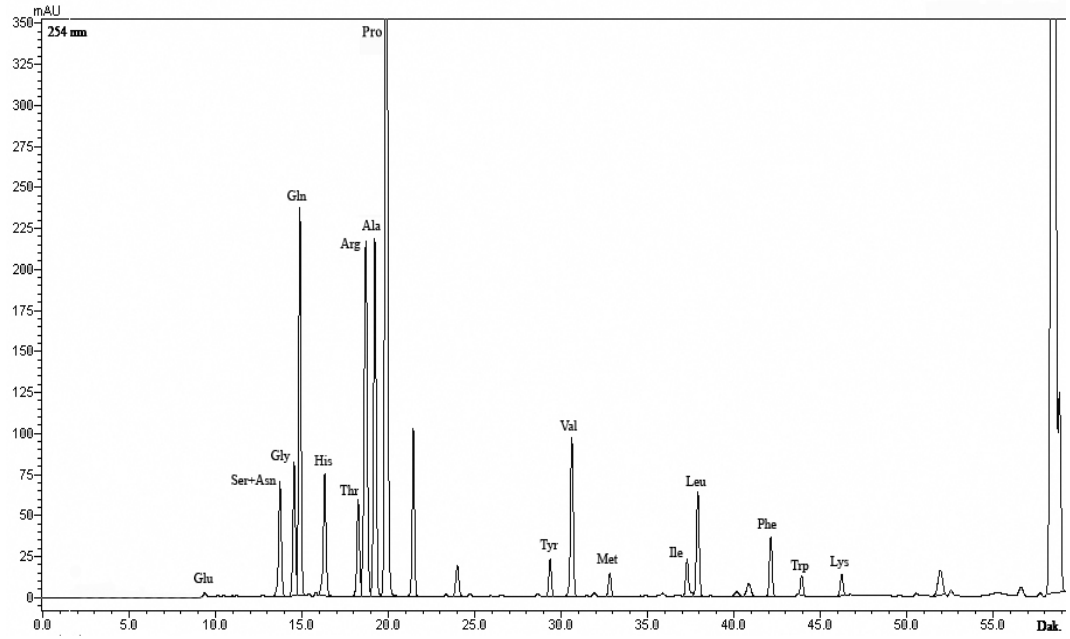


(b)

Şekil 3.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nde *G. mellonella* son evre larval hemolenfinin serbest amino asit içeriği, (a) GA₃ uygulanmamış (b) 50 ppm GA₃ (c) 100 ppm GA₃ (d) 200 ppm GA₃ (e) 500 ppm GA₃ (f) 1000 ppm GA₃ (g) 2000 ppm GA₃ (h) 5000 ppm GA₃ uygulanmış hemolenf serbest amino asit kromatografisi.

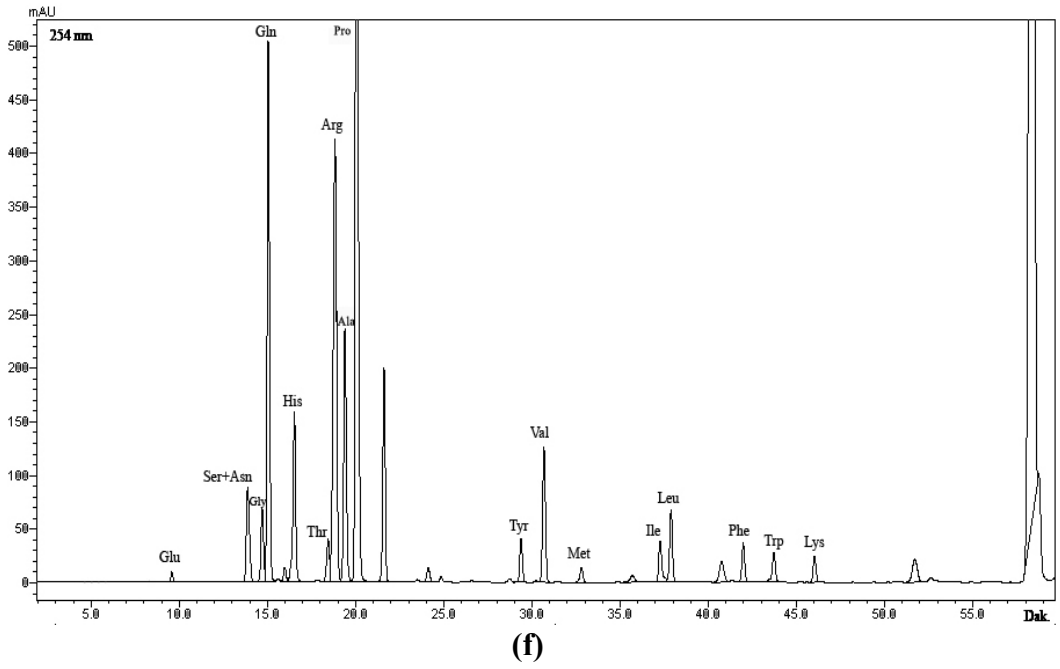
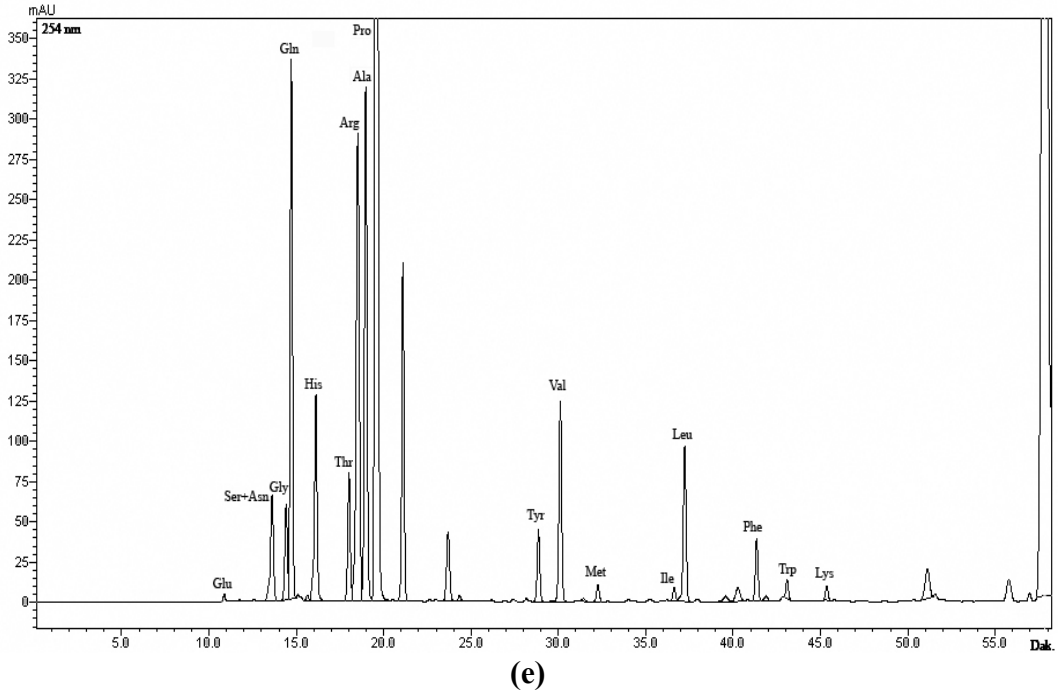


(c)

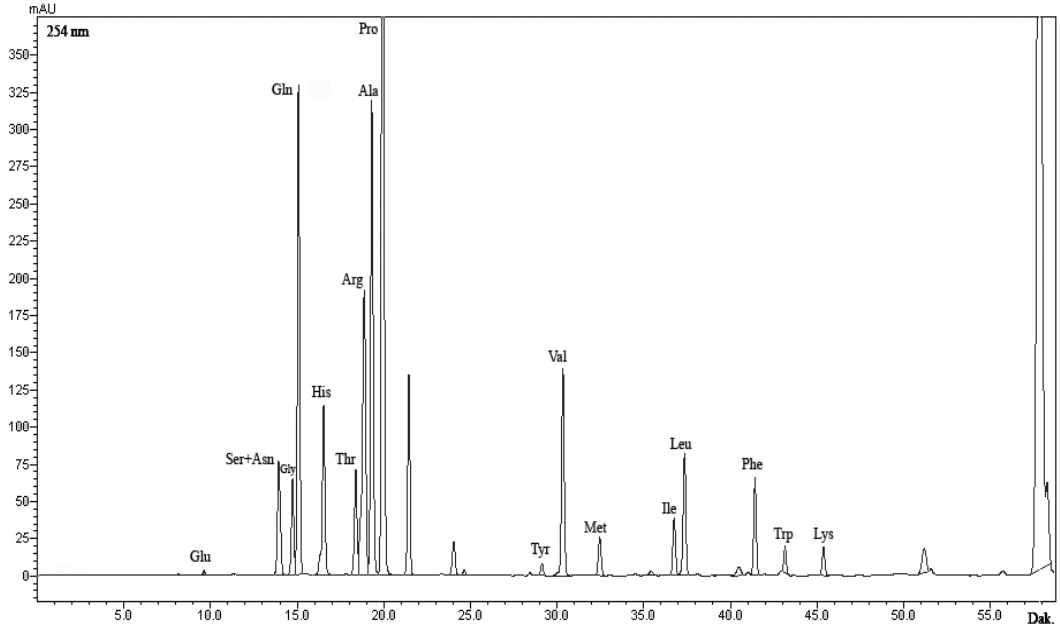


(d)

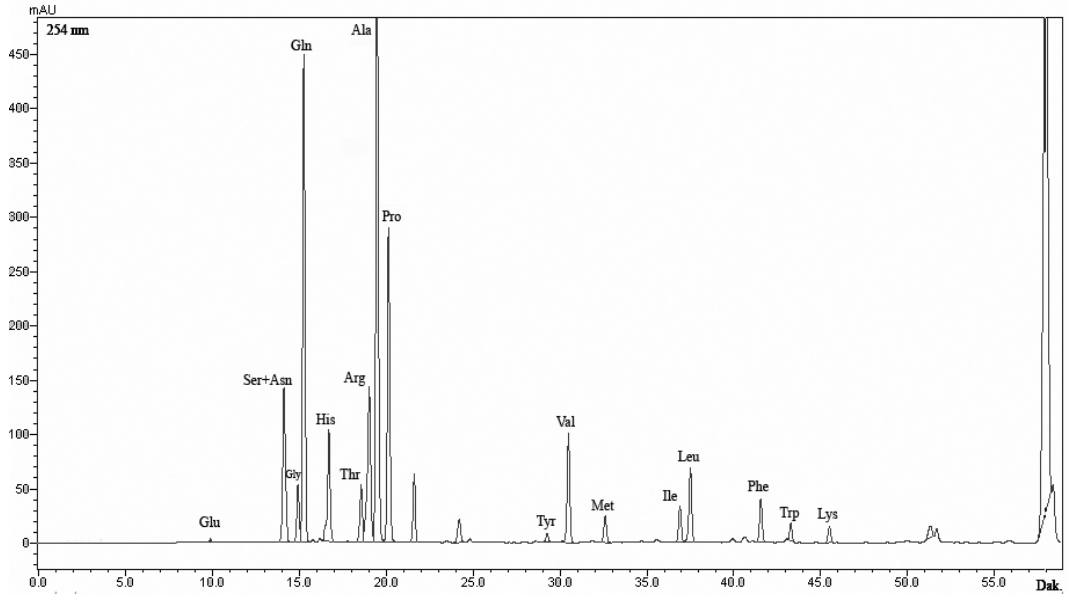
Şekil 3.4. (Devam) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nde *G. mellonella* son evre larval hemolenfinin serbest amino asit içeriği, (a) GA₃ uygulanmamış (b) 50 ppm GA₃ (c) 100 ppm GA₃ (d) 200 ppm GA₃ (e) 500 ppm GA₃ (f) 1000 ppm GA₃ (g) 2000 ppm GA₃ (h) 5000 ppm GA₃ uygulanmış hemolenf serbest amino asit kromatografisi.



Şekil 3.4. (Devam) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nde *G. mellonella* son evre larval hemolenfinin serbest amino asit içeriği, (a) GA₃ uygulanmamış (b) 50 ppm GA₃ (c) 100 ppm GA₃ (d) 200 ppm GA₃ (e) 500 ppm GA₃ (f) 1000 ppm GA₃ (g) 2000 ppm GA₃ (h) 5000 ppm GA₃ uygulanmış hemolenf serbest amino asit kromatografisi.

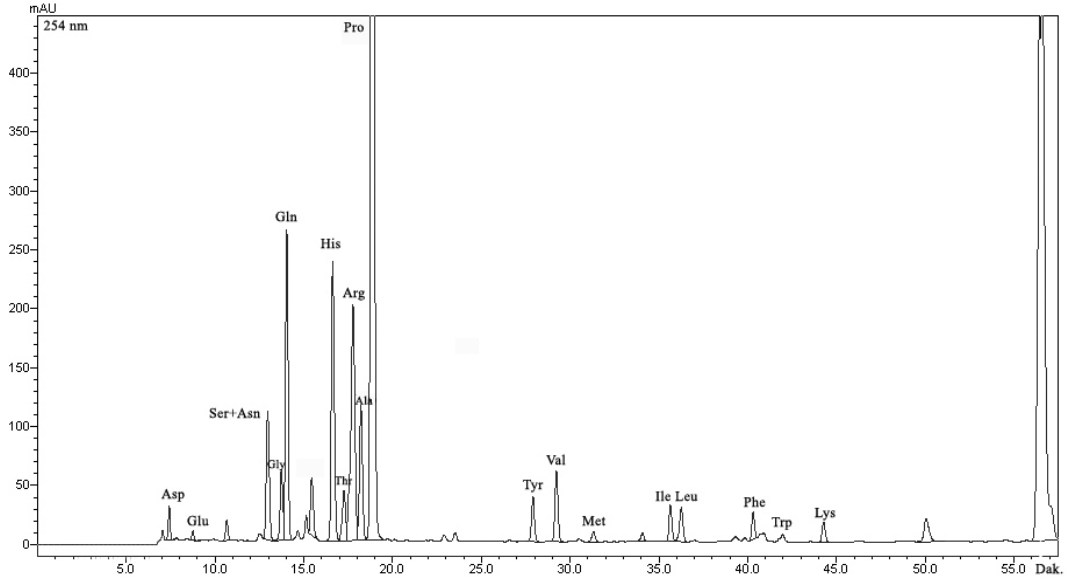


(g)

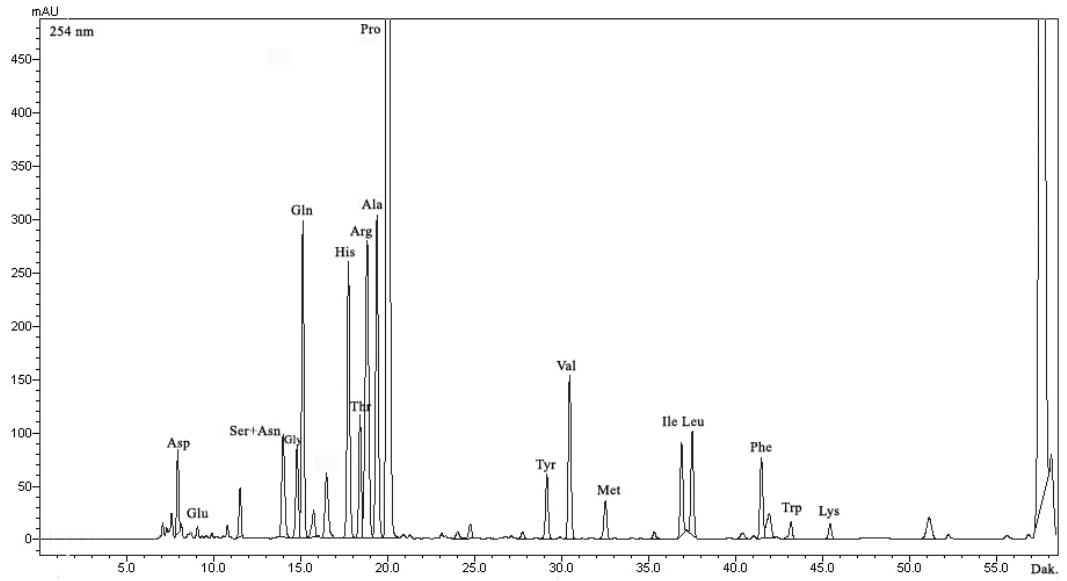


(h)

Şekil 3.4. (Devam) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nde *G. mellonella* son evre larval hemolenfinin serbest amino asit içeriği, (a) GA₃ uygulanmamış (b) 50 ppm GA₃ (c) 100 ppm GA₃ (d) 200 ppm GA₃ (e) 500 ppm GA₃ (f) 1000 ppm GA₃ (g) 2000 ppm GA₃ (h) 5000 ppm GA₃ uygulanmış hemolenf serbest amino asit kromatografisi.

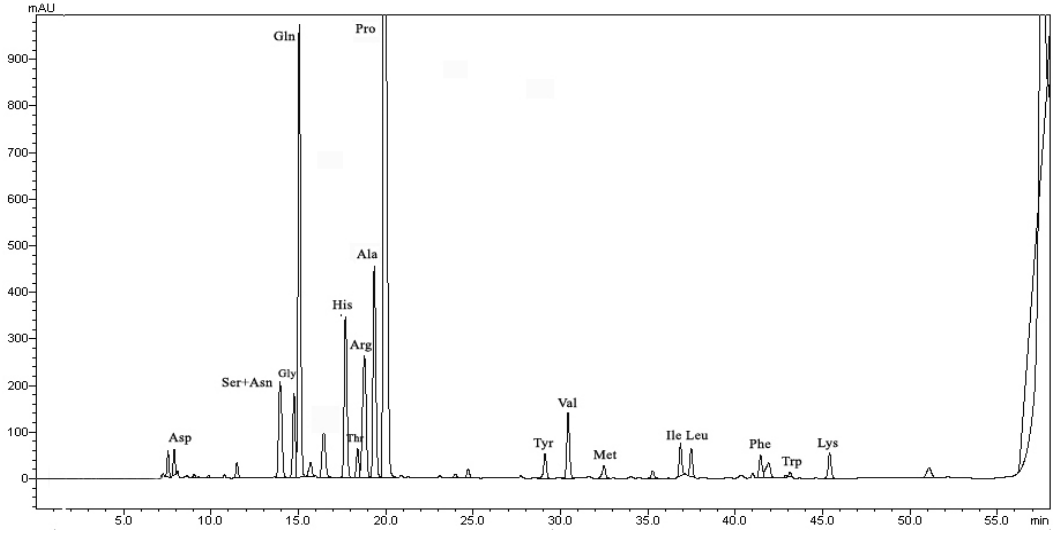


(a)

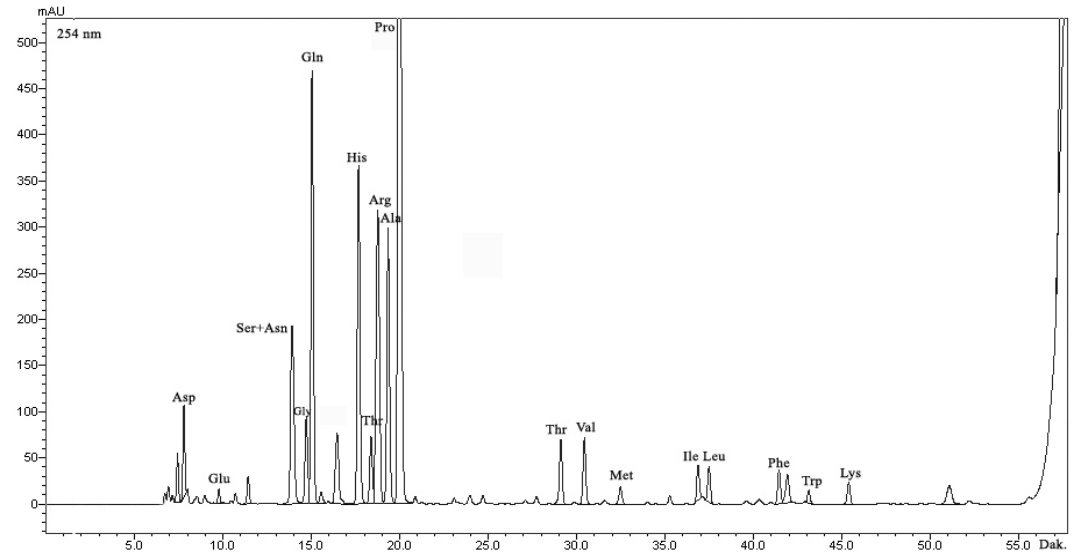


(b)

Şekil 3.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nde *P.turionellae* hemolenfinin serbest amino asit içeriği, (a) GA₃ uygulanmamış (b) 50 ppm GA₃ (c) 100 ppm GA₃ (d) 200 ppm GA₃ (e) 500 ppm GA₃ (f) 1000 ppm GA₃ (g) 2000 ppm GA₃ (h) 5000 ppm GA₃ uygulanmış hemolenf serbest amino asit kromatografisi.

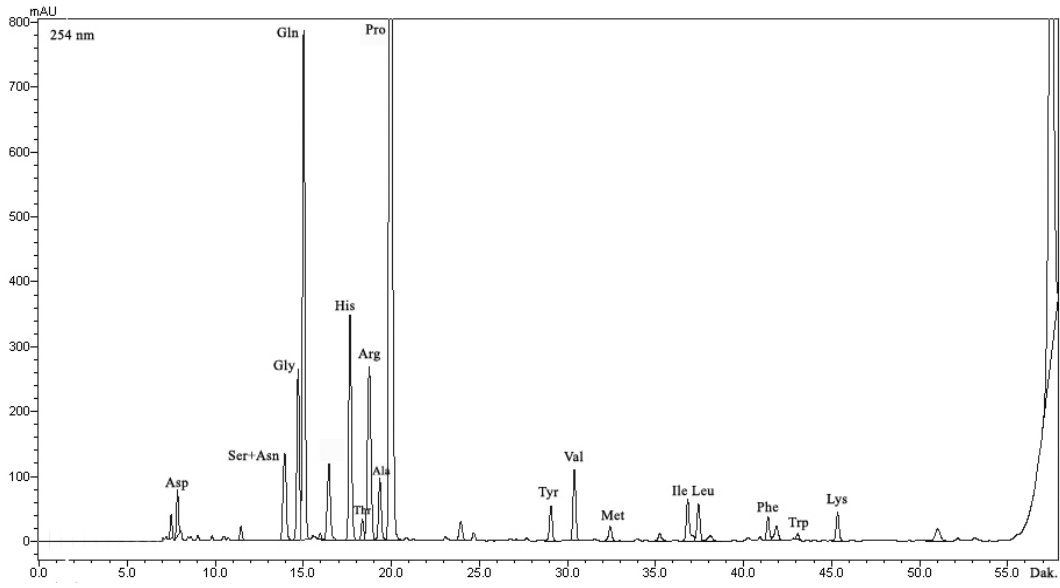


(c)

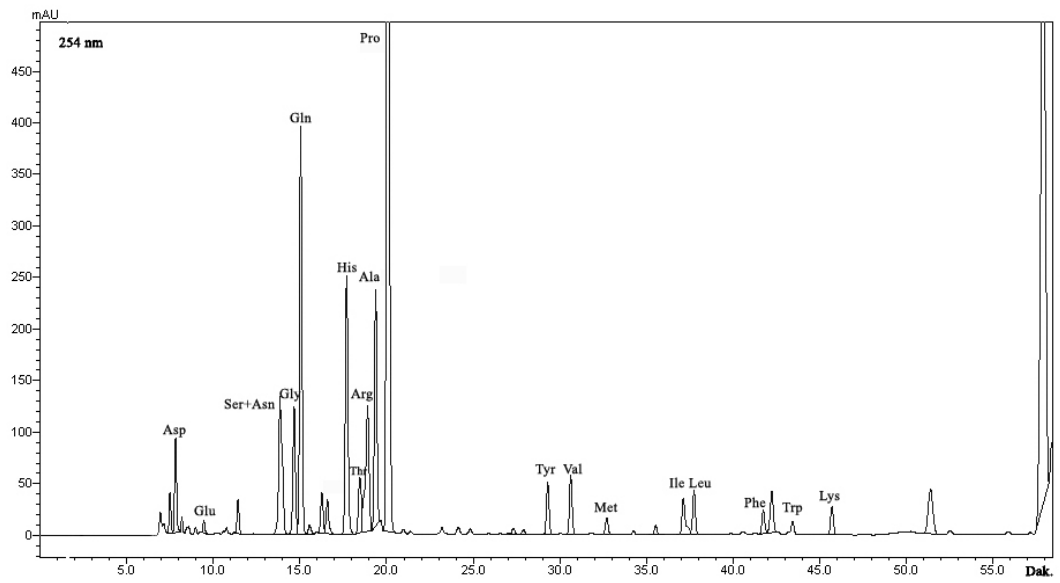


(d)

Şekil 3.5. (Devam) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nde *P.turionellae* hemolenfinin serbest amino asit içeriği, (a) GA₃ uygulanmamış (b) 50 ppm GA₃ (c) 100 ppm GA₃ (d) 200 ppm GA₃ (e) 500 ppm GA₃ (f) 1000 ppm GA₃ (g) 2000 ppm GA₃ (h) 5000 ppm GA₃ uygulanmış hemolenf serbest amino asit kromatografisi.

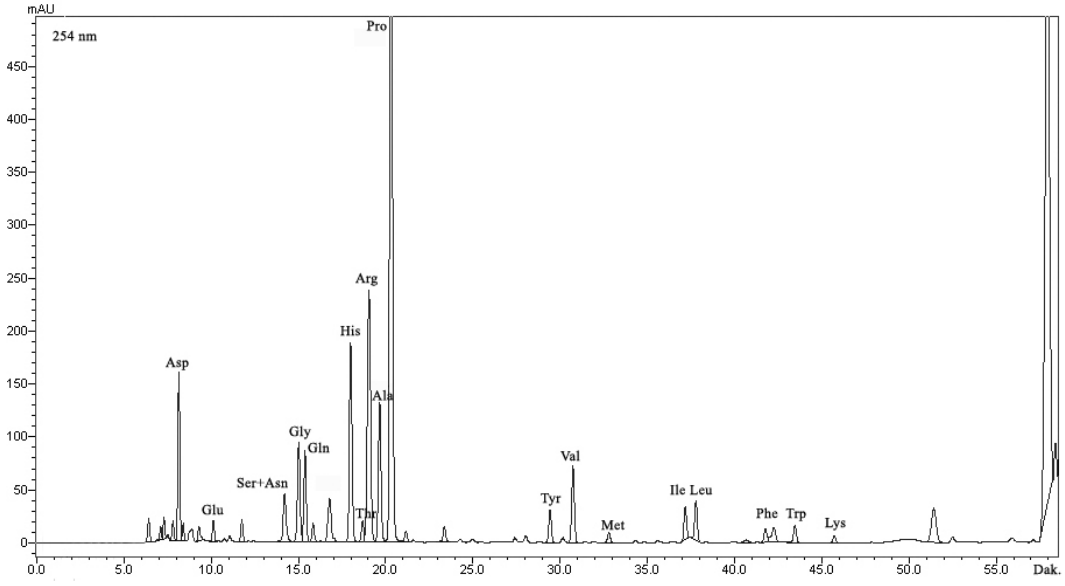


(e)

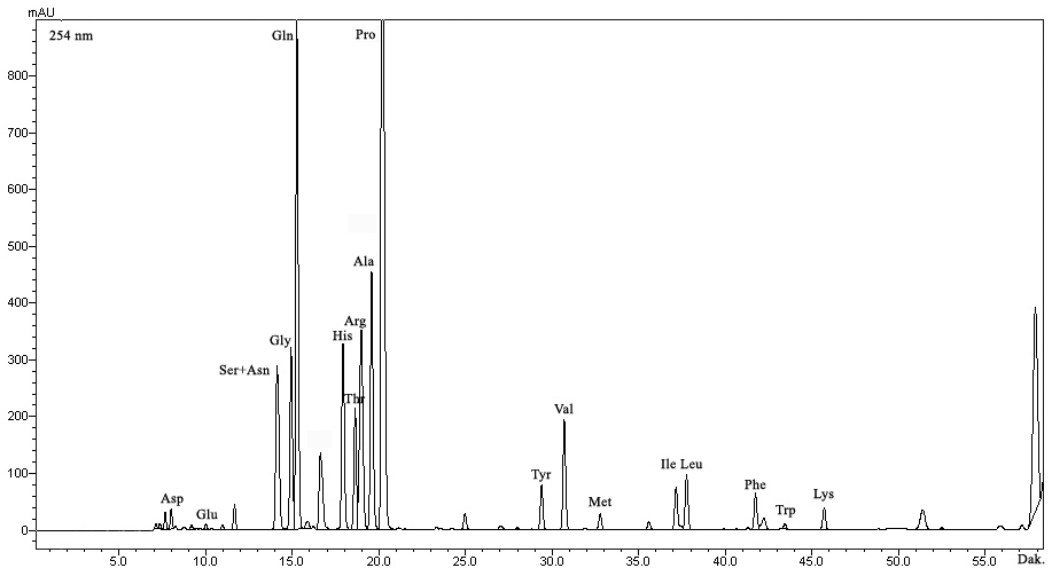


(f)

Şekil 3.5. (Devam) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nde *P.turionellae* hemolenfinin serbest amino asit içeriği, (a) GA₃ uygulanmamış (b) 50 ppm GA₃ (c) 100 ppm GA₃ (d) 200 ppm GA₃ (e) 500 ppm GA₃ (f) 1000 ppm GA₃ (g) 2000 ppm GA₃ (h) 5000 ppm GA₃ uygulanmış hemolenf serbest amino asit kromatografisi.



(g)



(h)

Şekil 3.5. (Devam) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nde *P.turionellae* hemolenfinin serbest amino asit içeriği, (a) GA₃ uygulanmamış (b) 50 ppm GA₃ (c) 100 ppm GA₃ (d) 200 ppm GA₃ (e) 500 ppm GA₃ (f) 1000 ppm GA₃ (g) 2000 ppm GA₃ (h) 5000 ppm GA₃ uygulanmış hemolenf serbest amino asit kromatografisi.

3.3.1. Konak hemolenf serbest aminoasit değişimi

Konak *G. mellonella* son dönem larval serbest aminoasit içeriğinin yüksek performanslı sıvı kromatografisindeki % alanlarının doza bağlı değişimleri Tablo 3.4'de verilmektedir. *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde prolinin diğer amino asitlere göre yüksek seviyede bulunduğu hem % alan hem de kantitatif analizlerle (Tablo 3.5) belirlendi. Glutamin, histidin, treonin, arjinin, tirozin, izolösin ve lösinin % alan değişimlerinin GA₃ uygulmasından etkilenmedikleri (P>0.05) belirlenirken, diğer amino asitlerin % alanları kontrol grubuna ve dozlara göre farklı oranlarda değişiklikler gösterdi (P<0.05, Tablo 3.4). Ayrıca *G. mellonella* larva evresinde hemolenf serbest amino asitlerinin miktarları ve GA₃ uygulamasına bağlı miktar (ng/µl) değişimleri de Tablo 3.5'te verilmektedir. Standart kalibrasyon eğrisinden elde edilen bu verilere göre her hangi bir işleme maruz kalmamış larvaların hemolenfinde glutamin aminoasidinin 397.22 ng/µl, prolinin ise 70.83 ng/µl oldukları ve hemolenfteki diğer aminoasitlere göre çok yüksek miktarda buldukları belirlendi. Farklı dozlarda GA₃ uygulmasından, glutamin, arjinin ve valin aminoasitlerinin etkilenmediği belirlendi (P>0.05). Diğer aminoasitlerden serin, asparajin, glisin, izolösin, lösin ve fenilalaninin miktarları sadece dozlar arasında değişiklikler gösterdi. Histidin, treonin, alanin, prolin, tirozin, metionin, triptofan ve lizin aminoasitlerinin miktarlarında ise hem kontrole hem de dozlara göre önemli değişikler görüldü (P<0.05, Tablo 3.12)

Tablo 3.4. GA₃ uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin pik yüzde alanları (%) ve doza bağlı değişimleri.

Dozlar [#]	O.D. (Ort. ± SH)*							
	GA ₃ (ppm)	Glu	Ser (Asn)	Gly	Gln	His	Thr	Arg
Kontrol		0.15±0.00abc	4.57±0.3a	2.05±0.23ab	14.44±1.17a	3.70±0.63ab	1.81±0.29ab	8.53±0.75a
50		0.19±0.01be	3.66±0.03a	1.98±0.07a	12.77±0.30a	3.66±0.11ab	1.91±0.16ab	9.76±1.05a
100		0.12±0.00acd	2.85±0.40a	2.03±0.17ab	12.61±0.32a	3.47±0.35ab	1.15±0.14ab	8.02±1.00a
200		0.16±0.02bce	4.13±0.42a	3.04±0.29c	17.06±0.79a	3.77±0.14ab	2.18±0.40ab	8.83±1.75a
500		0.12±0.01acd	3.96±0.77a	2.70±0.09abc	12.55±1.35a	3.84±0.31ab	2.69±0.05a	11.18±1.28a
1000		0.21±0.01e	2.95±0.18a	2.35±0.13abc	13.16±1.13a	5.51±0.24b	1.34±0.03b	9.98±1.24a
2000		0.16±0.01bce	3.82±0.35a	2.59±0.04abc	17.39±2.39a	4.93±0.35ab	2.85±0.21ab	9.01±1.04a
5000		0.11±0.01ad	7.19±0.17b	3.02±0.36bc	18.58±0.81a	5.31±0.58b	2.52±0.15ab	9.19±0.24a

Tablo 3.4. (Devam) GA₃ uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin pik yüzde alanları (%) ve doza bağlı değişimleri.

Dozlar [#]	O.D. (Ort. ± SH)*						
	Ala	Pro	?	Tyr	Val	Met	Ile
Kontrol	6.41±0.49a	37.43±1.99ab	6.61±0.45abc	0.46±0.02a	4.69±0.09ab	0.39±0.03a	1.04±0.12abcd
50	6.71±0.49a	44.39±1.68b	6.91±0.17a	0.35±0.02a	4.89±0.15b	0.33±0.02ab	0.22±0.03ac
100	6.30±0.47a	46.68±1.12a	5.44±0.01ab	0.85±0.06a	4.01±0.14a	0.24±0.02b	1.18±0.07b
200	7.29±1.41a	37.90±4.08ab	3.42±0.33abc	1.09±0.11a	4.43±0.13ab	0.35±0.02ab	1.06±0.18abcd
500	12.17±0.74b	31.47±2.68ac	6.70±0.21b	1.11±0.26a	4.90±0.16ab	0.40±0.02a	0.33±0.03a
1000	12.35±0.38b	29.75±0.69ac	5.64±0.14ab	1.08±0.20a	4.91±0.24ab	0.75±0.07c	1.53±0.05bd
2000	12.36±1.70b	25.53±0.22c	4.98±0.09abc	0.34±0.07a	5.96±0.25c	0.71±0.02c	1.22±0.23abcd
5000	23.75±0.76c	11.920±1.09d	2.90±0.16c	1.36±1.02a	5.99±0.17c	0.87±0.08c	1.47±0.06bd

Tablo 3.4. (Devam) GA₃ uygulamasına bağı olarak *G. mellonella* larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin pik yüzde alanları (%) ve doza bağı değişimleri.

Dozlar [#]	O.D. (Ort. ± SH)*				
	GA ₃ (ppm)	Leu	Phe	Trp	Lys
Kontrol		3.27±0.02a	2.39±0.28ab	0.93±0.04a	1.10±0.03a
50		3.64±0.15a	0.85±0.06a	0.40±0.02b	0.39±0.04b
100		2.78±0.14a	1.35±0.21ab	0.74±0.02a	0.44±0.01bc
200		2.79±0.19a	1.47±0.13ab	0.46±0.06b	0.56±0.05c
500		3.85±0.17a	1.46±0.10ab	0.40±0.02b	0.56±0.04c
1000		3.37±0.06a	1.38±0.02ab	1.27±0.13c	0.77±0.06d
2000		4.32±0.57a	2.17±0.37ab	0.77±0.03a	0.78±0.01d
5000		3.58±0.16a	1.81±0.08b	0.78±0.05a	0.76±0.02d

[#] Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

* Her amino asit pik alanı yüzdesi için aynı sütunda (a-d) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

Tablo 3.5. GA₃ uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin miktarları (ng/μl).

Dozlar [#]	Aminoasit miktarı (ng/ul Ort. ± SH)*							
	GA ₃ (ppm)	Ser	Asn	Gly	Gln	His	Thr	Arg
Kontrol		4.10±0.14ab	4.05±0.14ab	4.56±0.38ab	397.22±33.57a	10.53±1.73a	3.40±0.44ab	7.82±0.72a
50		2.96±0.09a	2.90±0.09a	4.36±0.08a	321.63±14.42a	9.55±0.28a	3.32±0.35ab	8.20±0.93a
100		2.92±0.44a	2.87±0.44a	4.53±0.39ab	404.06±20.42a	10.91±1.51a	2.53±0.32a	8.64±1.37a
200		3.46±0.63ab	3.40±0.63ab	5.31±0.13b	432.04±15.04a	10.03±1.19a	3.71±0.44abc	7.46±0.47a
500		3.55±0.63ab	3.49±0.64ab	5.25±0.06b	348.38±27.85a	11.18±1.29a	5.18±0.13c	10.53±1.35a
1000		2.82±0.32a	2.76±0.32a	4.85±0.08b	394.13±49.95a	16.90±0.27b	2.75±0.15a	8.05±0.83a
2000		3.02±0.31a	2.97±0.31a	4.44±0.11ab	432.03±70.66a	12.56±0.79ab	4.82±0.32bc	7.34±0.70a
5000		4.98±0.08b	4.92±0.08b	4.40±0.46ab	389.36±12.92a	11.49±1.08ab	3.64±0.18ab	6.38±0.20a

Tablo 3.5. (Devam) GA₃ uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin miktarları (ng/μl).

Dozlar [#]	Aminoasit miktarı (ng/ul Ort. ± SH)*						
	Ala	Pro	Tyr	Val	Met	Ile	Tyr
Kontrol	12.01±1.08a	70.83±6.17a	1.12±0.02a	8.58±0.13a	0.65±0.05a	1.64±0.19abc	6.70±0.23ab
50	11.55±1.67a	76.58±2.83a	0.87±0.02b	8.17±0.09a	0.40±0.05a	0.07±0.04ab	6.79±0.14ab
100	13.83±2.09ab	102.46±0.75a	2.13±0.12ab	8.51±0.08a	0.34±0.05a	2.28±0.13ac	6.50±0.37ab
200	12.59±3.75a	67.08±11.44ab	2.16±0.17ab	7.47±0.55a	0.46±0.03a	1.50±0.20abc	5.34±0.04ab
500	23.29±1.28c	60.57±7.32ab	2.42±0.57ab	8.73±0.13a	0.70±0.02ab	0.32±0.06b	7.89±0.12b
1000	26.95±0.37c	60.69±4.26abc	2.46±0.40ab	7.74±0.79a	1.51±0.13ab	2.81±0.04c	5.34±0.21a
2000	20.81±4.64bc	42.94±1.53b	0.85±0.13ab	9.81±0.41a	1.34±0.06b	1.74±0.30abc	7.87±1.14ab
5000	34.29±2.74d	16.85±1.82c	2.25±1.47ab	7.77±0.18a	1.43±0.17b	1.80±0.12abc	5.67±0.15a

Tablo 3.5. (Devam) GA₃ uygulamasına bağı olarak *G. mellonella* larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin miktarları (ng/μl).

Dozlar [#] GA ₃ (ppm)	Aminoasit miktarı (ng/ul Ort. ± SH)*		
	Phe	Trp	Lys
Kontrol	6.59±0.86ab	2.39±0.09a	1.88±0.02a
50	1.97±0.15a	0.77±0.08b	0.47±0.06b
100	4.24±0.68ab	2.18±0.03ad	0.76±0.01bc
200	3.60±0.16b	0.94±0.05bc	0.76±0.01bc
500	3.99±0.23ab	0.89±0.01b	0.49±0.06b
1000	3.39±0.19ab	3.62±0.33e	1.38±0.14abc
2000	5.24±0.74ab	1.69±0.13cd	1.38±0.06abc
5000	3.69±0.16b	1.41±0.09bc	1.39±0.01abc

Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

* Her amino asit miktarı için aynı sütunda (a-e) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

3.3.2. Parazitoit hemolenf serbest aminoasit değişimi

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi'nde *P. turionellae* hemolenfinin serbest amino asit içeriğinde bulunan amino asitlerin % alan değerleri ve miktarları sırasıyla Tablo 3.6 ve 3.7'de verilmektedir. Hiçbir işlem uygulanmamış *P.turionellae*'nin son dönem larval hemolenfindeki serbest aminoasitlerden prolin'in % 45.667 oranında diğer amino asitlere göre en yüksek oranda olduğu görülürken, miktar analizlerinde glutamin (123.34 ng) ve prolin (76.69 ng) içeriğinin yüksek düzeyde olduğu belirlendi. Farklı dozlarda GA₃ uygulamasından, alanin ve prolin aminoasitlerinin % alanlarının etkilenmediği görülürken (P>0.05) hemolenfte belirlenen tüm serbest aminoasitlerin miktarlarının dozlara bağı değişiklik gösterdiği tespit edildi (P<0.05, Tablo 3.7). Tablo 3.7'de de gösterildiği gibi, triptofan ve lizin aminoasitlerinde sadece dozlar arasında önemli değişiklikler görülürken, diğer amino asitlerde hem kontrole göre hemde dozlar arasında önemli değişiklikler belirlendi.

Tablo 3.6. *P. turionellae* larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin pik yüzde alanları (%) ve doza bağlı değişimleri.

Dozlar [#]	O.D. (Ort. ± SH)*						
	GA ₃ (ppm)	Asp	Glu	Ser (Asn)	Gly	Gln	His
Kontrol		3.25±0.15a	0.65±0.03a	2.42±0.09ab	2.84±0.22abc	4.82±0.72a	9.08±0.53a
50		1.41±0.10b	0.88±0.05a	3.74±0.40abc	2.29±0.07ab	5.28±1.08a	6.89±0.05ab
100		1.67±0.03b	0.30±0.01b	4.41±0.39abc	3.22±0.39bcd	26.41±1.01b	6.14±0.33b
200		1.82±0.07bd	0.34±0.06b	6.72±0.41ac	2.22±0.22a	11.26±0.37d	8.39±0.79a
500		1.34±0.09b	0.41±0.04b	2.98±0.41abc	6.51±0.29f	17.90±0.47c	8.29±0.27ab
1000		2.48±0.04ad	0.89±0.03d	4.40±1.02abc	4.18±0.04de	12.84±0.45d	8.29±0.71ab
2000		7.07±0.77e	0.58±0.04a	2.20±0.23b	4.57±0.11de	12.70±0.18d	8.92±0.27a
5000		0.42±0.02c	0.32±0.01b	6.07±0.32c	5.26±0.22e	15.77±0.22c	6.94±0.34ab

[#]Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

* Her amino asit pik alanı yüzdesi için aynı sütunda (a-d) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

Tablo 3.6. (Devam) *P. turionellae* larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin pik yüzde alanları (%) ve doza bağlı değişimleri.

Dozlar [#]	O.D. (Ort. ± SH)*						
	GA ₃ (ppm)	Thr	Arg	Ala	Pro	Tyr	Val
Kontrol		2.01±0.12a	12.11±0.51ad	5.75±0.51a	45.67±0.74a	0.46±0.02a	4.69±0.09ab
50		2.95±0.36b	9.79±0.52ab	8.04±0.42a	44.25±1.26a	0.35±0.02a	4.89±0.15b
100		0.99±0.04c	4.57±0.54c	6.82±0.65a	37.23±1.29a	0.85±0.06a	4.02±0.14ab
200		0.97±0.11c	8.89±0.88ab	8.12±0.18a	42.20±1.83a	1.09±0.11a	4.43±0.13ab
500		0.88±0.08c	6.45±0.87bc	3.55±0.64a	41.95±0.68a	1.12±0.26a	4.90±0.16ab
1000		1.18±0.03c	6.74±0.98bc	8.15±0.22a	41.10±1.50a	1.08±0.20a	4.91±0.24ab
2000		0.98±0.09c	5.80±0.81bc	6.74±0.10a	40.68±0.83a	0.34±0.07a	5.96±0.25c
5000		2.64±0.12b	8.91±0.23ab	8.67±0.03a	32.57±0.17a	1.36±1.01a	5.99±0.17c

[#]Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

* Her amino asit pik alanı yüzdesi için aynı sütunda (a-d) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

Tablo 3.6. (Devam) *P. turionellae* larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin pik yüzde alanları (%) ve doza bağlı değişimleri.

Dozlar[#]	O.D. (Ort. ± SH)*						
	GA₃ (ppm)	Met	Ile	Leu	Phe	Trp	Lys
Kontrol		0.39±0.03a	1.04±0.12abcd	3.27±0.02a	2.39±0.28ab	0.93±0.04a	1.10±0.03a
50		0.33±0.02ab	0.22±0.03ac	3.64±0.15a	0.85±0.06a	0.40±0.02b	0.39±0.04b
100		0.24±0.02b	1.18±0.07b	2.73±0.14a	1.35±0.21ab	0.74±0.02a	0.44±0.01bc
200		0.35±0.02ab	1.06±0.18abcd	2.79±0.20a	1.47±0.13ab	0.46±0.06b	0.56±0.05c
500		0.40±0.02a	0.33±0.03a	3.85±0.17a	1.46±0.09ab	0.40±0.02b	0.56±0.04c
1000		0.75±0.07c	1.53±0.05bd	3.37±0.06a	1.38±0.02ab	1.27±0.13c	0.77±0.06d
2000		0.71±0.02c	1.22±0.23abcd	4.32±0.57a	2.17±0.37ab	0.77±0.03a	0.78±0.01d
5000		0.87±0.08c	1.46±0.06bd	3.58±0.16a	1.81±0.08b	0.78±0.05a	0.76±0.02d

[#]Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

* Her amino asit pik alanı yüzdesi için aynı sütunda (a-d) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

Tablo 3.7. GA₃ uygulamasına bağı olarak *P. turionellae* larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin miktarları (ng/μl).

Dozlar [#]	Amino asit miktarı (ng/μl Ort. ± SH)*						
	GA ₃ (ppm)	Asp	Ser	Asn	Gly	Gln	His
Kontrol		11.20±0.25a	1.89±0.10a	1.84±0.18a	5.01±0.30ac	123.35±21.78a	23.97±2.06ab
50		7.57±0.22b	4.95±0.65ab	4.89±0.13ab	6.33±0.15a	210.77±42.73a	28.45±1.16bc
100		7.37±0.17b	8.94±0.36b	8.89±0.62b	13.39±0.96abc	1677.37±105.89b	38.38±0.22d
200		9.58±0.37ab	8.75±0.52ab	8.70±0.91ab	5.97±0.61ac	736.42±15.44c	33.66±3.14cd
500		7.26±0.24b	3.97±0.75ab	3.92±1.29ab	18.15±0.14b	722.03±9.30c	34.71±1.73cd
1000		9.62±0.09ab	4.12±1.00ab	4.06±1.74ab	8.30±0.14c	738.74±14.12c	24.67±2.56ab
2000		19.61±1.88c	1.32±0.18a	1.26±0.31a	8.06±0.22c	751.02±3.16c	18.80±0.83a
5000		2.87±0.11d	10.87±0.84ab	10.82±1.45ab	19.30±1.28c	844.43±10.16c	37.89±0.98d

[#]Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

* Her amino asit pik alanı yüzdesi için aynı sütunda (a-d) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

Tablo 3.7. (Devam) GA₃ uygulamasına bağı olarak *P. turionellae* larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin miktarları (ng/μl).

Dozlar [#]	Aminoasit miktarı (ng/μl Ort. ± SH)*						
	GA ₃ (ppm)	Thr	Arg	Ala	Pro	Tyr	Val
Kontrol		6,51±0,10a	10,35±0,65ab	9,92±0,58a	79,69±3,53a	3,15±0,18a	5,03±0,63a
50		8,06±0,72a	13,26±1,29bc	21,94±0,35bc	121,72±8,98ab	4,84±0,13be	5,91±0,52a
100		4,12±0,03a	9,39±1,59ab	28,67±3,79cd	155,79±11,25ab	4,07±0,11bcd	5,50±0,44a
200		3,26±0,28b	11,62±1,17abc	21,60±0,55bc	112,40±34,88ab	4,60±0,42bc	4,59±0,20a
500		2,43±0,14ab	8,81±1,58ab	9,68±1,47a	113,86±6,29ab	3,67±0,26cd	4,93±0,11a
1000		3,30±0,06b	6,34±0,81a	15,97±0,34ab	80,81±4,37ab	3,99±0,13bcd	4,12±0,27a
2000		1,36±0,10b	10,79±0,46abc	9,35±0,26a	56,62±1,90a	3,41±0,16cd	4,73±0,08a
5000		13,31±0,71c	15,97±0,11c	31,53±0,79d	118,44±3,33b	5,79±0,09e	12,85±0,78b

[#]Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

* Her amino asit pik alanı yüzdesi için aynı sütunda (a-d) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05)

Tablo 3.7. (Devam) GA₃ uygulamasına bağılı olarak *P. turionellae* larva evresinde hemolenf serbest aminoasitlerinin miktarları (ng/μl).

Dozlar [#]	Aminoasit miktarı (ng/μl Ort. ± SH)*					
	Met	Ile	Leu	Phe	Trp	Lys
Kontrol	0.78±0.05a	1.89±0.26a	3.02±0.04ac	5.57±2.58ab	0.82±0.05abc	1.36±0.17ac
50	4.02±0.09b	5.12±0.29b	8.78±0.81abc	8.42±0.14b	1.65±0.01a	0.93±0.03a
100	2.67±0.18bc	4.70±0.09b	6.22±0.74abc	3.04±0.18ab	1.19±0.04ac	3.49±0.39abc
200	1.89±0.39bc	4.98±0.17b	3.13±0.12ab	4.45±0.42ab	1.42±0.17abc	1.44±0.14ac
500	2.16±0.03abc	4.83±0.14b	4.85±0.52abc	3.90±0.14ab	0.58±0.02b	3.34±0.13bc
1000	0.77±0.05a	2.53±0.28a	3.69±0.06bc	1.10±0.23c	0.99±0.00c	1.81±0.09ac
2000	0.64±0.04a	0.50±0.07c	2.90±0.17ab	1.27±0.02c	0.86±0.16abc	0.82±0.02a
5000	2.75±0.09c	2.37±0.22a	7.24±0.24c	1.12±0.11c	0.67±0.01b	2.71±0.09c

[#]Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

* Her amino asit pik alanı yüzdesi için aynı sütunda (a-d) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05)

3.4. GA₃'ün Konak Hemositlerine Etkisi

3.4.1. Konak toplam hemosit sayısı

G. mellonella son dönem larvalarında, farklı dozlardaki (50-5000 ppm) GA₃'ün toplam hemosit sayılarına etkileri Tablo 3.8'de verilmektedir. Hiçbir uygulama yapılmamış *G. mellonella* larvalarında hemosit sayısı 21,23 x 10⁶ hücre/ml olarak belirlendi. Uygulanan GA₃ dozuna bağlı olarak, deney gruplarının toplam hemosit sayılarında 1000 ppm'e kadar kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterirken, 1000 ppm'den itibaren toplam hemosit sayısı tekrar kontrol grubundaki seviyeye gelerek, bu oran 2000 ve 5000 ppm'lik dozlarda da etkilenmedi. Toplam hemosit sayısı 500 ppm'lik GA₃ uygulamasında en yüksek seviyeye ulaşmasına rağmen, dozlar arasında ise 1000 ve 5000 ppm'lik GA₃ dozlarının diğer dozlardan önemli farklılıklar gösterdiği belirlendi (F= 26.495; df= 7, 112; P<0.05).

Tablo 3.8. GA₃'ün konak böcek *G. mellonella* son evre larval toplam hemosit sayılarına (x10⁶ hücre/ml) etkileri

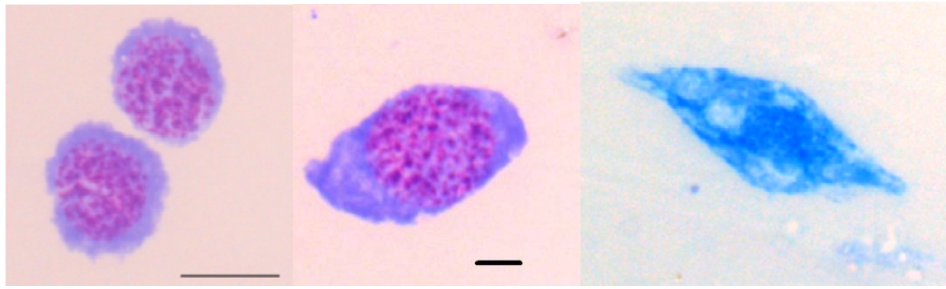
GA ₃ dozları (ppm)	Toplam Hemosit Sayıları [#] (x10 ⁶ hücre /ml) (Ort. ± SH) [*]
Kontrol	21.23±1.57 abc
50	26.55±1.29 cd
100	28.89±0.71 de
200	30.75±1.45 de
500	32.63±0.98 e
1000	18.84±1.08 ab
2000	23.01±0.70 bc
5000	16.72 ±0.81 a

[#] Her biri 15 larvanın toplam hemosit sayısı ortalamalarını ve standart hatalarını göstermektedir.

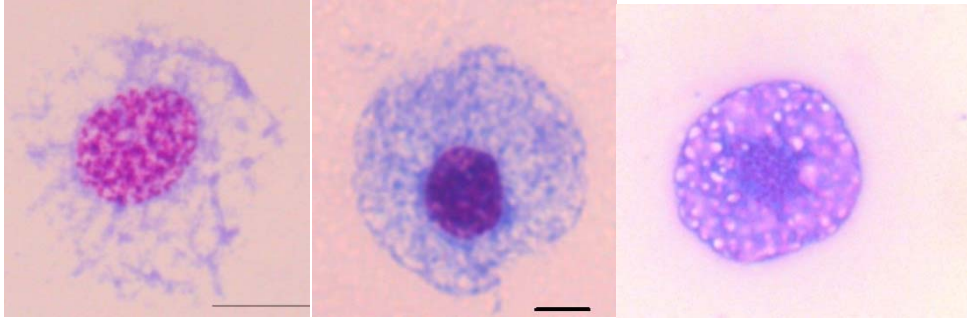
^{*} Aynı sütunda (a-e) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05, Tamhane 2).

3.4.2. Konak böcek farklı hemosit tipleri, sayıları ve mitotik indeks

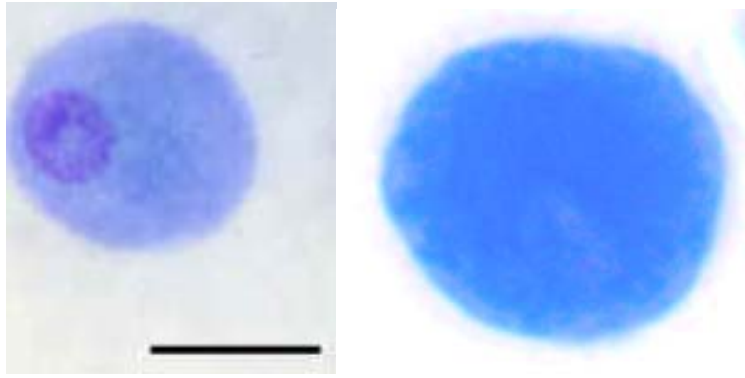
50-5000 ppm doz aralığındaki GA₃'ün konak son dönem larvalarının hemositleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle *G. mellonella* larval hemosit tipleri belirlendi. *G. mellonella* larval hemosit tipleri morfolojik olarak granülositler, plazmatositler, sferülositler, önositoid ve prohemositler olarak sınıflandırıldı (Şekil 3.6 ve 3.7). GA₃ uygulamasının konak farklı hemosit tiplerine etkilerinin belirlendiği çalışmalarda tüm hemosit tipleri her preperatta 1000 hücre olacak şekilde sayıldı ve veriler Tablo 3.9'da verilmektedir. Tablo 3.9'da görüldüğü gibi hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvalarında en yoğun bulunan hücre tipi granülositler ve plazmatositler olarak belirlendi (Şekil 3.8). Farklı GA₃ dozlarına bağlı olarak konak son dönem larvalarının Plazmatosit (PL) sayısı en fazla 1000 ppm'de görülürken bu oranın kontrol ve deney gruplarına göre önemli olmadığı görüldü (F= 1.989; df= 7, 112; P>0.05). Konak son dönem larvalarında belirlenen granülosit (GR) oranlarının GA₃ uygulamasından etkilenmedikleri ve en yüksek oranın 50 ppm'de olduğu belirlendi (F= 1.357; df=7, 112; P>0.05). *G. mellonella* son dönem larvalarında belirlenen diğer hemositlerden (DH) siferülosit, önositoid ve prohemosit sayılarının da GA₃ uygulamasından etkilenmediği istatistiksel olarak belirlendi (F= 1.916; df=7, 112; P>0.05).



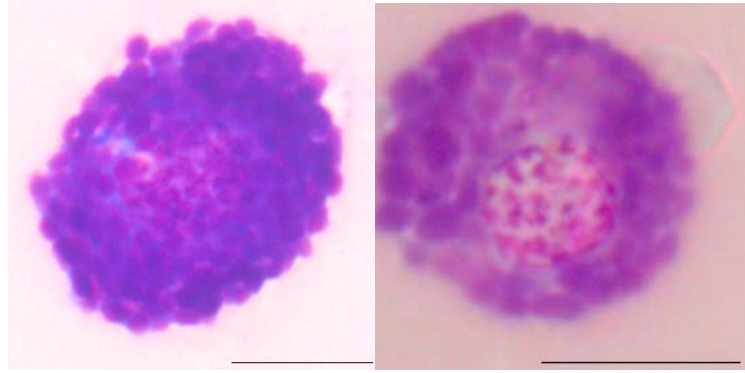
a)Plazmatositler



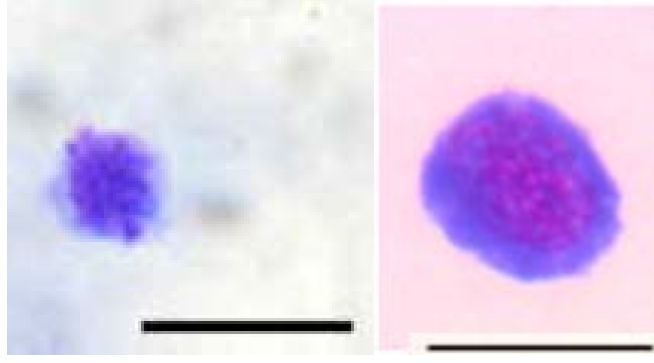
b) Granüositler



c) Önositoidler

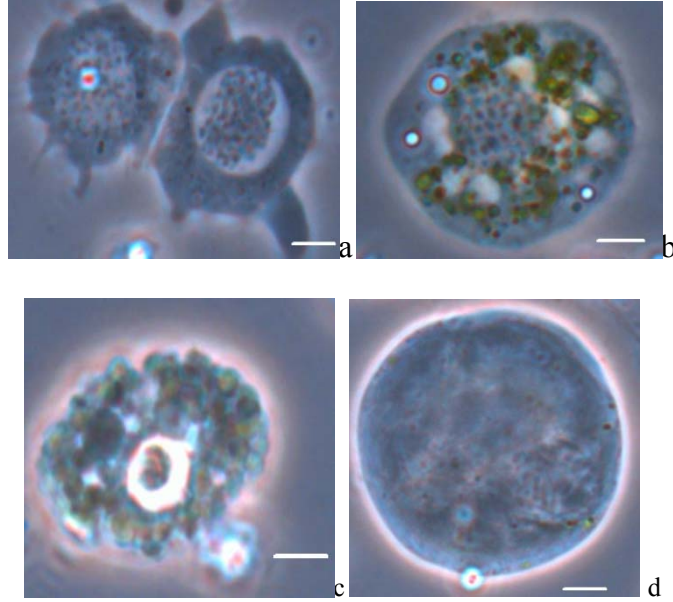


d) Siferüositler



e) Prohemositler

Şekil 3.6. Konak *G. mellonella* son dönem larvalarında Giemsa boyama yöntemi ile gözlemlenen farklı hemosit tipleri, Ölçü Barı = 10 µm. Büyütme = 1000X.



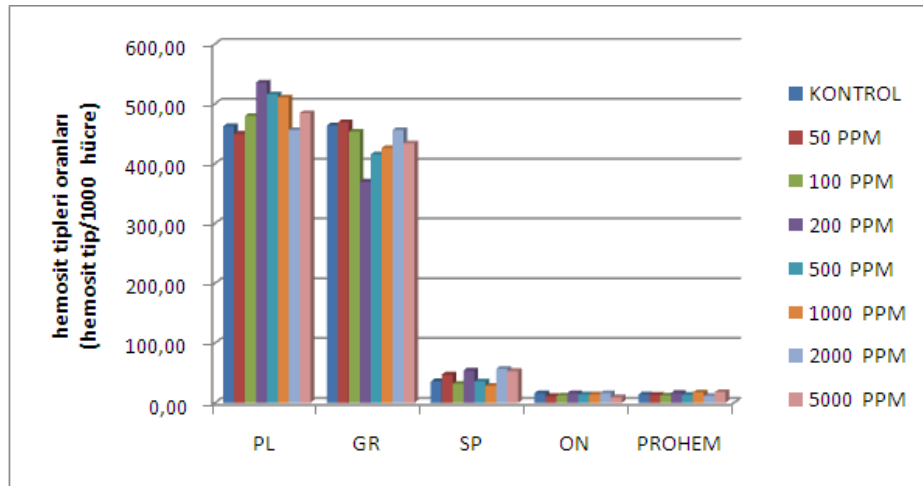
Şekil 3.7. Konak *G. mellonella* son dönem kontrol grubu larvalarında Faz-Kontrast mikroskopta gözlemlenen farklı hemosit tipleri, Ölçü Barı = 10 µm. Büyütme = 1000X. a: Plazmatosit, b: granülosit, c: siferülosit, d: önositoid.

Tablo 3.9. GA₃'ün konak *G. mellonella* larvalarının farklı hemosit sayılarına etkileri.

Deneysel Grupları (GA ₃)	Farklı Hemosit Sayıları (hücre / 1000) (Ort. ± SH) [#]		
	Hemosit Tipi*		
	PL	GR	DH
Kontrol	464.09 ± 19.09a	466.00 ± 19.78a	69.91 ± 4.32a
50 ppm	439.58 ± 16.70a	479.48 ± 16.02a	80.94 ± 7.48a
100 ppm	482.84 ± 21.87a	455.14 ± 22.71a	62.02 ± 4.79a
200 ppm	500.23 ± 33.93a	412.56 ± 38.14a	87.21 ± 12.62a
500 ppm	522.90 ± 22.93a	411.74 ± 22.60a	65.37 ± 7.32a
1000 ppm	530.33 ± 27.35a	414.97 ± 27.99a	57.70 ± 5.19a
2000 ppm	451.47 ± 15.15a	472.87 ± 16.12a	75.66 ± 7.68a
5000 ppm	489.74 ± 21.48a	436.93 ± 23.73a	73.33 ± 7.85a

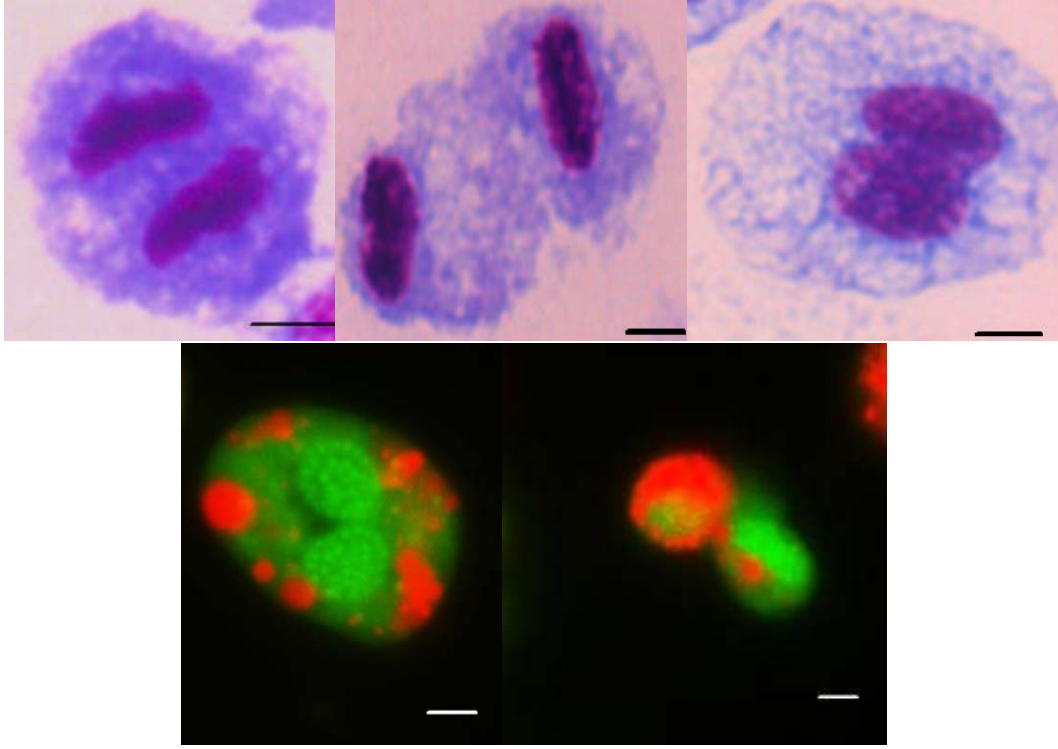
Her biri 15 larvanın 1000 hücredeki farklı hemosit sayısı ortalamalarını ve standart hatalarını göstermektedir

* Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05). PL: Plazmatosit, GR: Granülosit, DH: Siferülosit, Önositoid ve Prohemositlerin ortalama ve standart hataları



Şekil 3.8. GA₃'ün konak farklı hemosit sayılarına etkileri

Farklı dozlardaki GA₃'ün farklı hemosit tiplerine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan tüm preparatlarda farklı mitotik evreler de incelenerek mitotik indeksin dozlara bağlı olarak % değişimi belirlendi. Ayrıca apoptotik indeks için hazırlanan preparatlarda da mitotik evreler belirlendi ve bunlarda sayımlar içinde değerlendirildi (Şekil 3.9). Tablo 3.10'da de gösterildiği gibi, mitotik indeksin kontrole göre 5000 ppm'e kadar anlamlı bir değişim göstermediği, 5000 ppm'de ise kontrole göre önemli oranda bir artış gösterdiği belirlendi (F= 3.894; df= 7, 112; P< 0.05). Ancak, kontrol grubuna bağlı yapılan bu kıyaslama istatistiksel olarak önemliyken, GA₃'ün farklı dozları arasındaki mitotik indeks verilerinin kendi aralarında önemli değişiklik göstermediği görüldü (Tablo 3.10).



Şekil 3.9. Konak *G. mellonella* son evre larvalarında mitoz bölünme evresindeki hemositler, Ölçü Barı = 10 µm. Büyütme = 1000X.

Tablo 3.10. GA₃'ün konak *G. mellonella* son dönem larva evresindeki mitotik indeks (%) değişimleri.

GA ₃ Dozları (ppm)	Mitotik İndeks (%) [#] (hücre/1000) (Ort. ± SH)*
Kontrol	1.146 ± 0.14a
50	1.321 ± 0.16ab
100	1.649 ± 0.12ab
200	1.485 ± 0.25ab
500	1.263 ± 0.18ab
1000	1.177 ± 0.16ab
2000	1.329 ± 0.06ab
5000	2.335 ± 0.31b

* Her biri 15 larvanın 1000 hücredeki mitotik indeks yüzdelерinin ortalamalarını ve standart hatalarını göstermektedir.

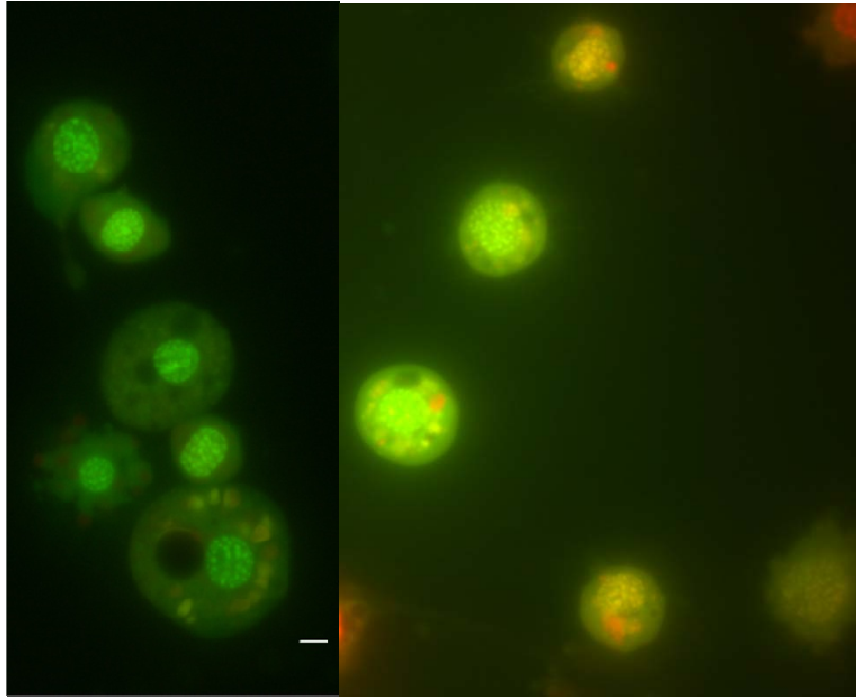
Aynı sütunda aynı harfi (a-b) taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

3.4.3. Konak hemositlerinde apoptotik indeks

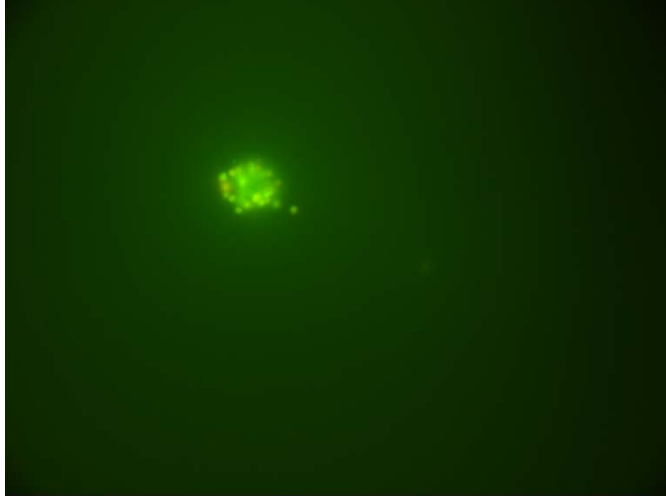
GA₃ dozlarının *G. mellonella*'nın larval hemositlerinde apoptotik indekse etkileri dört tekrarlı deney serileri ile belirlendi. Acridine Orange/ Ethidium Bromide boyama tekniği kullanılarak hazırlanan preparatların mikroskopik incelemesi sonucu larval evrede normal hemositler (Şekil 3.10), erken apoptotik (Şekil 3.11), geç apoptotik (Şekil 3.12) ve nekrotik (Şekil 3.13) hemositler görülmektedir.

Kontrol ve deney gruplarında yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücrelerin (%) oranları Tablo 3.11'de verilmektedir (Şekil 3.14). GA₃ doz artışına bağlı olarak canlı hemositlerin oranında dozlar arasında anlamlı bir değişim olmazken, bu oranlar

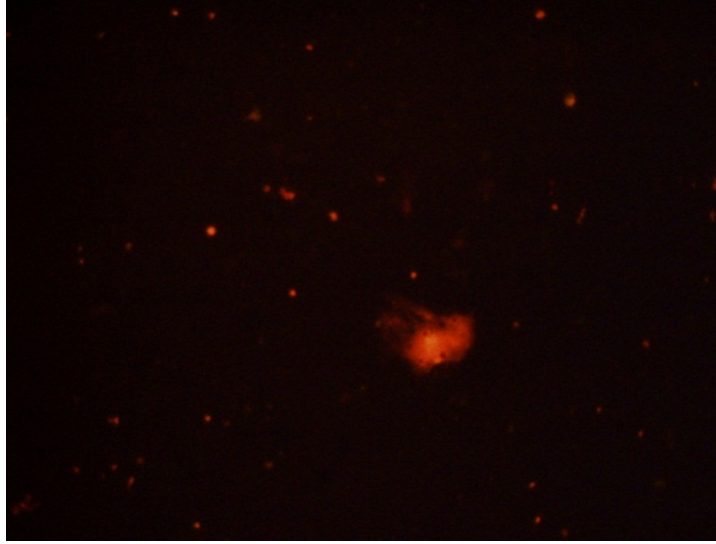
kontrol grubuyla kıyaslandığında 5000 ppm'lik deney gruplarında istatistiksel olarak önemli bir azalma gösterdi ($F= 4.674$; $df= 7, 152$; $P<0.05$). Tablo 3.11'de de görüldüğü gibi konak hemositlerindeki, erken apoptosis indeksinin GA_3 uygulamasına bağlı olarak istatistiksel yönden değişiklik göstermediği görüldü ($F= 0.787$; $df= 7, 152$; $P<0.05$). Konak hemositlerinin geç apoptotik indeksinde, 500 ppm ve 5000 ppm'lik GA_3 dozları arasında kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir artış meydana gelirken, uygulanan GA_3 dozları arasında 5000 ppm haricinde istatistiksel olarak önemli bir değişim görülmedi ($F= 6.038$; $df=7, 152$; $P<0.05$). Konak hemositlerinde belirlenen nekrotik indekste ise, uygulanan tüm GA_3 dozlarında kontrol grubuna göre önemli bir artış belirlenirken, nekrotik indeksin uygulanan GA_3 dozları arasında anlamlı bir değişime neden olmadığı gözlemlendi ($F= 11.978$; $df=7, 152$; $P<0.05$).



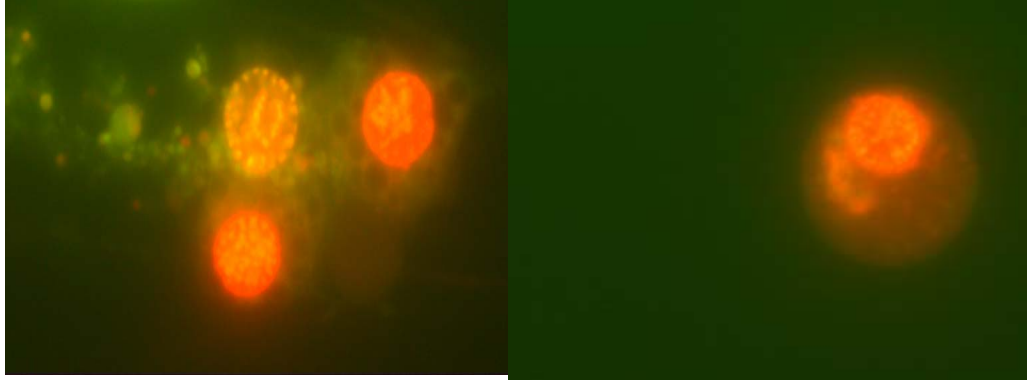
Şekil 3.10. Acridine Orange ve Ethidium Bromide ile boyanmış *G. mellonella* larval hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri. Büyütme: 1000X, Ölçek: 10 μ m.



Şekil 3.11. *G. mellonella* larva evresinde erken apoptotik hemosit. Büyütme: 1000X.



Şekil 3.12. *G. mellonella* larva evresinde geç apoptotik hemosit. Büyütme: 1000X.



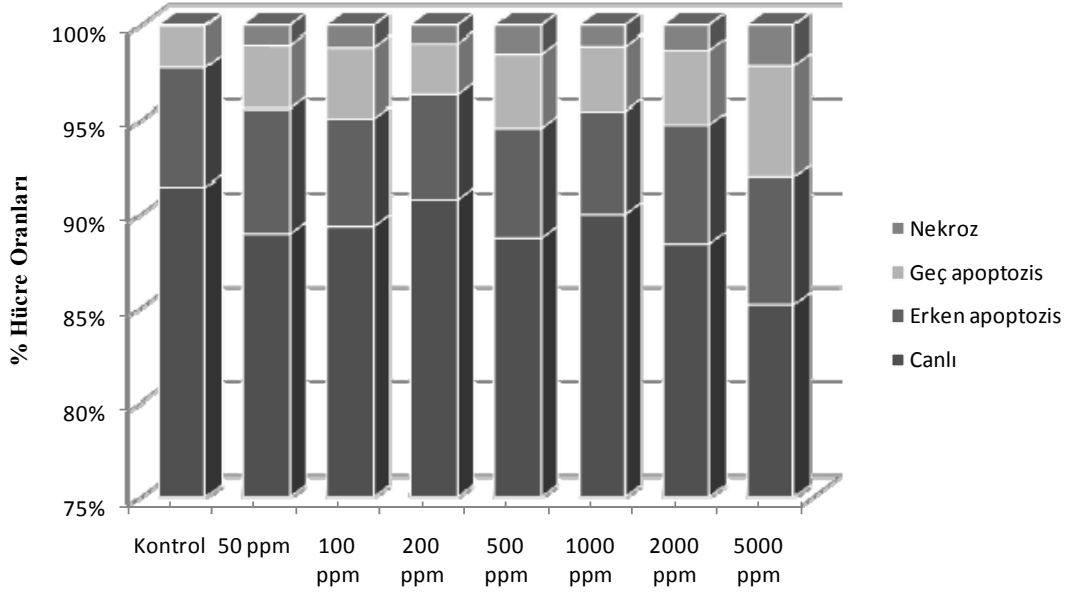
Şekil 3.13. *G. mellonella* larva evresinde nekrotik hemositler. Büyütme: 1000X.

Tablo 3.11. Farklı GA₃ dozlarının *G. mellonella* son dönem larva evresinde erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücre (%) sayısına etkileri.

GA ₃ Dozları (ppm)*	Apoptotik İndeks (%) [#] (hücre/500) (Ort. ± SH)*			
	Erken apoptozis	Geç apoptozis	Nekroz	Canlı
Kontrol	6.36 ± 0.81a	2.18 ± 0.26a	0.04 ± 0.04a	91.42 ± 0.94a
50	6.67 ± 0.65a	3.39 ± 0.41ab	1.04 ± 0.21b	88.91 ± 0.91ab
100	5.74 ± 0.48a	3.79 ± 0.41ab	1.16 ± 0.21b	89.31 ± 0.69a
200	5.55 ± 0.47a	2.74 ± 0.48ab	0.96 ± 0.24b	90.75 ± 0.83a
500	5.87 ± 0.75a	3.93 ± 0.44bc	1.53 ± 0.18b	88.67 ± 1.07ab
1000	5.47 ± 0.40a	3.45 ± 0.31bc	1.12 ± 0.20b	89.96 ± 0.63a
2000	6.36 ± 0.44a	3.96 ± 0.56bc	1.32 ± 0.18b	88.36 ± 0.96ab
5000	6.75 ± 0.46a	5.95 ± 0.48c	2.14 ± 0.24b	85.16 ± 0.89b

* Her biri 20 larvanın 500 hücredeki mitotik indeks yüzdelerinin ortalamalarını ve standart hatalarını göstermektedir.

Aynı sütunda aynı harfi (a-b) taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

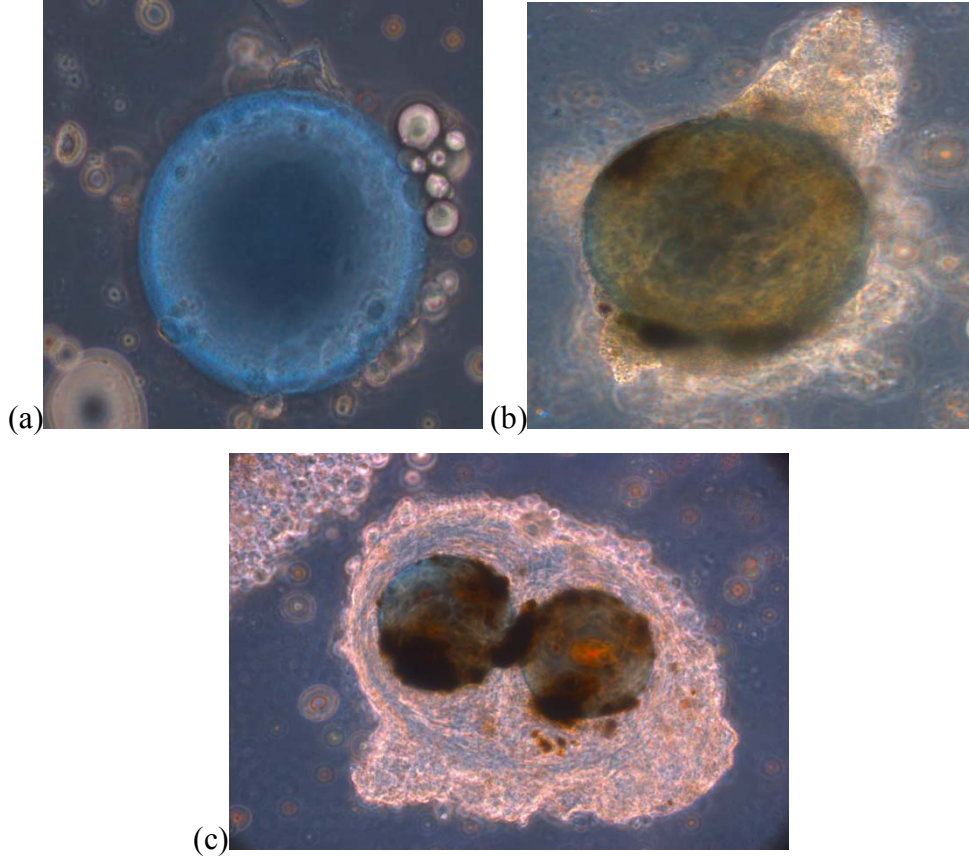


Şekil 3.14. GA₃ uygulamasına bağlı olarak konak larvası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları. Kontrol: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvası.

3.4.4. Konak hemositlerinde enkapsülasyon ve melanizasyon

G. mellonella son evre larvalarına enjekte edilen Sephadex A-25 boncukları güçlü bir enkapsülasyon tepkisi ortaya çıkardı ve enjeksiyonu takiben 4 ve 24 saatlik dönemlerde boncuklar etrafında oluşan kapsüllerin kalınlığı farklılık gösterdi. Böcek içerisinden çıkarılan boncuklar, Uçkan ve ark. (2009)'nın yaptığı çalışmadaki gibi:

- Boncuk enkapsüle olmamış veya üzerinde birkaç hemosit var ise enkapsüle olmamış,
- Boncuk üzerinde 2-10 katman hemosit var ise zayıf enkapsüle olmuş,
- Boncuk üzerinde 10 ve daha fazla hemosit katmanı var ise güçlü enkapsüle olmuş olarak üç farklı şekilde ele alındı (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. *G. mellonella* son evre larvasında 24 saat sonra (a) enkapsüle olmamış, (b) zayıf enkapsüle olmuş (c) güçlü enkapsüle olmuş Sephadex A-25 boncuğu. Büyütme 400X.

Sephadex DEAE A-25 boncuklarının *G. mellonella* larvalarına enjeksiyonunu takiben 4 ve 24 saat sonra larvalar stereo mikroskop altında disekte edilerek boncuklar çıkarıldı ve PBS üzerine alınarak incelendi. Yapılan mikroskopik incelemeler sonucu Sephadex A-25 boncuklarının *G. mellonella* larvalarının hemosit enkapsülasyonu için uygun hedef olduğu belirlendi. Farklı GA₃ dozlarına (50-5000 ppm) bağlı olarak larvalarda meydana gelen enkapsülasyon değişimlerin % oranları ve değerleri 4 ve 24 saat'lik periyotlarda belirlendi (Tablo 3.12 ve Şekil 3.16).

Tablo 3.12'de görüldüğü gibi herhangi bir işleme tabi tutulmamış kontrol larvalarında güçlü enkapsüle olan boncukların oranı 4. saatte %15.72 iken, 24. saatte ise bu oran %87.65'e yükseldi. Farklı dozlarda GA₃ uygulanmış larvalarda ise güçlü enkapsülasyon durumunun aynı şekilde 24. saatte daha yüksek oranda olduğu belirlendi. Üç yönlü ANOVA sonuçlarına göre, farklı dozlarda (50-5000

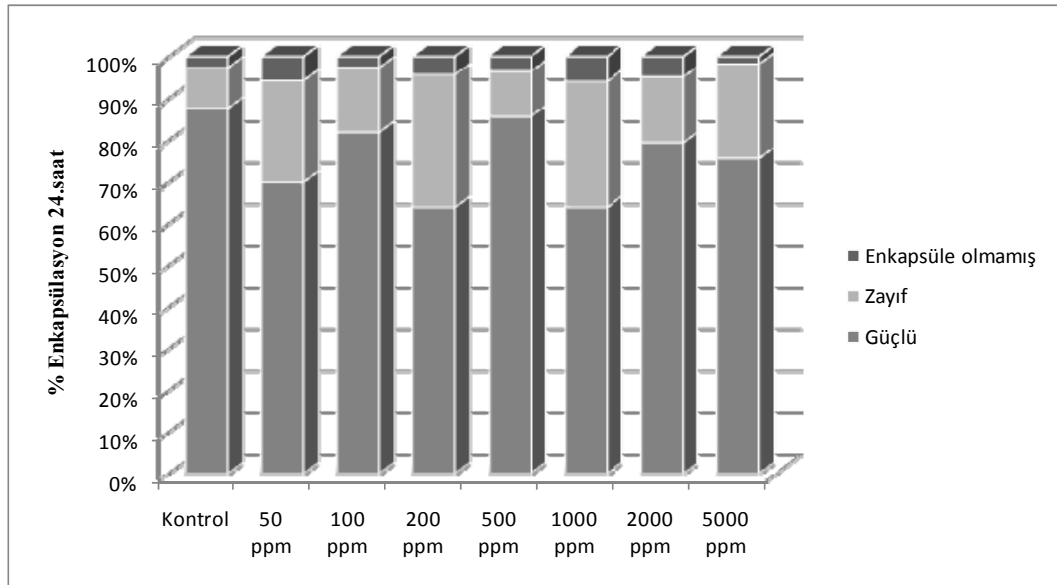
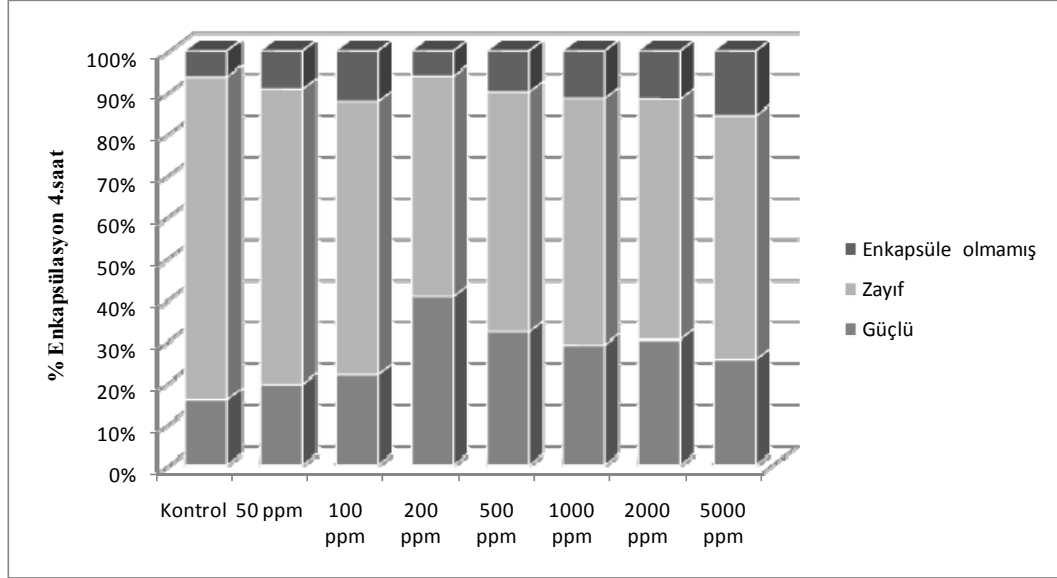
ppm) GA₃'ün konak larval hemositlerindeki enkapsülasyon davranışlarına etkisi, enkapsülasyon durumuna (P<0.05) ve zamana bağlı olurken deney gruplarıyla (P>0.05) bağımlı olmadığı belirlendi. Deney grupları ve zaman arasındaki ilişki de larval enkapsülasyon durumu için önemli değilken (P>0.05), larval enkapsülasyon durumunun hem zamandan (P<0.05) hem de deney gruplarından (P<0.05) önemli oranda etkilendiği tespit edildi (Tablo 3.13).

GA₃'ün belirlenen dozlarının konak larvalarında enkapsüle olmamış (EO) boncuk sayıları kontrolle kıyaslandığında (Tablo 3.12), 4. saatte doz artışına bağlı olarak enkapsüle olmamış boncuk sayısının arttığı özellikle 1000, 2000, 5000 ppm'lik dozlarda önemli oranda artış gösterdiği görüldü (F= 8.657; df= 7, 112; P<0.05). 24. saatte ise EO sayısı GA₃ dozları ile kontrol arasında anlamlı değişiklik göstermezken, dozlar arasında 50 ppm'deki EO boncuk sayısı, 5000 ppm'de önemli oranda azaldı (F= 3.116; df=7,112; P<0.05).

GA₃ uygulamasına bağlı olarak konak son dönem larvalarında zayıf enkapsüle olmuş (ZE) boncuk oranları (Tablo 3.12) 4. saatte kontrole göre tüm dozlarda önemli oranda azalırken, dozlar kendi arasında değerlendirildiğinde de 50 ve 100 ppm'lik deney gruplarının ZE boncuk sayısının diğer dozlardan farklılık gösterdiği belirlendi. Genel olarak doz artışına bağlı olarak 4. saatte ZE boncuk oranında azalma olduğu görüldü (F=24.150; df=7, 112; P<0.05). ZE boncuk sayısı 24. saatte ise, 4. saattekinin tam tersi olarak kontrole göre boncuk sayısı doz artışına bağlı olarak önemli oranda (500 ppm haricinde) artış gösterirken en yüksek ZE boncuk oranı 200 ppm'de görüldü (F= 26.905; df=7, 112; P<0.05).

Değişen dozlardaki GA₃'ün konak larvalarında güçlü enkapsüle olmuş (GE) boncuk indeksinde (Tablo 3.12) 4. saatte artış yönünde etkili olduğu görüldü. Özellikle de bu durum kontrol grubu ile kıyaslandığında 100 ppm'den itibaren artışın anlamlı olduğu belirlendi. GA₃ dozları kendi arasında değerlendirildiklerinde de en fazla G. E boncuk oranı 200 ppm'de olurken, bu durum doz artışına bağlı olarak bir azalma gösterdi (F= 22.260; df=7, 112; P<0.05). GE boncuk oranı 24. saatte ise 50, 100 ve 200 ppm'de kontrole kıyasla önemli oranda azalırken, 500ppm'de GE boncuk sayısı kontrolden farklılık göstermedi. Ancak, 500 ppm'den sonra boncuk sayısında tekrar doz artışına bağlı

olarak kontrole kıyasla anlamlı bir azalma görüldü (F= 28.998; df=7, 112; P<0.05).



Şekil 3.16. GA₃ uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* larva evresinde enkapsülasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri.

Tablo 3.12. Farklı GA₃ dozlarının 4 ve 24 saatlik periyotlarda *G. mellonella* larval hemositlerinin enkapsülasyon davranışlarına etkileri.

Dozlar GA ₃ * (ppm)	Toplam Boncuk		Enkapsülasyon durumu (% ± SH ve ≠ enkapsüle boncuk sayısı) [#]					
			Enkapsüle Olmamış		Zayıf		Güçlü	
			4s	24s	4s	24s	4s	24s
Kontrol	223	226	6.26 ± 0.79a 14	2.64±0.86ab 6	78.02±1.23a 174	9.71±0.83a 22	15.72±0.87a 35	87.65±1.03a 199
50	227	226	9.26±0.87ab 21	5.78±0.61a 13	71.27±1.21b 162	24.26±1.43b 55	19.47±0.92ab 44	69.96±1.48bc 158
100	226	225	12.37±0.85bc 28	2.62±0.86ab 6	65.98±1.83bc 149	15.55±1.01cd 35	21.65±1.33bc 49	81.83±1.11d 184
200	232	225	6.06±0.44a 14	4.37±0.83ab 10	53.42±2.31d 124	31.92±1.61e 72	40.53±2.47d 94	63.71±1.91c 143
500	221	223	9.98±1.28ab 22	3.62±0.91ab 8	57.94±2.19d 127	10.87±1.76ac 24	32.08±2.74cde 72	85.51±2.21ad 191
1000	224	218	11.55±0.96bc 26	6.00±1.14ab 13	59.47±1.22cd 133	30.26±1.41be 66	28.98±0.64ef 65	63.74±1.71c 139
2000	223	223	11.73±1.29bc 25	4.93±0.80ab 11	58.05±1.84d 134	15.64±1.02cd 35	30.22±2.29cdf 64	79.43±0.63d 177
5000	224	220	15.63±1.27c 35	1.75±0.78b 4	58.96±1.46cd 132	22.78±2.85bde 50	25.40±0.84cf 57	75.47±2.80bd 166

* Farklı dozlarda GA₃ uygulanmış ve uygulanmamış larvalara 10 µl PBS içinde hazırlanan 15-17 Sephadex DEAE A-25 boncukları enjekte edildi. Boncuklar enjeksiyondan 4 ve 24 saat sonra larvalardan disekte edildi; EO: Enkapsüle olmamış, ZE: Zayıf enkapsülasyon, GE: Geç enkapsülasyon.

Aynı sütunda aynı harfi (a-f) taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

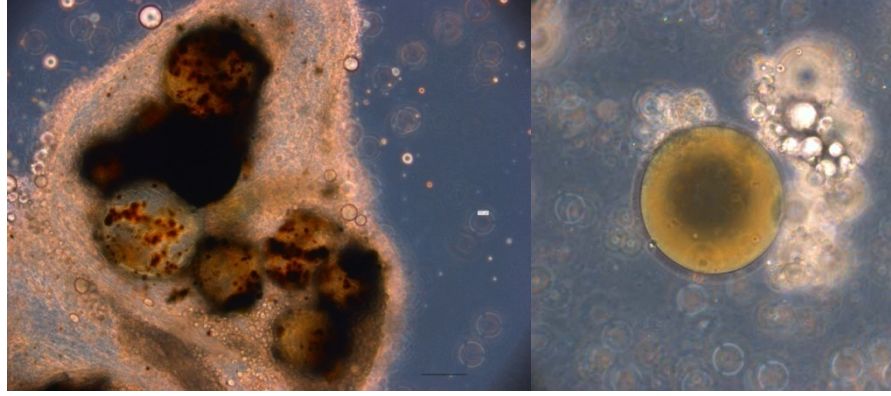
Tablo 3.13. Farklı deney grupları (kontrol ve farklı dozlardaki GA₃ (50-5000 ppm), zaman, enkapsülasyon durumları ve bunların birbirleriyle ilişkilerinin *G. mellonella* son dönem larvalarındaki enkapsülasyon davranışına etkilerini gösteren ANOVA tablosu

Kaynak	df	MS	F	P	r²
Deney Grupları	7	0.06214	0.828	0.564	0.941
Zaman	1	0.201	26.798	0.000	
Enkapsülasyon Durumu	2	21.637	2883.328	0.000	
Deney Grupları x zaman	7	0.06355	0.847	0.549	
Zaman x enkapsülasyon durumu	2	15.704	2092.666	0.000	
Enkapsülasyon durumu x deney grubu	14	0.100	13.884	0.000	
Grup x zaman x enkapsülasyon durumu	14	0.249	33.149	0.000	
Hata	672	0.07504			

Farklı dozlardaki GA₃'ün konak hemositlerinde enkapsülasyon davranışlarına etkilerinin incelendiği mikroskobik çalışmalarda boncuklarda ve çevresindeki melanizasyon durumları da incelendi (Şekil 3.17 ve 18). Tablo 3.14'te de görüldüğü gibi, GA₃ uygulaması yapılmayan kontrol gruplarında 4. saatteki melanizasyon oranı % 54.29 olarak belirlenirken, bu durum 24. saatte %77.87'e yükseldi (P<0.05). Ancak, 50-5000 ppm arasında GA₃ uygulaması yapılan deney gruplarında bu durum görülmedi. Deney gruplarından, 50, 100, 200 ve 500 ppm'de 4. saate göre 24. saatte melanizasyon oranında azalma oldu (P<0.05), ancak diğer dozlarda ise iki saat arasında önemli farklılıklar görülmedi (P>0.05).

Konak son dönem *G. mellonella* larvalarında boncukların melanize olma durumları GA₃ uygulamasına bağlı olarak her iki zamanda da farklı yönde etkili olduğu görüldü. 4. saatte melanizasyon oranı kontrol grubuna göre kıyaslandığında GA₃'ün doz artışına bağlı olarak 1000 ppm'e kadar önce artış

gösterdiği, 1000 ppm'den itibaren kontrol seviyesine gelerek, 5000 ppm'de önemli oranda azalma gösterdiği belirlendi (F= 24.166; df=7, 112; P<0.05). 24. saatte ise boncukların melanize olma oranları, kontrole göre kıyaslandığında 500 ppm haricinde önemli oranda azalma gösterdi. Ancak dozlar arasındaki farklılıklar dalgalanma gösterdi (F= 16.435; df=7, 112; P<0.05).



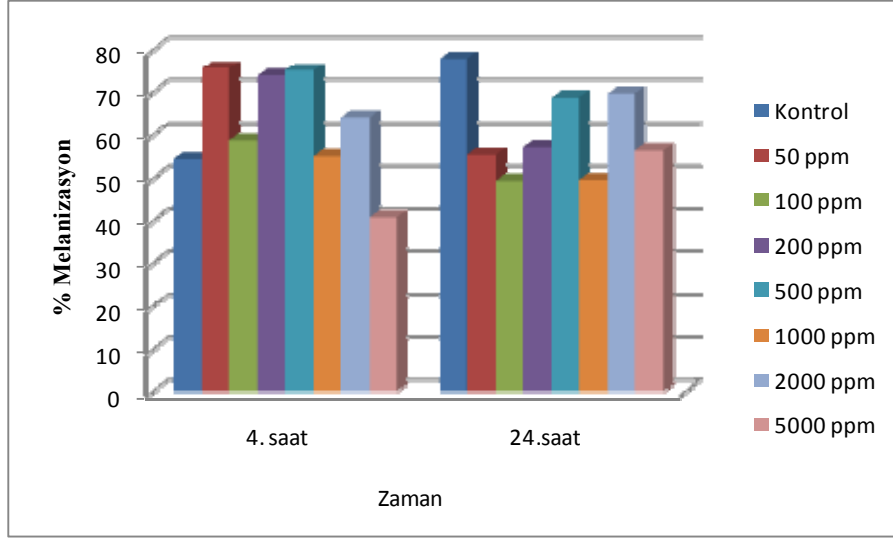
Şekil 3. 17. Sephadex DEAE A-25 boncuklarının *G.mellonella* larvalarına enjeksiyonuna bağlı hemositlerde ve boncuklarında melanizasyon. Büyütme 400X.

Tablo 3.14. Farklı GA₃ dozlarının *G. mellonella* larval hemositlerinin Sephadex-A25 boncuklarında melanizasyon durumuna (%) etkileri

GA ₃ Dozları (ppm) [#]	Melanizasyon (%)*	
	4. saat	24. saat
Kontrol	54.29±2.96 ax	77.87±1.62 ay
50	75.50±2.91 bcx	55.36±2.61bcdy
100	78.54±3.09 bcx	49.39±2.38 dy
200	73.78±2.43 bcx	57.05±1.29 bcdy
500	74.99±1.68 cx	68.66±4.20 acey
1000	55.04± 2.63 ax	49.54±3.19 bdx
2000	64.16 ±1.90abx	69.55±1.35 ex
5000	40.71±1.00 dx	56.28±2.18 bcdx

^{#*} Her biri 15 larvanın melanizasyon yüzdelerinin ortalamalarını ve standart hatalarını göstermektedir.

* Aynı sütunda (a-d) ve satırda (x-y) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).



Şekil 3.18. GA₃ uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* larva evresinde melanizasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri.

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİ

Biyolojik kontrol ve ekolojik dengenin önemli unsurları olan Hymenoptera takımına ait parazitoit türler, konakları ile hem biyokimyasal hem de fizyolojik ilişkiler içerisindedir. Konak - parazitoit arasındaki biyolojik denge çeşitli abiyotik ve biyotik faktörlere bağlı olarak değişime uğrar ise parazitoitin konak üzerindeki baskınlığı da değişecektir. IPM programlarının da ana unsuru olan, aynı zamanda da biyolojik kontrol ajanları olarak kullanılan parazitoit türlerin popülasyonlarının ve etkinliklerinin artırılması ise önemli bir husustur. Ancak IPM programlarında biyolojik ve kimyasal kontrol yöntemlerinin sıklıkla birlikte kullanılması parazitoit türler üzerinde olumsuz etkileri olabilir mi sorusunu akla getirmektedir. Özellikle de tarımsal verimin ve zararlılara dayanıklılığın artırılması için bitki gelişim düzenleyicileri olarak bilinen kimyasallar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle BGD'lerin de konak-parazitoit ilişkisinde etkili olabilecek kimyasal faktörler içinde değerlendirilmeleri gerekmektedir.

BGD'lerin böceklerde genel olarak yumurta sayısı, gelişmesi, eşey oranı, glikojen seviyesindeki değişikliklere ve kromozom bozukluklarına neden olduğu değişik çalışmalarda gösterilmiştir (Yeşilada ve Bozcuk 1995; Kaya ve Yanıkoğlu 1999; Kaur ve Rup 2000; Harikesh ve Bhattacharya 2003; Kaur ve Rup 2003a; 2003b; Gupta 2009). Bazı BGD'lerin böceklerin gelişimi üzerinde hızlandırıcı bazılarının ise yavaşlatıcı etkilerinin olduğu da bilinmektedir (Goffelt ve Schults 1988; Önder ve Çınarlı 1988). Yapılan bu çalışmalar, BGD'lerin, böceklerin yaşamsal faaliyetlerini devam ettirilmesinde rol oynayan temel metabolitlerde (karbohidrat, lipit, yağ, aminoasitler gibi), hormonal ve immunolojik mekanizmalarda potansiyel etkilerinin olduğuna işaret etmektedirler. Sunulan bu çalışmada ise, ülkemizde de önemli kullanım payına sahip BGD'lerden birisi olan GA₃'ün hem fitofag böcekler hem de doğal düşmanları üzerindeki biyokimyasal ve fizyolojik etkilerinin değerlendirilmesi *G. mellonella* ve *P. turionellae* türleri üzerinden yapıldı.

Yüksek organizasyonlu hayvanlarda olduğu gibi böcekler de metabolik faaliyetlerin devam etmesi için temel organik bileşikler olan karbohidrat, lipit, proteinler ve inorganik bileşikler olan çeşitli tuzlara ihtiyaç duyarlar. Bu

metabolitlerin böceğin gelişimi süresince hemolenfte ve yağ dokuda sabit kalmadığı özellikle de holometabol böceklerde metamorfoz süresince değişiklik gösterdikleri bilinmektedir. Enerji tüketimi ve büyümeyle ilgili mekanizmalara bağlı olarak glikojen, lipit, çeşitli proteinler ve serbest aminoasitlerin hemolenfteki miktarları farklılık göstermektedir. Bu nedenle böceklerde fizyolojik değişikliklere neden olacak her türlü biyotik ve abiyotik faktörler hemolenf metabolitleriyle ilişkili olabilir. Özellikle de böceklerin hemolenfi gelişimsel, fizyolojik ve immunolojik faaliyetlerde önemli görevleri olan çok sayıda protein içermektedir. Bunlar genel olarak vitellogeninler, depo proteinleri veya majör hemolenf proteinleri, lipoproteinler, enzimler, hormonlar, antimikrobiyal peptitler, patojenlerin enkapsülasyonunda rol oynayan profenoloksidaz ve konağın humoral savunma reaksiyonları ile ilgili diğer proteinlerdir (Riddiford ve Law 1983; Wheeler ve Kawooya 1990, Barchuk ve ark. 2002; Lavine ve Strand 2002; Kucharski ve Maleszka 2003; Haffman 2003; Lourenco 2005). Bunların yanında bazı proteinler hemolenfin fonksiyonları üzerinde de oldukça etkilidirler (Park ve ark. 2005). Hemolenfteki protein miktarının, gelişim sırasında, özellikle de metamorfozdan önce ya da metamorfoz sırasında, beslenme döneminde besinin kalitesine göre ve stres koşulları altında büyük değişimler gösterdiği bilinmektedir (Riddiford ve Law 1983; Denlinger 2002; Huang ve ark. 2007).

Çalışmamızda ise Dünya Sağlık Örgütü (WHO 1990) tarafından pestisitler içinde değerlendirilen GA₃'ün hem konak *G. mellonella* hem de parazitoit *P. turionella*'nın larval hemolenf proteinleri üzerindeki etkileri ortaya konulmaya çalışıldı. Elde edilen bulgulara göre *G. mellonella*'nın hemolenf proteinlerinin moleküler ağırlıkları yaklaşık 181.2-14.5 kDa arasında değişmektedir. Bu proteinler elektroforetik dağılımlarına ve moleküler ağırlıklarına göre daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldıklarında;

- 181.2 kDa'lık proteinin lipoforinlerden apolipoforin-I (ApoLp-I), 87.2 kDa'lık proteinin apolipoforin-II (ApoLp-II), 18.9 kDa olan proteinin apolipoforin-III (ApoLp-III),
- 91.5 ve 65.6 kDa'lık proteinlerin depo proteinlerine veya larval major hemolenf proteinlerine,
- 57.8 kDa'lık proteinin juvenil hormon esteraza,

- 48.8 kDa'lık proteinin epidermis orjinli hemolenf proteinine (EOHP),
- 35.5, 34.8 ve 31.6 kDa'lık proteinlerin hemolenf ferritin proteinin alt ünitelerine,
- 32.4 kDa'lık proteinin juvenil hormon bağlayıcı proteine (JHBP),
- 14.5 kDa'lık proteinin lizozim aktivitesi gösteren peptitlere ait olabileceği düşünülmektedir (Ozyhar ve Kochman 1987; Martinez ve Wheeler 1993; Beintema ve ark. 1994; Haunerland 1996; Limura ve ark. 1998; Keane ve Ryan 1999; Ziegler ve ark. 1999; Godlewski ve ark. 2000; Lee ve ark. 2000; Kim ve ark. 2002; Lee 2003; Abul ve ark. 2004; Joe ve Yun 2004; Park ve ark. 2005; Huang ve ark. 2007).

Farklı dozlardaki (50-5000 ppm) GA₃ uygulamasına bağlı olarak bazı hemolenf proteinlerinin konsantrasyonlarında önemli değişiklikler tespit edildi. Bu proteinlerden 91.5, 57.8, 53.4, 35.5, 34.8 ve 31.6 kDa ağırlığında olan proteinlerin miktarı GA₃ dozlarına göre değişmekle birlikte genel olarak artış göstermektedir. Ferritin proteinin alt ünitelerine ait olabileceği düşünülen 35.5, 34.8 ve 31.6 kDa'lık proteinlerin özellikle 200 ppm'de artış göstermesinin nedeni GA₃'ün düşük dozlarda konağın hücrel demir homeostasisi üzerinde etkili olmuş ve emilimi arttırmış olabilir. Demir depolayan protein olarak da bilinen ferritin, böceklerde hemolenfte, yağ dokuda ve orta bağırsakda bulunmaktadır. Bulunduğu yere göre de alt üniteleri değişiklik göstermektedir. Ferritin, serbest demir iyonlarını bağlayarak demirin toksik etkilerini ortadan kaldırır. Çünkü, proteine bağlı olmayan demir iyonları serbest radikal oluşumuna neden olarak lipid peroksidasyonunu sağlamaktadır (Kim ve ark. 2002).

Konak son dönem larval hemolenfde Juvenil hormon bağlayıcı proteini (JHBP, 32.4 kDa) olabileceği varsayılan proteinin miktarının GA₃ uygulamasından etkilenmediği görülürken, juvenil hormon esteraz (JHE, 57.8 kDa) olabilecek proteinin miktarının doz artışına bağlı olarak hem kontrole göre hem de dozlar arasında artış gösterdiği çalışmamızda belirlendi. JHBP ve JHE proteinleri böceklerin büyüme, gelişme ve üreme mekanizmalarını düzenleyen juvenil hormonun hemolenfteki seviyesini belirleyen proteinlerdir. *Manduca sexta* larvalarının hemolenf proteinlerinden JHBP ile yapılan bir çalışmaya göre, bu hormonun üç alt üniteden oluştuğu ve larval gelişim süresince hemolenfteki

juvenil hormonun hedef hücelere taşınmasında görev aldığı bildirilmiştir. Bu proteinin lepidopter larvalarında düşük moleküler ağırlıklı oldukları ve özellikle de *M. sexta*'nın hemolenfinde 31 kDa ağırlığında olduğu belirlenmiştir (Orth ve ark. 2003). Doğal juvenil hormonlar stabil değildir ve bunlar böceklerin hemolenfinde bulunan esterazların etkisi ile kolaylıkla bozulabilmektedir. Bu nedenle corpora allata'dan hemolenfe sentezlenen JH hemen JHBP ile kompleks oluşturarak dayanıklı hale getirilir ve esterazların olumsuz etkisinden korunurlar (Ozhyar ve Kochman 1987). JHE, böceklerde zehirli maddelerin detoksifikasyonunda da rol olan karboksilesteraz enzimlerine ait ailenin bir üyesidir (Kamita ve ark. 2003). Birçok böceğin larva ve erginlerinin dokularında ve hemolefinde tanımlanmış olan JHE, juvenil hormonunu (JH) parçalayan katabolik bir enzimdir. JH sentezini ve JH-reseptör interaksyonlarını bloke etmekte etkilidir. JHE, Lepidoptera takımına ait türlerde juvenil hormonun hemolenfteki seviyesini düzenleyerek, metamorfozu ve gelişimi kontrol eder (Kamita ve ark. 2003). Holometabol böceklerde larval dönemin sonlandırılması ve pupal döneme geçişin sağlanması iki temel hormon olan juvenil ve ecdysteroid hormon tarafından sağlanmaktadır. Son evreye ulaşan larva hemolenfindeki JH seviyesi JHE tarafından azaltılarak, hemolenfteki ecdysteroidlerin seviyesi yükseltilir. Böylece larval dönemden pupal döneme geçiş sağlanır (Goodman 1983). Bu bilgilerin doğrultusunda, JHE olabileceği düşünülen 57.8 kDa'lık proteinin miktarının GA₃ uygulamasına bağlı olarak artış göstermesinin nedeninin, GA₃'ün larval hemolenfteki JHE sentezlenmesini artırarak JH seviyesinin baskılanmasından kaynaklanmış olabilir (De-Kort ve Granger 1981; Ozhyar ve Kochman 1987; Orth ve ark. 2003; Kamita ve ark. 2003). Uçkan ve ark. (yayına gönderildi)'nın 50-5000 ppm doz aralığındaki GA₃'ün *Galleria mellonella*'nın larval döneminin süresini kısalttığını belirlemeleri de düşüncemizi desteklemektedir. Bu nedenle, terpenoid bir bileşik olan ve kimyasal yapısı juvenil hormona benzerlik gösteren GA₃'ün böceklerde besinle doğrudan alınarak vücutta metabolize edilmeleri sırasında, juvenil hormon üzerinde etkili olan esterazlar ve hidrolazlar üzerinde etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

GA₃ uygulamasına bağlı konak *G. mellonella*'nın larval hemolenf proteinlerinin genel olarak artış göstermiş olması da, GA₃'ün bitkilerdeki gibi

böceklerde de larval gelişimi hızlandırdığına işaret etmektedir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda da GA₃'ün çeşitli böceklerde larval yaşam süresinin, toplam verim ve ergin hayat uzunluğunun azaldığı tespit edilmiştir (Harikesh ve Bhattacharya 2003; Kaur ve Rup 2003b; Uçkan ve ark. basılmadı). *G. mellonella* üzerinde yapılan bir çalışmada 50-5000 ppm arasındaki dozlarda uygulanan GA₃'ün *G. mellonella*'nın toplam hemolenf proteinlerini artırdığı belirlenmiştir (Uçkan ve ark. basılmadı). Bir diğer çalışmada ise, GA₃'ün farelerde guanilat siklaz aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Guanilat siklaz aktivitesinde meydana gelen artış sonucunda da, RNA ve protein sentezinde artış meydana geldiği için hayvanlarda da gelişimin hızlandığı bildirilmiştir (Vesely ve ark. 1985). Aynı zamanda hemolenf proteinlerinin ksenobiyotikler olarak değerlendirilen, çeşitli toksik bileşiklerden etkilendikleri de değişik çalışmalarda gösterilmiştir (Nath ve ark., 1997; Sak ve ark., 2006). Bu çalışmalardan bazılarında özellikle pestisit toksitesine bağlı olarak hemolenfdeki ve yağ dokudaki total protein miktarının azaldığı, serbest amino asit konsantrasyonunun ve proteaz aktivitesinin ise artarak oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olduğu belirlenmiştir (Nath ve ark., 1997; Sak ve ark., 2006). Bazı araştırmacılar ise insektisitlerin detoksifikasyonunda ihtiyaç duyulan proteinazların sentezi ve enerji kaynağı amacıyla protein sentezinin arttığını bildirmektedirler (Wilkinson 1976; Shakoori ve Saleem 1989; Shakoori ve ark. 1993). Wilkinson (1976), larval hemolenfinden, yağ dokudan ve diğer dokulardan yeni proteinlerin sentezlenmesinin protein miktarının artmasına neden olduğunu ve bu durumu bir çeşit detoksifikasyon mekanizması olarak değerlendirmiştir. Detoksifikasyonla ilişkili mikrozomal enzimlerin sentezlenmesinin de, protein sentezinin artışına bağlı olduğunu vurgulamıştır. *G. mellonella*'nın larval hemolenfi ile ilgili bazı toksikolojik çalışmalarda da, larvalar değişik fungus türleri ile enfekte edildiğinde, larvalara bir insektisit olan deltamethrin uygulandığında ve kütikulaya mekanik zarar verildiğinde hemolenfte hem toplam hem de farklı esteraz aktivitelerinin arttığı görülmüştür (Serebrov ve ark. 2001). Bütün bu çalışmalar, yaptığımız çalışmadaki hemolenf proteinlerinin neden artış gösterdiğini açıklamakta ve sonuçlarımızı desteklemektedir.

Lepidopter larvalarının hemolenflerinde genellikle en büyük protein bantları 60-90 kDa arasında bulunan çeşitli proteinlerdir (Beintema ve ark. 1994). Bu

çalışmada da en büyük protein bandı 65.6 kDa ağırlığında ve aynı proteinin iki alt üniteden oluşan depo proteinlere ait olduğu varsayılmaktadır. Holometabol böceklerin gelişim dönemlerinde larval dönemin plazma proteinleri, başkalaşımın devam edebilmesi için oldukça önemlidir. Hemolenf proteinlerinin büyük bir bölümü özellikle de depo proteinleri, böceğin larval gelişimi sırasında yağ doku tarafından sentezlenirler ve hemolenfe salınırlar. Böceğin gelişiminin devam etmesi ile birlikte, bu proteinler pupal dönemde yağ doku içerisinde protein granülleri şeklinde çökerler. Daha sonra da ergin gelişiminde gerekli olan amino asit kaynaklarını sağlayabilmek için proteolitik olarak amino asitlerine parçalanırlar (Levenbook 1985; Telfer ve Kunkel 1991, Wheeler ve Martinez 1995). Bu proteinler son larval evrenin beslenme fazı boyunca hemolenfte bol miktarda bulunmaktadır (Levenbook 1985). Bu proteinin yüksek GA₃ dozlarında azalması da larval dönemin hormonal aktivitesinin değiştiğinin, pupal döneme geçişin hızlandığının ve larval gelişim üzerinde toksikolojik etki gösterdiğinin bir diğer kanıtıdır.

Tüm hayvanların kan ya da hemolenf gibi vücut sıvılarındaki lipitlerin taşınmasında ve lipit metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan proteinler “lipoproteinler” olarak bilinmektedir. Çalışılan birçok böcek türünün hemolenfinde benzer tiplerde lipoproteinler bulunmuştur. Bu hemolenf proteinleri genel olarak “lipoforinler” şeklinde isimlendirilmektedirler (Soulages ve Wells 1994; Ryan ve Van der Horst 2000). Bu proteinler böceklerin hemolenfindeki doğal hidrofobik bileşiklerin ve ksenobiyotiklerin taşınmasında çok önemli fonksiyonları üstlenirler (Shapiro ve ark. 1984). Lipoforinler iki apoprotein içeren bir proteinden ve yaklaşık %40-50’lik bir bölümü de lipitten oluşmaktadır. Apoproteinler böceklerde genel olarak Apolipoforin-I (ApoLp-I) yaklaşık 240 kDa ve Apolipoforin-II (ApoLp II) ise yaklaşık 80 kDa ağırlığındadır. Bu iki kompleksten meydana gelen lipoforinler yüksek yoğunluklu lipoforinlerdir (HDLp). HDLp’ler lipitlerle yüklendikleri zaman düşük yoğunluklu forma (LDLp) dönüşürler. Lipoforinler yağ dokudan lipit alınımını başlatarak, lipit ihtiyacı olan diğer dokulara lipitleri taşırlar. Lipitlerini bırakan lipoforinler ise yağ dokuya tekrar HDLp’ler formunda gelmektedirler. Ayrıca lipoforinlerin lipit taşıma kapasitesini artıran üçüncü bir Apoproteinde böceklerin hemolenfinde

belirlenmiştir (Kanost ve ark. 1995; Weise ve ark. 1998; Nakahara ve ark. 2002). Apolipoforin-III (ApoLp-III) olarak isimlendirilen bu protein, özellikle de larval dönemde beslenme yetersizliğinin olduğu durumlarda hemolenfte yüksek miktarda bulunmaktadır. Böylece büyük miktarda lipit taşınımına ihtiyaç olduğunda, iki alt üniteden oluşan lipoforinler yaklaşık 20 kDa ağırlığındaki ApoLp-III'le birleşirler ve lipit taşınımını artırır. *G. mellonella*'nın hemolenf proteinlerinden Apolipoforin-III proteininin analiz edildiği bir çalışmada, bu proteinin 18.1 kDa ağırlığında olduğu tespit edilerek böceğin lipit metabolizmasında önemli görevler üstlendiği üzerinde durulmuştur (Weise ve ark. 1998; Weers ve Ryan 2006). Bu çalışmada ise ApoLp-III olduğu düşünülen 18.2 kDa'lık proteinin, uygulanan GA₃ dozlarından önemli oranda etkilendiği ve hemolenfteki miktarının artış gösterdiği belirlendi. Bu durum GA₃'ün yağ dokudaki protein sentezini etkilediğini ve özellikle larvalarda lipit ihtiyacının dolayısıyla enerji ihtiyacının arttığını göstermektedir. GA₃ uygulamasına bağlı olarak *Z. paravittiger* larvalarındaki glikojen içeriğinin önemli oranda azaldığı (Rup ve ark. 1998), *Bactocera cucurbitae* ile yapılan bir diğer çalışmada ise benzer dozlardaki GA₃'ün total lipit ve total karbonhidrat seviyesinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Kaur ve Rup, 2003a; 2003b). Bu çalışmalarda hemolenfteki 18.1 kDa'lık proteinin artışının lipit metabolizmasıyla alakalı olabileceği hakkındaki düşüncemizi desteklemektedirler.

Bu çalışma, GA₃'ün fitofag böceklerin besinlerinde artan dozlarda alınmasıyla özellikle aktif beslenme periyodu olan larval dönemlerinin hormonal ve lipit metabolizmasını etkileyebileceğine işaret etmektedir. Ayrıca, GA₃'e konakları vasıtasıyla maruz kalan parazitoitlerde de benzer etkilere neden olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla *P. turionellae*'nin son evre larval hemolenf proteinleri analiz edildi. Çalışma sonucunda *P. turionellae*'nin son evre larval hemolenfde 252.6 – 20.5 kDa aralığındaki moleküler ağırlıkta proteinler belirlendi. Literatürde, *P. turionellae*'nin hemolenf proteinlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu üzerine bir çalışma bulunmamaktadır. Bunun yanında, aynı türün hemolenf proteinleri ilk kez bu çalışmada analiz edilmiştir. GA₃'ün belirlenen dozlarına konakları vasıtasıyla maruz kalan larvaların hemolenf proteinlerinde değişiklik gösteren proteinlerin çoğunun (252.6, 207.9, 59.5, 43.0

kDa) dozlara bağlı olmakla birlikte miktarları artış gösterdi. Bu proteinlerin hem elektroforetik dağılımları hem de diğer böceklerde yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda Apolipoforin-I, Apolipoforin-II, heksamerinlere ve juvenil hormon esterase ait olma olasılıkları vardır. 252.6 kDa'lık olan proteinin tüm dozlarda yüksek konsantrasyonda bulunması larval gelişim sırasında yağ dokuda lipit sentezinin etkilendiğinin ve dokularda lipit ihtiyacının artmış olabileceğini göstermektedir. Ancak Apo-III olabileceği düşünülen 20.5 kDa'lık proteinin miktarında değişiklik olmaması parazitoitin enerji ihtiyacının konak kadar yüksek olmadığını göstermektedir. Yapılan bir çalışmada *P. turionellae* yumurtalarının 2,4-diklorofenoksiasetik asit ve maleik hidrazin çözeltileri içerisine alınması sonucu embriyonik gelişim sırasında yumurta ve 30 saat sonra ilk larvaların glikojen değerlerinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Özkan ve Yanıkoğlu 1999). Aynı hormonların, Akdeniz meyve sineği, *C. capitata*'nın larvalarında da yüksek enerji ihtiyacı oluşturması nedeniyle glikojen miktarlarının çok düşük olduğu, bunun nedeni ise glikogenoliz ve trehalaz enzimlerinin aktivitesi ile ilgili olarak değerlendirilmiştir (Kaya ve Yanıkoğlu 1999; Nestel ve ark. 2003). Bu çalışmalarda da verildiği gibi metamorfozun başlangıcında enerji kaynağı olarak öncelikle hemolenf şekerleri kullanılmakta ve GA₃ gibi canlıda enerji ihtiyacını artıracak kimyasallara bağlı olarak lipit kullanımının da artacağı şeklinde değerlendirilmelidir. Lipit kullanımındaki artış ise lipitlerin taşınmasında rol oynayan proteinlerin sentezini de değiştireceğini göstermektedir.

Konak hemolenfinde olduğu gibi parazitoit larval hemolenfinde de juvenil hormon esterase (Kamita ve ark. 2003) olduğu düşünülen 59.5 kDa'lık proteinin miktarı düşük dozlardaki GA₃ uygulanmasına bağlı olarak yükseldi. Fakat juvenil hormon bağlayan protein (Ozhyar ve Kochman 1987; Orth ve ark. 2003) olabileceği düşünülen 31.6 kDa'lık proteinin hemolenfteki miktarı da doz artışına bağlı olarak azaldı. Her iki proteinde meydana gelen bu antogonistik değişim GA₃'ün konakta olduğu gibi özellikle de düşük dozlarda parazitoitin juvenil hormon düzenlenmesindeki mekanizmaları etkileyebileceğini göstermektedir. JH üzerindeki bu değişim ise BGD'lerin parazitoit canlıların gelişme ve verimi üzerinde değişik yönlerde etkili olacağını açıklamaktadır.

Böcek hemolenfinin diğer hayvanlardan farklı olan en önemli biyokimyasal özelliklerinden birisi de yüksek konsantrasyonda serbest aminoasit içermesidir. Hemolenfteki aminoasitler ozmoregülasyonun düzenlenmesinde, proteinlerin ve peptit hormonların sentezlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Serbest aminoasitlerin hemolenfteki konsantrasyonlarının besin kalitesine, biyolojik döneme, vücuttaki toksik bileşiklerin veya yabancı organizmaların varlığına göre değişiklik gösterdikleri daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir (Aboul-ela ve ark. 1991; Hanzal ve Jegorov 1991; Nath ve ark. 1997). Bu çalışmalardan bazılarında böceklerde fizyolojik strese neden olan fiziksel ve kimyasal faktörlere karşı oksidatif stresin meydana gelmesi sonucunda hemolenfteki amino asit miktarının arttığı bildirilmiştir (Aboul-ela ve ark. 1991; Hanzal ve Jegorov 1991; Nath ve ark. 1997). Bu çalışmada ise hem konak hem de parazitoitin larval hemolenfindeki serbest aminoasitler analiz edildi ve bazı aminoasitlerin konsantrasyonlarının uygulanan GA₃ dozlarına göre farklı değişimler gösterdikleri belirlendi.

Konak *G. mellonella* son dönem larval hemolenfinde uyguladığımız yönteme ve standartlara bağlı olarak 18 farklı serbest aminoasit tanımlandı. Standartlarda bulunan aspartik asit ve sistein aminoasitleri hemolenfte belirlenemezken, bir aminoasitte kullandığımız standartlar içinde bulunmadığından tanımlanamadı. Parazitoit *P. turionellae* son dönem larval hemolenfinde ise sistein haricinde 19 serbest aminoasit belirlendi. Parazitoitin hemolenf serbest aminoasitleri ilk defa bu çalışmada analiz edildi. Her iki türün de hemolenfinde sistein aminoasitlerinin belirlenmemesi, sisteinin hızlı okside olmasından ve sisteik asit formlarında diğer bileşiklerle reaksiyona girmesinden kaynaklanmaktadır (Gonzalez-Castro ve ark. 1997).

G. mellonella'nın larval hemolenf serbest aminoasitlerinin o-fialdehit (OPA)-1-tiyo-β-D-glukoz türevlendirme ajanı kullanılarak analiz edildiği bir çalışmada hemolenfte glutamik asit, serin, asparajin, glutamin, treonin, glisin, histidin, alanin, arjinin, gamaaminobütirikasit (GABA), valin, fenilalanin, lösin ve lizin aminoasitleri olarak 14 primer aminoasit belirlenmiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar glutamin (%30.6), alanin (%23.8), GABA (%7.3) ve glisin (%6) aminoasitlerinin hemolenfte diğerlerine göre baskın olduklarını ve bulunan primer

aminoasitlerin %67.7'sini bu aminoasitlerin oluşturduğunu belirtmişlerdir (Hanzal ve Jegorov 1991). Bu çalışmada ise kontrol larvalarının hemolenfde Prolin (%37.4), Glutamin (%14.4), Arjinin (%8.5), Alanin (%6.4) ve bilinmeyen bir aminoasit (%6.6) baskın olarak belirlendi. Daha önce yapılan çalışmayla sonuçlarımız karşılaştırıldığında baskın aminoasitlerin benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda tanımlanmayan aminoasitin GABA'ya ait olma olasılığı yüksektir.

Konak hemolenf serbest aminoasitlerinin kantitatif analizi sonuçlarına göre, histidin, alanin ve metionin'in yüksek GA₃ dozlarından etkilendikleri ve hemolenfteki miktarlarının arttığı tespit edildi. Özellikle bu aminoasitlerden alaninin miktarı, 500, 1000 ve 2000 ppm'lik GA₃ dozlarının uygulandığı gruplarda kontrole göre yaklaşık iki katı oranda artış gösterirken, 5000 ppm'de de artışın devam ederek yaklaşık üç katına çıktığı görüldü. Bu aminoasitlerin hemolenfteki seviyesinin yükselmesi larval hemolenfteki depo proteinlerinin yüksek dozlarda azalmasıyla ve oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkan enerji ihtiyacıyla ilişkili olabilir. Yağ dokuda sentezlenen ve larval serum proteinleri olarak da bilinen bu proteinlerin hemolenfteki miktarının azalması ve alanin gibi primer aminoasit seviyesinin yükselmesi ise GA₃'ün de özellikle yüksek dozlarda (500–5000 ppm) insektisitler gibi benzer etkilere neden olabileceğini göstermektedir. İnsektisitlerle ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda da, insektisitlerin böcekler üzerindeki toksik etkilerinin oksidatif stresle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda insektisidal stres koşullarında böceklerin yağ doku proteinlerinin kilit rol oynadığı ve pestisit toksitesine bağlı olarak hemolenfdeki serbest aminoasit konsantrasyonunun ve proteaz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Harper ve ark. 1979; Nath ve ark. 1997; Sak ve ark. 2006). Araştırmacılar, insektisidal aktivite sonucunda dokulardaki protein katabolizmasının artmasını fizyolojik bir mekanizma olarak ortaya çıktığını ve bu koşullarda onarım mekanizmalarının önemli rol oynadığını vurgulamışlardır. Onarım mekanizmalarında enerji açığının ortaya çıkması nedeniyle de aminoasitler krebs döngüsünde gerekli olan ara ürünler için keto asitlere dönüştürülerek kullanılmaktadırlar (Rambabu ve Rao 1994; Sancho ve ark. 1998; Sak ve ark. 2006). Çalışmamızda elde edilen önemli verilerden bir diğeri ise prolin, lizin ve

fenil alanin aminoasitlerinin miktarlarının özellikle de yüksek GA₃ dozları uygulanan gruplarda azalmalarıdır. Bu aminoasitlerden prolinin'in gösterdiği değişimin aynı GA₃ dozlarında alaninle zıt bir ilişki göstermesi de önemli bir bulgudur. Prolinin doza bağlı azalması oldukça belirgin olup 5000 ppm'de %76 oranında kontrole göre azalma gösterdi. Genel olarak böcek hemolenfinde yüksek seviyede bulunan prolinin enerji metabolizmasında önemli görevleri vardır. Diğer aminoasitlere göre oksidatif yıkımı çok yüksek olduğu için metabolik faaliyetlerde, prolin dehidrogenaz enzimi aracılığıyla glutamatik aside okside edilerek krebs döngüsüne katılır. Böylece prolin aracılığıyla daha yüksek miktarda ATP üretilerek glukoz ya da lipid metabolizması düzenlenmektedir. Ayrıca prolinin oksidasyonu sırasında oluşan ara ürünlerden birisi de Alanin aminoasididir (Nation 2002). Bazı çalışmalarda da enerji ihtiyacının arttığı durumlarda hemolenfteki serbest prolin miktarının azalırken, alanin miktarının arttığı belirlenmiştir. Jabbar ve Strang (1985)'in yaptığı çalışmada da, çekirge ve hamamböceklerinde kimyasal ve fiziksel stres durumlarında hemolenf ve sinir dokuda meydana gelen kimyasal değişiklikleri araştırmışlardır. Çalışmada, ergin böceklere değişik insektisitler şırınga edilerek kimyasal stres ve 8-24 saat yürümeye zorlanarak fiziksel stres uygulanmıştır. Stres sonucu hem hemolenf hem de sinir dokuda, incelenen amino bileşiklerinden taurin miktarının iki katına çıktığı, prolin konsantrasyonunun ise önemli oranda azaldığı, diğer aminoasitlerdeki artış oranının ise istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, böceklerden izole edilen sinirler üzerinde yapılan elektrofizyolojik deneyler ile taurinin normal aktiviteleri inhibe ettiği ve in vivoda bu etkinin konsantrasyona bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir (Jabbar ve Strang 1985). Daha önce yapılan bu çalışmalar hemolenf serbest aminoasitlerinin artması ve azalması üzerindeki yorumlarımızı desteklemektedir. Kısacası, GA₃'ün yüksek dozlarda konakta oksidatif strese neden olarak lipid peroksidasyonunu arttırabileceği ve çeşitli ksenobiyotikler gibi serbest radikal oluşumuna neden olarak enerji ihtiyacını arttırmış olabileceğini öngörmekteyiz. Bu nedenle GA₃'ün antioksidan enzimler üzerinde etkisinin olup olmadığının belirlenmesine ilişkin çalışmaların yapılması gerektiğini önermekteyiz.

Parazitoit *P. turionellae*'nin larval hemolenf serbest aminoasit içeriğinde prolin (%45.7), arginin (%12.1) ve histidinin (%9.1) diğer aminoasitlere göre yüksek seviyede bulunduğu kantitatif analizler sonucu görülmektedir (Tablo 3.6). Çelik (1984), yaptığı çalışmada *P. turionellae*'nin larvalarının ergin evreye kadar büyüme ve gelişmesinde ihtiyaç duydukları aminoasitleri belirlemiştir. Çalışmada arjinin, histidin, izolösin, lösin, metionin, fenilalanin, triptofan, treonin ve valinin temel aminoasitler olduğu, bu aminoasitlerin besinle alınmadığı takdirde larvaların birinci evrede kaldıkları tespit edilmiştir. Bu aminoasitler birçok böcek türünde ve birkaç parazitoit türünde de esansiyel (zorunlu) aminoasitlerdir (Çelik 1984). Farklı dozlardaki (50-5000 ppm) GA_3 'ün konak besinine verilmesi nedeniyle, GA_3 'e maruz kalan *P. turionellae* larvalarının hemolenf serbest aminoasitlerinden metionin, izolösin, lizin, serin (Asparajin), glisin, histidin, arjinin, alanin, triozin ve valinin miktarları genel olarak artarken, aspartik asit ve fenil alaninin miktarı azaldı. Değişim gösteren aminoasitlerde de glisin, glutamin ve histidinin doz artışından önemli oranda etkilendikleri ve özellikle 200 ppm'lik GA_3 'ün proteinlerde de olduğu gibi artırıcı yönde etkisi olmaktadır. Bu aminoasitlerde prolin gibi enerji ihtiyacı durumunda, krebs döngüsündeki asetil koenzim-A (glisin, serin → pürivat → asetil-CoA) ve glutamik asit (arjinin, histidin, glutamin, histidin → glutamat → α -ketoglutarat) gibi ara ürünlerin oluşturulmasında kullanılarak oksidatif mekanizmalarda yer almaktadırlar (Consoli ve Vinson 2004). Bu durum hem konak hemde parazitoitin larval evresi sürecinde GA_3 'ün düşük dozlarda biyolojik aktiviteyi değiştirmedeğini ancak dozlardaki yükselmenin detoksifikasyon enzimlerinin ve çeşitli düzenleyici proteinlerin aktivitesini artırarak, metabolik faaliyetleri de hızlandırabileceğini göstermektedir.

Çevresel kirlenmeye neden olan değişik maddelerin omurgasız canlılarda hemositler ve diğer doku hücreleri üzerindeki etkileri bazı çalışmalarda araştırılmıştır (Pech ve Strand 2000; Lastra ve ark. 2001; Sewify ve Hashem 2001; Yamashita ve Iwabuchi 2001; Le ve ark. 2003; Teramoto ve Tanaka 2004; Suzuki ve Tanaka, 2006). Böcek hemositleri ile ilgili çalışmaların çoğunda açlık, enfeksiyon ve yaralanma gibi durumlarda hemosit miktarındaki değişiklikler (Gupta 1985; Sewify ve Hashem 2001; Lastra ve ark. 2001), mitoz bölünme, hemositlerin

farklılaşması (Yamashita ve Iwabuchi 2001), gelişimin farklı evrelerinde mitoz bölünme geçiren hemosit sayıları (Jones ve Liu 1968) ve hemosit fonksiyonları sırasında görülen apoptozis olayı (Pech ve Strand 2000; Le ve ark. 2003) araştırılmıştır. Ancak GA₃ gibi BGD'lerle ilgili bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu eksikliğin bu çalışma ve daha sonra yapılacak çalışmalar ile destekleneceği kanısındayız.

Hücrel bağışıklık tepkilerinin ortaya çıkmasında görev alan hemositlerin yapılarında ve fonksiyonlarında GA₃'ün etkilerinin belirlendiği bu çalışmada, öncelikli olarak konak *G. mellonella*'nın son evre larval dönem hemosit tipleri belirlendi. Bu amaçla hazırlanan preparatların mikroskopik incelemesi sonucunda *G. mellonella* larva hemolenfindeki hemosit tipleri prohemositler, plazmatositler, granülositler, siferülositler ve önositoidler olarak görüldü. Er ve ark. (2010)'nın çalışmalarında da *G. mellonella*'da aynı hemosit tiplerinin bulunması çalışmamızı desteklemektedir.

Çalışmamızda, konak larval toplam hemosit sayısının düşük GA₃ dozlarında (50 – 500 ppm) önemli oranda artış gösterdiği, yüksek dozlarda ise (1000 – 5000 ppm) değişiklik göstermediği görülmüştür. Lepidoptera'ya ait bazı türlerle yapılan çalışmalarda da hemolenfteki hemosit sayısının yaralanma, bakteriyel, fungal, viral enfeksiyon ve çeşitli stres koşullarına karşı da benzer değişiklik gösterdikleri belirlenmiştir (Ratcliffe ve ark. 1985; Norayanan 2004; Mowlds ve ark. 2008; Phukan ve ark. 2008; AbdEl-Aziz ve Awad 2010; Kim ve Kim 2010). Örneğin, Kiuchi ve ark. (2008)'nin yaptıkları çalışmada bir stres faktörü olan sıcaklık artışına bağlı olarak önce hemosit sayısı artarken, sıcaklık uygulanan süre uzadıkça hemosit sayısının azaldığı görülmüştür. Araştırmacılar bu durumun nedenlerini hücre döngüsünün durdurulmasından kaynaklandığı şeklinde açıklamışlardır. *G. mellonella* larvaları enfeksiyonla ve fiziksel strese neden olabilecek faktörlerle olduğu gibi (Mowlds ve ark. 2008) GA₃'ün giderek artan dozlarıyla başa çıkabilmek için önce yeni hemositlerin sentezlenerek immün savunmanın artırıldığı ancak, stres koşullarının devam etmesine bağlı olarak onarım mekanizmalarının da etkilenmesinden dolayı, bir süre sonra larval savunmanın zayıflayabileceğinin kanısındayız.

Lepidoptera’da dolaşımdaki hemositler hematopietik organdan salınmakta diğer yandan da hali hazırda dolaşımdaki hemositlerin mitoz bölünmesi ile sağlanmaktadır (Gardiner 2000; Huang ve ark. 2009). Kontrol gruplarımızdan elde ettiğimiz sonuçlar (%1.15) *G. mellonella*, *B. mori* ve *E. declarata* (Shapiro 1968; Jones 1970; Arnold ve Hinks 1976; Beaulaton 1979) türlerinde normal olarak dolaşımdaki hemositlerin yaklaşık %1-8’inin mitotik fazda olduğu bulgusu ile uyum içerisindedir. Böceklerde hücre bölünmesi böceğin gelişim evresine bağlıdır ve 20-hidroksiyekezon (20E) ve juvenil hormon (JH) gibi hormonların hemolenfteki konsantrasyonlarıyla düzenlenir (Kiuchi ve ark. 2008). Bu çalışmada genel olarak mitotik indeksin kontrol grubuna göre artmasına rağmen bu artış 5000 ppm’lik GA₃ dozunda önemlidir ve mitoz geçiren hemositlerin sayısı iki katına çıkmaktadır. Daha önce yapılan bir çalışmada da GA₃ gibi teşvik edici bir BGD olan IAA’nın üçüncü nesil farelerin kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksi arttırdığı belirlenmiştir. Bu durumun nedeni ise IAA’nın DNA ve RNA miktarlarını artırmasından dolayı olabileceği belirtilmiştir (Yılmaz ve Yüksel 2005). Bitkilerde de hücre bölünmesini uyarayan bu hormonlar böceklerde hücre döngüsünün düzenlenmesini kontrol eden molekülleri uyararak hücre bölünmesini artırmış olabilirler. Ancak, mitotik indeksteki bu artışın toplam hemosit sayısı ve farklı hemosit tipleri üzerinde etkili olmadığı belirlendi. Bu durumun nedeni ise larval gelişim süresini hızlandıran GA₃’ün hemolenfteki juvenil hormon seviyesini baskılamasından ve ecdyzon hormonunun hemolenfteki seviyesinin yükselmesinden kaynaklanabilir. İzzetoğlu ve Karaçalı (2003)’nin yaptıkları çalışmada *G. mellonella*’nın hemositlerinde 20-hidroksiyekezon’un doza bağlı olarak toplam hemosit sayısını azalttığını belirlenmesi de sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Hemositlerde, yabancı organizmalara veya toksik maddelere karşı immün tepkilerini ortaya koyarken nekrotik veya programlanmış hücre ölümlerinin meydana geldiği bilinmektedir (Pech ve Strand 2000; Le ve ark. 2003; Sung ve ark. 2003a; 2003b). Sunulan bu çalışmada ise GA₃’ün belirlenen dozlarında geç apoptotik indeksin yüksek dozlarda (500 – 5000 ppm) önemli artış gösterdiği, nekrotik hücrelerin ise tüm dozlarda yüksek olduğu ve canlı hücre sayısının sadece 5000 ppm’de önemli oranda azaldığı görüldü. Bu sonuçlar GA₃’ün de

böceklerde organofosforlu insektisitler gibi etki ederek nekrotik hücre ölümünü hızlandırdığını göstermektedir. Çünkü insektisitlerle yapılan çalışmalarda bu bileşiklerin yağ dokuda ve hemositlerde lipit peroksidasyonunu artırarak serbest radikal oluşumunu artırdığını, tümör nekrozis faktörlerinin, çeşitli stres proteinlerinin ve çeşitli hücresele enzimlerin salınımının artışına neden oldukları belirlenmiştir (Saleem ve Shakoori 1993; İçen ve ark. 2005; Uçkan ve Sak 2010). BGD'lerle yapılan az sayıdaki çalışmalarda ise, indol-3-asetik asitin insan fibroblast kültüründe DNA ve RNA miktarını artırdığı, farelerde ise bazı dokulara ait hücrelerdeki apoptotik aktiviteyi artırarak sıçan fetüslerinde mikroensefaliye neden olduğu belirtilmiştir (Kowalska 1991; Furukawa 2004). Ratlarda ise GA₃'ün hem tümör oluşumunu hem de oksidatif stresi artırarak mast hücrelerinin aktivitesini yükseltmiştir (Erin ve ark. 2008). Daha önce yapılan bu çalışmalar da sonuçlarımızın güvenilirliğini güçlendirmektedir.

Lepidopterlerde hemosit aracılı enkapsülasyon böcek bağışıklık sisteminin en önemli unsurlarından biridir (Rowley ve Ratcliffe 1981; Gupta 1985; Schmidt ve ark. 2001; Richards ve Edwards 2002). Bu tepki yabancı patojenin kendinden olmayan olarak algılanması, bunun etrafında çok yoğun yassılaştırmış hemosit tabakalarının oluşması ve hemosit tabakalarında kısmi veya komple melanizasyon sonucu patojenin öldürülmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Rowley ve Ratcliffe 1981; Richards ve Edwards 2002). GA₃'ün böceklerin enkapsülasyon davranışlarında etkili olup olmadığını belirlemek için konak son evre larvalarında in vivo enkapsülasyon analizleri yapıldı. Analizler sonucunda, GA₃'ün tüm dozlarında erken evre enkapsülasyon (4. saat) durumunda, enkapsüle olmamış ve güçlü enkapsüle olmuş boncuk sayısını arttırdığı, geç evre enkapsülasyonda (24. saat) ise zayıf enkapsüle olmuş boncuk sayısını artırırken, güçlü enkapsüle boncuk sayısını önemli oranda azalttığı görüldü. Enkapsülasyonun son evresinde güçlü enkapsülasyonun azalma göstermesi ApoLp-III olarak düşünülen proteinin miktarının artışı ile alakalı olabilir. Çünkü, yapılan bir çalışmada, *Galleria mellonella* beşinci evre larvalarında bu proteinin hemositlerin lam üzerine yapışma özelliklerini azaltarak hemositlerin enkapsülasyon davranışlarını etkilediği belirlenmiştir (Whitten ve ark. 2003). Böceklerde kütikular yaralanma veya vücut boşluğu içerisine yabancı

organizmaların girmesi durumunda ortaya çıkan hemosit aracılı enkapsülasyon reaksiyonlarının sonucu olarak melanizasyon gerçekleşmesi de genel bir durumdur (Nappi 2000). Melaninin serbest radikal süpürücü etkisinden dolayı, enkapsülasyon esnasında parazitoit yumurtası üzerinde melanin birikmesi, sitotoksik radikallerin enkapsülasyon bölgesini hedef almasını, immün savunmanın sadece yabancı yüzey üzerinde gerçekleşmesini ve konak açık dolaşım sistemi içerisinde sitotoksik moleküllerin diğer bölgelere yayılmamasını sağlar (Riley 1997; Carton ve Nappi 1997). Yaralanma veya savunma tepkileri sonucu oluşan melanizasyon reaksiyonları böceklerde hemositlerden salınan fenoloksidaz aktivitesine dayandırılmaktadır (Nappi 2000). Bu çalışmada enkapsüle olan boncuklardaki melanizasyon durumları da incelendi ve genel olarak GA₃'ün tıpkı enkapsülasyondaki etkisi gibi, tüm dozlarda 24. saatteki melanizasyon durumunun azalmasına neden olduğu görüldü. Bu durum GA₃'ün özellikle 200 ppm'den sonra larval hemolenfindeki fenoloksidaz aktivitesini azaltarak bağışıklık sisteminin zayıflamasına neden olabileceğini göstermektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada *G. mellonella* larvaları fungal enfeksiyona maruz bırakıldıklarında fenoloksidaz aktivitesinin azalması ve lizozomal aktivitenin artmasının belirlenmesi de düşüncemizi desteklemektedir (Bogus ve ark. 2007).

Sonuç olarak, konak besininde artan miktarlarda GA₃ bulunması, juvenil hormonun düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen proteinlerin hemolenfteki miktarında, enerji metabolizmasında ve onarım mekanizmalarında etkili olan aminoasitlerin miktarında, hemosit sayısında, mitotik indekste ve hücrel immün yanıtta değişikliklere neden olabilir. Tüm bu fizyolojik değişiklikler ise son zamanlarda yapılan bir çalışmada da gösterildiği gibi *G. mellonella*'nın zararlı olan larval döneminin süresinin kısılmasına neden olmuş olabilir (Uçkan ve ark. Basılmadı). *P. turionellae*'nin biyolojik ve biyokimyasal özelliklerinde konak aracılığıyla alınan GA₃ yüksek dozlar dışında çarpıcı değişikliklere neden olmamıştır. Bu nedenle GA₃, IPM programlarında geleneksel sentetik organopestisitler yerine zararlılara karşı uygun dozlarda olmak şartıyla kullanılabilirler.

Bu çalışmada öngörülen GA₃ ile juvenil ve ektizon hormonları arasındaki ilişkinin kesinliğe ulaştırılması için, GA₃'ün farklı dozlarının böcek hormonları

üzerindeki etkilerinin daha sonraki çalışmalarda belirlenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abdellatif, A.G., Preat, V., Vameco, J., Nilsson, R. ve Roberfroid, M. (1990), "Peroxisome proliferation and modulation of rat liver carcinogenesis by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, perfluorooctanoic acid and nafenopin", *Carcinogenesis*, **11**(11):1899-1902.
- Abd El-Aziz N. ve Awad H. H. (2010) "Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections," *Micron*, **41**: 203-209.
- Abul A., Vasanthi P., Hansen I. A., Scheller K. ve Dutta-Gupta A. (2004), "The insect hemolymph protein HP19 mediates the nongenomic effect of ecdysteroids on acid phosphatase activity," *J. Biol. Chemist.*, **279** (27), 28000-28008.
- Ahmad, M., Arif, M.I. ve Attique, M.R. (1997), "Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan," *Bull. ent. Res.*, **87**, 343-347.
- Ahmad, M. (2008), "Potentiation between pyrethroid and organophosphate insecticides in resistant field populations of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lep:Noc.) in Pakistan," *Pest. Biochem. Physiol.*, **91** (1), 24-32.
- Aldırmaz, N. (2004), *Kurşun asetatin bir decapoda türü olan Palaemonetes turcorum'un hepatopankreatik seka hücreleri üzerindeki ince yapı değişiklikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Andow, D.A., Ragsdale, D.W. ve Nyvall, R.F. (1997) *Ecological Interactions and Biological Control*, Westview Press, Colorado, 334.
- Arnold, J.W. ve Hinks, C.F. (1976), "Haemopoiesis in Lepidoptera. I. A note on the multiplication of spherule cells and granular haemocytes," *Can. J. Zool.*, **61**, 275-277.
- Asgari, S. ve Schmidt O. (1994), "Passive protection of eggs from the parasitoid, *Cotesia rubecula*, in the host, *Pieris rapae*," *J. Insect Physiol.* **40**,789-795, 1994.

- Ashhurst, D.E. ve Richards, G., (1964), "Some histochemical observations on the blood cells of the wax moth, *Galleria mellonella* L.," *J. Morph.*, **114**, 247-254.
- Ashida, M., Ochiai, M. ve Niki, T. (1988), "Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of silkworm *Bombyx mori*," *Tissue&Cell.*, **20**, 599- 610.
- Awad, T.M. ve Taha, F.A. (1976), "The effect of some plant growth inhibitors on the developmental stages of *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep.: Noctuidae)," *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, **80** (3), 306-310.
- Bakr S.M., Moussa E.M. ve Khater E.S. (1999), "Cytogenetic evaluation of gibberellin A₃ in Swiss albino mice," *J Union Arab Biol.*, **11** (A), 345-51.
- Barchuk, A. R., Bitondi, M. M. Ve Simoes, Z. L. (2002) "Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*," *J. Insect. Sci.*, **2**, 1-8.
- Bariola, L.A., Kittock, D.L., Arle, H.F., Vail, P.V. ve Hennebery, T.J. (1976), "Controlling pink bollworms: Effects of chemical termination of cotton fruiting on populations of diapausing larvae," *J. Econ.Entomol.*, **69** (5), 633-639.
- Beaulaton, J. (1979), "Hemocytes and hemocytogenesis in silkworms", *Biochimie.*, **61**, 157- 164.
- Beckage, N. E., (1993), *Games parasites play: the dynamic roles of proteins and peptides in the relationship between parasite and host*, Academic Press, California, A.B.D.
- Beckage, N. E. ve Kanost, M. R. (1993), "Effects of parasitism by the braconid wasp *Costesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*," *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **23**, 643-653.
- Beintema, J. J., Stam, W. T., Hazes, B. ve Smidt, M. P. (1994), "Evolution of Arthropod Hemocyanins and insect storage proteins (Hexamerins)," *Molec. Biol. Evol.*, **11**(3), 493-503.

- Bhalla, O.P. ve Robinson, A.G. (1968), "Effect of chemosterilants and growth regulators on the pea aphid and artificial diet", *J. Econ. Entomol.*, **61** (2), 552-555.
- Biddinger, D.J. ve Hull, L.A. (1999), "Sublethal effects of selected insecticides on growth and reproduction of a laboratory susceptible strain of tufted apple bud moth (Lepidoptera: Tortricidae)", *J. Econ. Entomol.*, **92**(2), 314-324, 1999.
- Bidwell R. G. S. (1974), *Plant Physiology*, Macmillan, U.S.A., 502-506.
- Bloemen, L.J., Mandel, J.S., Bond, G.G., Pollock., A.F., Vitek, R.P. ve Cook, R.R. (1993), " An update of mortality among chemical workers potentially exposed to the herbicide 2,4- dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives," *Jom.*, **35** (12), 1208- 1212.
- Bogus M.I., Kedra E., Baniab J., Szczepanikc M., Czygiera M., P. Jablonskid, Pasztaleniecd A., Samborskia J., Mazgajska J. ve Polanowski A. (2007), "Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection," *J. Insect Physiol.*, **53**(9), 909-922.
- Boman, H.G., Faye, I., Gudmundsson, G.H., Lee, J.Y. ve Lidholm, D.A. (1991), "Cell free immunity in Cecropia. A model system for antibacterial proteins," *Eur J Biochem*, **201**, 23-31.
- Brehelin, M. ve Zachary, D. (1986), "Insect haemocytes: a new classification to rule out controversy," *In: Immunity in Invertebrates* (Ed: Brehelin, M.), Springer Verlag, Berlin, 36-48.
- Brey, P.T., Lee, W.J., Yamakawa, M., Koizumi, Y. ve Perrot, S. (1993), "Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasions and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 6275-6279.
- Bronskill, J. F. (1961), "A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae)," *J. Lepidopt. Soc.* **15**, 102-104.
- Brown, E. (2002), "*Pathology: PreTest Self – Assessment and Review*," McGraw-Hill Professional Publishing, 545.

- Büyüküz, K. (2006), "Malathion-induced oxidative stress in a parasitoid wasp: effect on adult emergence, longevity, fecundity, ve oxidative ve antioxidative response of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae)," *J. Econ. Entomol.*, **99**, 1225-1234.
- Canyurt, M.A. (1994), "Tarımda pestisit kullanımının su ürünleri üzerine etkileri", *Kıyı Sorunları ve Çevre Sempozyumu*, Belediye Yayınları, Kuşadası, No:7, 345.
- Campbell N. A. ve Reece, J. B. (2008), *Biyoloji, 6. baskıdan çeviri* (Ed: Gündüz, E., Demirsoy, A., Türkan, İ.), Palme Yayıncılık, Ankara, 808.
- Carlisle, D.B., Ellis P.E. ve Osborne, D.J. (1969), "Effects of plant growth regulators on locusts and cotton stainer bugs," *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 391-393.
- Carson, R. D. ve Crowetti A. J. (1988), *Commercial uses of gibberellins and cytokinins and new areas of applied research*, Springer-Verlag, Hiedelberg.
- Carton, Y. ve Nappi, A.J. (1997), "Drosophila cellular immunity against parasitoids," *Parasitol. Today*, **13**, 218-227.
- Celik İ., Özbek H. ve Tuluçe Y. (2002), Effects of subchronic treatment of some plant growth regulators on serum enzyme levels in rats, *Turk. J. Biol.*, **26**, 73-76.
- Cendoroglo, M., Jaber, B., Balakrishnan, L., Perianayagam, V. S., King, M. ve Pereira, B.J.G. (1999), "Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia," *J. Am. Soc. Nephrol.*, **10**, 93-100.
- Chapman, R.F. (1998), *The Insects: Structure and Function*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Chen, Y. H. ve Welter S. C. (2002), "Abundance of a native moth *Homoesoma electellum* (Lep:Pyralidae) and activity of indigenous parasitoids in native and agricultural sunflower habitats," *Environ. Entomol.*, **31** (4), 626-636.
- Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, Ch., Hoffmann, J.A.ve Letellier, L. (1998), "Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*," *J. Biol. Chem*, **268** (26), 19239-19245.

- Consoli, F. L. ve Vinson, S. B. (2004), "Host regulation and the embryonic development of the endoparasitoid *Toxoneuron nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae)," *Comp. Biochem. Physiol. B*, **137**: 463–473.
- Costa, S. C. P., Ribeiro, C., Girard, P.A., Zumbihl, R. ve Brehelin M. (2005), "Modes of phagocytosis of Gram- positive and Gram- negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes," *J Insect Physiol.*, **51**, 39-46, 2005.
- Cox, C. (1996), "Insecticide Factsheet. Cypermethrin," *J. Pest. Reform*, **16**(2), 15-20.
- Çelik S. (1984), "Pimpla turionellae L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)'nın aminoasit ihtiyaçları," *Doğa Bilim Dergisi*, A2, **8, 3**, 321-329.
- Dahlman, D. L. ve Vinson, B. (1979), " Glycogen content in *Heliothis virescens* parasitized by *Microplitis croceipes*," *Comp. Biochem. Physiol.*, **66A**, 625-630.
- Da Silveira, E.B., Ribeiro, B.M. ve Bão, S.N. (2003), "Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)," *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **35**, 129-139.
- Denlinger D.L. (2002)," Regulation of diapause," *Ann. Rev. Entomol.*, **47**, 93-122.
- Dreyer, D.L., Campbell B.C. ve Jones, K.C. (1984), "Effect of bioregulator-treated sorghum on greenbug fecundity and feeding behavior: Implication for host-plant resistance," *Phytochemistry*, **23** (8), 1593-1596.
- Dobrev, P.I., Havlicek, L., Vagner, M., Malbeck, J. ve Kaminek, M. (2005), "Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography," *J. Chromatog. A.*, **1075** (1-2), 159-166.
- Doutt, R. L. (1959), "The Biology of Parasitic Hymenoptera," *Ann. Rev. Ent.*, **4**, 161-182.
- Dunn, P.E., Bohnert, T. ve Russell, V.W. (1994), "Midgut antibacterial defenses of *Manduca sexta* following infection and during metamorphosis," *In: Phylogenetic Perspectives in Immunology: The Insect Host Defense* (Ed:

- Hoffmann, J.A., Janeway, C.A. Jr. ve Natori, S. R.G.), Landes Company, Austin, 105-111.
- Edge, J.M., Benedict, J.H., Carroll, J.P. ve Reding, H.K. (2001), "Bollgard Cotton: An assessment of global economic, environmental and social benefits," *J. Cotton Sci.*, **5**, 121-136.
- Elad, Y. ve Shtienberg, D. (1995), "*Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration," *Integrated Pest Management Reviews*, **1**, 15-29.
- El-Ibrashy, M.T. (1972), "The sterilent activity of certain biologically active compounds against *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lepid., Noctuidae)," *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, **71** (3), 326-332.
- El-Mofty, M.M., Sakr, S.A., Rizk, A.M. ve Moussa, E.A. (1994), "Carcinogenic effect of gibberellin A₃ in Swiss albino mice," *Nutr Cancer.*, **21**, 183-90.
- Elo, H.A., Hervonen, H. ve Ylitalo, P. (1988), "Comparative study on cerebrovascular injuries by three chlorophenoxyacetic acids (2,4-D, 2,4,5-T and MCPA)," *Comp. Biochem. Physiol.*, **90C** (1), 65-68.
- Ergin, E., Er A., Uçkan, F. ve Rivers, D.B. (2007), "Effects of cypermethrin exposed hosts on egg-adult development time, number of offspring, sex ratio, longevity, and size of *Apanteles galleriae* Wilkinson (Hymenoptera: Braconidae)," *Belg. J. Zool.*, **137**, 27-31.
- Er A., Uçkan F., River D. B. ve Sak O. (2011), "Cytotoxic effects of parasitism and application of venom from the endoparasitoid *Pimpla turionellae* on hemocytes of the host *Galleria mellonella*," *J. Appl. Entomol.*, **136**, 225-236.
- Erin N., Afacan B., Ersoy Y., Ercan F. ve Balcı M.K. (2008), "Gibberellic acid, a plant growth regulator, increases mast cell recruitment and alters substance P levels," *Toxicology* **254**, 75-81.
- EPA, (1995), Reregistration eligibility decision (RED), Gibberellic acid, United States Environmental Protection Agency, 738-R-96-005.
- Faulds, W. (1991), "Spread of *Bracon phylacteophagus*, a biocontrol agent of *Phylacteophaga froggatti*, and impact on host," *New Zealand Journal of Forestry Science*, **21** (2/3), 185.

- Florkin, M. ve Jeuniaux. Ch. (1974), "Hemolymph: composition," In: Rockstein M (ed) *The physiology of insecta*, Vol 5, 2nd edn. Acedemic Press, Newyork, 255-307.
- Furukawa, S., Abe M., Usuda, K. ve Ogawa, I. (2004), "Indole-3-acetic acid induces microencephaly in rat fetuses," *Toxicol. Pathol.*, **32** (6).
- Gardiner, E.M.M. ve Strand, M.R. (2000), "Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*," *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **43**, 147-164.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R. ve Trenczek, T. (1997), "Biological mediators of insect immunity," *Annu. Rev. Entomol.*, **42**, 611-643.
- Giulianini, P.G., Bertolo, F., Battistella, S. ve Amirante, G.A. (2003), "Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis," *Tissue Cell.*, **35**, 243-251.
- Glatz, R.V., Asgari, S., Schmidt, O. (2004), "Evolution of polydnviruses as insect immune suppressors," *Trends in Microbiol.* **12**, 545-554.
- Godfray, H.C.J. (1994), *Parasitoids. Behavioral and evolutionary ecology*, Princeton University Press, New Jersey, p. 473.
- Godlewski, J., Kludkiewicz, B., Grzelak, K., Cymborowski, B. (2001), "Experssion of larval hemolymph proteins genes and protein synthesis in the fat body of greater wax moth (*Galleria mellonella*) larvae during diapause," *J. Insect. Physiol.*, **47**: 759-766.
- Gonzalez-Castro, M. J., Lopez-Hernandez, M.J., Simial-Lozano, J. ve Oruna-Concha, M.J. (1997), "Determination of aminoacid in green beans by derivatization with phenylisothiocianate and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection," *J. Chromatog. Sci.*, **35**: 181-185.
- Goodman W. G. (1983), "In Endocrinology of Insects" (Ed: Downer, R.G.H. & Laufer H.), Liss Inc., New York, 147-159.
- Götz, P. ve Boman, H.G. (1985), "Insect immunity," In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, vol. 3, (Ed: Kerkut, G.A. ve Gilbert, L.I.), Pergamon Press, Oxford, 453-485.

- Göze, İ., Yelkovan, İ. ve Çınar Z. (1995), "Daminozid'in civcivlerdeki enzimatik etkiler ve histopatolojisi," *Tr J of Biology*, **19**, 217-222.
- Gupta, A.P. (1985), "Cellular Elements in the Hemolymph," *In: Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology* (Ed: Kerkut, G.A., L.I. Gilbert.), Pergamon Press, New York, (3):401-451.
- Gupta, P. ve Ferkovich, S.M. (1998), "Interaction of calyx fluid and venom from *Microplitis croceipes* (Braconidae) on developmental disruption of the natural host, *Heliocoverpa zea*, and two atypical hosts, *Galleria mellonella* and *Spodoptera exigua*," *J. Insect Physiol.*, **44**, 713-719.
- Gupta G., Yadav S. R. ve Bhattacharya A. K. (2009), "Influence of synthetic plant growth substances on the survivorship and developmental parameters of *Spilarctia obliqua* Walker (Lepidoptera: Arctiidae)," *J. Pest. Sci.*, **82**, 41-46.
- Günel, A. (1982), "Studies on the biology of the *Dibrachys boarmiae* (Warker) (Hym.: Pteromalidae) Parasitic on *Galleria mellonella* (L.)," *Z. Ang. Ent.*, **94**, 138-142.
- Güven, A. (1988), *Bitki Büyüme Maddeleri*, Ege Üniv. Fen Bilimleri Ens., Yüksek Lisans ve Doktora Öğrencileri için Ders Notları, Bornova.
- Hajek, A. E. (2004), *Natural Enemies: An introduction to biological Control*, Cambridge University Press, USA, 105-356.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C. (2007), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, A.B.D.
- Hamerski, M. R. ve Hall, R. W. (1988), "Laboratory Rearing of *Tetrastichus gallerucae* (Hym.: Eulophidae), an Egg Parasitoid of the Elm Leaf Beetle (Col. Chrysomelidae)," *J. Econ. Ent.*, **81** (5): 1503-1505.
- Hanzal R. ve Jegerov A. (1991), "Changes in free amino acid composition in hemolymph of larvae of the wax moth *Galleria mellonella* L. during cold acclimation," *Comp. Biochem. Physiol.*, **100A** (4), 957-962.
- Harikesh S., ve Bhattacharya. A.K. (2003), "Negative role of gibberellic acid on the developmental behaviour of *Spodoptera litura*," *Indian J. Entomol.* **65**, 293-297.

- Harper H. A., Rodwell V. M. ve Mayer P. A. (1979), *In Review of Physiological Chemistry*, 17th ed. Longe Medical Publications, Maruzer Company Limited, California,.
- Haschek, W.M. ve Rousseaux, C.G. (1998), *Fundamentals of Toxicologic Pathology*, Academic Press, Londra, B.K.
- Haurneland, N. H. (1996), "Insect storage proteins: gene families and receptors," *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **26**(8-9): 755-765.
- Hill, T.A. ve Foster, R.E. (2000), "Effect of insecticides on the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and its parasitoid *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae)," *J. Econ. Entomol.*, **93**(3), 763-768.
- Hillocks, R.J. (1995), "Integrated management of insect pests, diseases and weeds of cotton in Africa," *Integrated Pest Management Reviews*, **1**, 31-40.
- Hirashima, Y., Miura, K., Miura, T. ve Matsuda, S. (1990), "Studies on the biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus), functional responses of the egg-parasitoids *Trichogramma ostriniae* to host densities," *Sci. Bull. Fac. Agr.*, Kyushu Univ., 89.
- Hiroyasu, K. ve Yamanishi, T. (1997), "Low temperature effects on levels of some plant hormones at the flowering stage in rice panicles," *Plant Physiol.*, **67**, 45-49.
- Hoffmann, J. A. (2003), "The immune response of *Drosophila*," *Nature* **426**, 33-38.
- Honeyborne, C.H.B. (1969), "Performance of *Brevicoryne brassicae* on plants treated with growth regulators," *J. Sci. Food Agr.*, **20** (7), 388-390.
- Huang, Z., Shi, P., Chen, G., ve Du, J. (2007), "Effects of Azadirachtin on hemolymph protein expression in *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae)," *Ann. Entomol. Soc. Am.* **100**(2), 245-250.
- Huang, F., Shi, M., Yan-yan, Y. et al. (2009), "Changes in hemocytes of *Plutella xylostella* after parasitism by *Diadegma semiclausum*", *Arc Insect Biochem.*, **70**(3), 177-187.
- İçen, E., F., Armutçu, K., ve Büyükgüzel, A. (2005), "Biochemical stress indicators of greater wax moth exposure to organophosphorus insecticides," *J. Econ. Entomol.* **98**(2), 358-366.

- İzzetoğlu, S. ve Karaçalı, S. (2003), "The effects of 20-hydroxyecdysone on hemocytes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) in vitro conditions," *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, **16**(2), 33-238.
- Jabbar, A. ve Strang, R.H. (1985), "The effects of chemical and physical stress on the concentrations of amino compounds in the haemolymph and nervous system of locusts and cockroaches," *J. Insect Physiol.*, **31**(5), 359-370.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B. ve Soderhall, K. (2006), "Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization," *Immunobiology*, **211**, 213–236.
- Jones, J.C. ve Liu, D.P. (1968), "A quantitative study of mitotic divisions of haemocytes of *Galleria mellonella* larvae," *J. Insect Physiol.*, **14**, 1055-1061.
- Jones, J.C. (1970), "Hematopoiesis in insects," *In: Regulation of hematopoiesis*, (Ed: Gordon, A.S.), Appleton Press, New York, 7-65.
- Joe J. ve Yun H. K. (2004), "Purification of major hemolymph protein of great wax moth, *Galleria mellonella*," *Entomol. Research* **34**(3): 173-176.
- Kacar B., Katkat A. ve Öztürk Ş. (2002), *Bitki Fizyolojisi*, Vipaş A. Ş. Yayın No: 74, syf. 457-479, Bursa.
- Kadıoğlu A. (2004), *Bitki Fizyolojisi*, Esen Ofset Matbaacılık, syf. 259-296, Trabzon.
- Kamita, S.G., Hinton, A.C., Wheelock, C.E., Wogulis, M.D., Wilson, D.K., Wolf, N.M., Stok, J.E., Hock, B. ve Hammock, B.D. (2003), "Juvenile hormone (JH) esterase: why are you so JH specific?," *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**: 1261-1273.
- Kanost, M.R., Sparks, K.A. ve Wells, M.A.. (1995), "Isolation and characterization of apolipoprotein-III from the giant water bug (*Lethocerus medius*)," *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **25**, 759-640.
- Kanost, M.R., Jiang, H. ve Yu, X.-Y. (2004), "Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*," *Immunol. Rev.*, 198, 97–105.
- Kansu, Y. A. ve Uğur, A. (1984), "*Pimpla turionellae* (L.) (Hym., Ichneumonidae) ile Konukçusu Bazı Lepidopter Pupaları Arasındaki

Biyolojik İlişkiler üzerinde Araştırmalar,” *Doğa Bilim Dergisi* D2 **8** (2), 160-173.

Kaur, R. ve Rup, P. J. (2000), “Evaluation of regulatory influence of four plant growth regulators on the reproductive potential ve longevity of melon fruit by *Bactrocera cucurbitae*,” *Phytoparasitica* **30**, 224-230.

Kaur, R. ve Rup, P. J. (2003a), “Influence of four plant growth regulators on development of the melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett),” *Insect Sci. Appl.*, **23**, 121-125.

Kaur, R. ve Rup, P. J. (2003b), “Influence of some plant growth regulators (PGR) on biochemical profile in the larvae of melon fruit fly *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Trypetidae),” *Entomon* **28**, 89-95.

Kaya, B. ve Yanıkoğlu, A. (1999), “2,4-D ve 4-cPA'nın *Drosophila melanogaster*'in F₁, F₂ ve F₃ kuşaklarında gelişim süresi ve ergin birey sayısına etkileri,” *Tr. J. of Zoology*, **23** (Ek sayı 1), 297-301.

Keane, S. ve Ryan, M. F. (1999), “Purification, characterization and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.),” *Insect Biochem. and Mol. Biol.*, **29**, 1097-1104.

Kılınçer, N. (1975), “Untersuchungen über die hämocytaire abwehrreaktion der puppe von *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera) und über ihre hemmung durch den puppenparasiten *Pimpla turionellae* L. (Hym., Ichneumonidae),” *Z. ang. Ent.*, **78**, 340-370.

Kim, İ.S., Okubo, H. ve Fujieda, K. (1992), “Endogenous levels of IAA in relation to partenocarpy in cucumber,” *Elsevier Science Publishers*, B.V., Amsterdam, **52**, 1-8.

Kim, C.S., Gargas, M.L. ve Anderson, M.E. (1994), “Pharmacokinetic modeling of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in rat and in rabbit brain following single dose administration,” *Toxicology Letters*, **74**, 189-201.

Kim B. S., Lee, C. S., Seol, J. Y., Yun, C. Y. ve Kim, H. R. (2002), “Cloning and expression of 32 kDa ferritin from *Galleria mellonella*,” *Arch. Insect. Bichem. Physiol.*, **51**, 80-90.

Kim, G. S. ve Kim, Y. (2010), “Up-regulation of circulating hemocyte population in response to bacterial challenge is mediated by octopamine and 5-

hydroxytryptamine via Rac1 signal in *Spodoptera exigua*,” *J. Insect Physiol.* **56**, 559-566.

Kiuchi, T., Aoki, F. ve Nagata, M. (2008), “Effects of high temperature on the hemocyte cell cycle in silkworm larvae,” *J. Insect Physiol.* **54**, 454-461.

Kocaçalışkan, İ. (2005), *Bitki Fizyolojisi*, DPÜ. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 5. Baskı Kütahya.

Korsloot, A., Van Gestel, C.A.M. ve Van Straalen, N. M. (2004), *Environmental stress and cellular response in arthropods*, CRC Press, Boca Raton, FL.

Kosmider, B., Zyner, E., Osiecka, R. ve Ochocki, J. (2004), “Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP,” *Mutation Research*, **563**, 61-70.

Kowalska, E. (1991), “Influence of 3-indoleacetic acid on cytochemical changes in nuclei and cytoplasm of human fibroblasts in the cell culture,” *Folia morphol.* **50**, 13-26.

Kylsten, P., Kimbrell, D.A., Daffre, S., Samakovlis, Ch. ve Hulmark, D. (1992), “The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands,” *Mol. Gen. Genet.*, **232**, 335.

Kucharski, R., ve Maleszka, R. (2003), “Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*,” *J. Insect. Sci.* **3**, 1–8.

Kumar, V., Cotran, R.S. ve Robbins, S.L. (2003), “The liver and biliary tract,” *Roobins Basic Pathology*, Elsevier Saunders, Philladelphia, A.B.D., 592-633.

Laemmlı, U. K. (1970), “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage,” *T4. Nature*, **227**, 680-685.

Lastra, C.C.L., Gibson, D.M. ve Hajek, A.E. (2001), “Survival and differential development of *Entomophaga maimaiga* and *Entomophaga aulicae* (Zygomycetes: Entomophthorales) in *Lymantria dispar* hemolymph,” *J. Invertebr. Pathol.*, **78**, 201-209.

Lavine, M.D. ve Beckage, N. E. (1995), “Polydnviruses: Potent mediators of host insect immune dysfunction,” *Parasitology Today*, **11**, 368-378.

- Lavine, M.D. ve Strand, M.R. (2002), "Insect hemocytes and their role in immunity," *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**:1295–1309.
- Le, N.T., Asgari, S., Amaya, K., Tan, F.F. ve Beckage, N.E. (2003), "Persistence and expression of *Cotesia congregata* polydnavirus in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*," *J. Insect Physiol.*, **49**, 533-543.
- Lee, W.J. ve Brey, P.T. (1995), "Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm *Bombyx mori*," *Gene.*, **161**, 199-203.
- Lee, C.Y., Yap, H.H. ve Chong, N.L. (1996), "Insecticide resistance and synergism in field collected *German cockroache* (Dictyoptera: Blattellidae) in Peninsular Malaysia," *Bull. ent. Res.*, **86**, 675-682..
- Lee, Y. H., Lee, H. Y. ve Kim, H. R. (2000), "Purification and characterization of epidermis- origin hemolymph protein in *Galleria mellonella*," *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, **125**, 95-104.
- Lee, H. (2003), "Lysozyme as pathogen –recognition protein in the hemolymph of *Galleria mellonella*," *Korean J. of Entomol.*, **33** (3), 145-149.
- Levenbook, L. (1985), "Insect storage proteins," *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Ed: Kerkut, G. A., Gilbert L. I.), Vol.10., Pergamon Press, Oxford, 307-346.
- Levin, D.M. (2007), *An integrin required for the encapsulation immune response in the tobacco hornworm Manduca sexta L. (Lepidoptera: Sphingidae)*, Doktora Tazi, Kansas State University, College of Agriculture, Department of Entomology, Manhattan, Kansas.
- Limura, Y., Ishikawa, H., Yamamoto, K. ve Sehnal F. (1998), "Hemagglutinating properties of apolipoprotein III from the hemolymph of *Galleria mellonella* larvae," *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **38**: 119-125.
- Ling, E. ve Yu, X. Q. (2006), "Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells," *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 301-309.
- Liu, F., Miyata, T., Wu, Z. J., Li, C. W., Wu, G., Zhao, S. X. ve Xie, L. H. (2008), "Effects of temperature on fitness costs, insecticide susceptibility and heat shock protein in insecticide-resistant and susceptible *Plutella xylostella*," *Pest. Biochem. Physiol.*, **91** (1), 45-53.

- Lockey, T.D. ve Ourth, D.O. (1996), "Formation of pores in *Escherichia coli* cell membranes by a cecropin isolated from hemolymph of *Heliothis virescens* larvae," *Eur. J. Biochem.*, **236**, 263-271.
- Lourenco, A. P., Zufelato, M. S., Bitondi, M. M., ve Simoes, Z. L. (2005), "Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*," *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 541–552.
- Luckwill, L.C. (1981), *Growth Regulators in Crop Production*, Studies in Biology No. 129, Edward Arnold (Pub.) Ltd., London.
- Luo, K. ve Pang, Y. (2006), "*Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus inhibits *Microplitis bicoloratus* polydnavirus-induced host granulocytes apoptosis," *J. Insect Physiol.*, **52**, 795–806.
- Magro, S. R. ve Parra, J. R. P. (2004), "Comparison of artificial diets for rearing *Bracon hebetor* Say (Hym: Braconidae)," *Biological Control*, **29**, 341-347.
- Mansour, M.H. ve Dimetry, N.Z. (1976), "Effect of three plant growth regulators on the immature stages of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep.: Noctuidae)," *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, **80** (1), 88-93.
- Marmaras, V.J., Charalambidis, N.D. ve Zervas, C.G. (1996), "Immune response in insects: The role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization," *Arch Insect Biochem Physiol.*, **31**, 119-133.
- Martinez T. ve Wheeler D. (1993), "Identification of two storage hexamers in the ant, *Camponotus festinatus*: accumulation in adult queenless workers," *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **23**(2): 309-317.
- McDonald, R. E., Greany, P. D., Shaw, P. E., Schroeder, W. J., Hatton, T. T. ve Wilson. C. W. (1988), "Use of gibberellic acid for Caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa*) control in grapefruit," (Ed: Goren, R. ve Mendel, K.) *Proceedings of the Sixth International Citrus Congress*, Balaban Publications, Rehovot, Israel, 1147-1152.
- Metzger J.D. (1987), "Hormones and reproductive development," *In: Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development* (Ed: Davies, P.J.), Kluwer, Boston, 431-462.

- Mickel L. G. (1978), "Plant Growth Regulators, Controlling biological behavior with chemicals," *Chem. Eng. News.*, **56**, 18.
- Montagna, C.M., Anguiano, O.L., Gauna, L.E. ve De D'angelo, A.M.P. (1999), "Resistance to pyrethroids and DDT in a field-mixed population of Argentinean black flies (Diptera: Simuliidae)," *J. Econ. Entomol.*, **92**(6), 1243-1245.
- Morishima, I., Horiba, T., Iketani, M., Nishioka, E. ve Yamano, Y. (1995), "Parallel induction of cecropin and lysozyme in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*," *Dev. Comp. Immunol.*, **19**, 357-363.
- Mowlds, P., Barron, A. ve Kavanagh, K. (2008), "Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*, *Microbes and Infection*," **10**, 628-634.
- Nakahara, Y., Nakamura, M., Hiraoka, T. ve Iwabuchi, K. (2002), "Insect lipophorin and vertebrate lipoproteins support larval development of the endoparasitoid *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae) as dietary lipid sources," *Appl. Entomol. Zool.* **37**(4), 637-643.
- Nakamatsu, Y., Fujii, S. ve Tanaka, T. (2002), "Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hym: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes," *J. Insect Physiol.*, **48**, 1041-1052.
- Nakamatsu, Y. ve Tanaka, T. (2004), "Corelation between concentration of hemolymph nutrients and amount of fat body consumed in lightly and heavily parasitized hosts (*Pseudaletia separata*)," *J. Insect Physiol.*, **52**, 135-141.
- Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F. ve Carton, Y. (1995), "Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites," *Eur. J. Cell Biol.*, **68**, 450-456.
- Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F. ve Carton, Y. (2000), "Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity," *Nitric Oxide*, **4**, 423-430.
- Narayanan, K. (2004), "Insect defense: Its impact on microbial control of insect pests," *Current Science*, **86**, 800-813.

- Nath, B.S., Suresh, A., Varma, B.M. ve Kumar, R.P.S. (1997), "Changes in protein metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity," *Ecotoxicol. Environment. Safety*, **36**(2), 169-173.
- Nation J. L. (2002), *Insect Physiology and Biochemistry*, CRC press, Boca Raton, London, Newyork, Washington, D.C. 68-75.
- Nestel, D., Tolmasky, D., Rabosi, A., ve Quesada-Alleu, L.A. (2003), "Lipid, carbohydrates and protein patterns durind metamorphosis of the mediterranean fruit fly, *Ceratidis capitata* (Diptera: Tephritidae)," *Ann. Entomol, Soc. Am.*, **96** (3) 237-244.
- Neuwirth, M. (1973), "The structure of the hemocytes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera)," *J. Morph.*, **139**, 105-124.
- Nickell, L.G. (1985), "New Plant Growth Regulator Increases Grape Size," *Proc. 12th Annual Meeting*, Plant Growth Regulator Society of America, pp. 1-7.
- Nowak, J. ve Lawson, W. (1984), "Plant Hormones: The Outlook for Their Application," *Outlook on Agriculture*, **12**, No: 4.
- Obrycki, J. J., Tauber, M. J. ve Tauber, C. A. (1985), "*Perilitus coccinellae* (Hym.: Braconidae): Parasitization and Development in Relation to Host-stage Attacked," *Ann. Ent. Soc. Am.*, **78** (6), 852-854,.
- Ortel, J. (1991), "Effects of lead and cadmium on chemical composition and total water content of the pupal parasitoid, *Pimpla turionellae*," *Entomol. exp. appl.*, **59**(1), 93-100.
- Orth, A. P., Doll, S. C. ve Goodman, W. G. (2003), "Sequence, structure and expression of the hemolymph juvenile hormone binding protein gene in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*," *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **33**, 93-102.
- Osman, S.E. (1978), "Der Einfluß der imaginalernährung und der begattung auf die sekretproduktion der weiblichen genitalanhangsdrüsen und auf die eireifung von *Pimpla turionellae* L. (Hym., Ichneumonidae)," *Z. ang. Ent.*, **85**, 113-122.
- Öder, E. (1983), *Bal arısı hastalıkları*, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum, s.74.

- Önder, F. ve Çınarlı, İ. (1988), Reterdan etkili bitki hormonlarının böcekler üzerine yan etkileri, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, **25**(2), 329-339.
- Özer, M. (1961), “Arı kovanlarında önemli zarar yapan balmumu güvesi (*Galleria mellonella* L.) nin morfoloji, biyoloji ve yayılışı üzerinde araştırmalar,” *A.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Kürsüsü Çalışmalarından*, 26-35.
- Ozyhar, A. ve Kochman, M. (1987), “Juvenile-hormone-binding protein from the hemolymph of *Galleria mellonella* (L) isolation and characterization,” *Eur. J. Biochem.*, **162**, 675-682.
- Özkan, F. ve Emre, İ. (1997), “Oral yolla alınan organofosfatlı insektisit malathion’un *Pimpla turionellae* L. dişilerinin yaşam süresi, yumurta verimi ve açılımına etkisi,” *Tr. J. of Zoology*, **21**, 309-313.
- Özkan, A. ve Yanıkoğlu, A. (1999), “Effects of 2,4-D and maleic hydrazide on the glycogen level in the embryonic development of *Pimpla turionellae* (L.) (Hym., Ichneumonidae),” *J. Appl. Ent.*, **123**(4), 211-216.
- Özmen, M., Topçuoğlu, Ş., Bozcuk, S. ve Bozcuk, N.A. (1995), “Effects of abscisic acid and gibberellic acid on sexual differentiation and some physiological parameters of laboratory mice,” *Turk. J. Biol.*, **19**, 357.
- Palavan, Ünsal, N. (1993), *Bitki büyüme maddeleri*, İ. Ü. Basım Evi ve Film Merkezi, İstanbul, 21, 198-232.
- Park, S. Y., Kim, C. H., Jeong, H. W., Lee, J. H., Seo, S. J., Han, Y. S. ve Lee, I. H. (2005), “Effects of two hemolymph proteins on humoral defens reactions in the wax mot, *Galleria mellonella*,” *Devolop. Comp. Imm.*, **29**, 43-51.
- Paulson, G. S., Hull, L. A. ve Biddinger, D. J. (2005), “Effect of a plant growth regulator prohexadione-calcium on insect pests of apple and pear,” *J. Econ. Entomol.* **98**, 423-431.
- Pech, L. L. ve Strand M. R. (1996), “Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes,” *J. Cell Science*. 109, 2053- 2060.
- Pech, L.L. ve Strand M.R. (2000), “Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells,” *J. Insect Physiol.*, **46**, 1565-1473.

- Penacchio, F., Tranfaglia A. ve Malva, C. (2003), "Host-parasitoid antagonism in insects: New opportunities for pest control," *Pest Control*, July/August, 53-56.
- Peter, C. ve David, B. V. (1990), "Biology of *Apanteles machaeralis* Wilkinson (Hym.: Braconidae) a parasite of *Diaphania indica* (Saunders) (Lep.: Pyralidae)," *Proc. Indian Acad. Sci (Anim. Sci).*, **99** (5): 353-362.
- Phukan, M., Hazarika, L.K., Barooah, M., Puzari, K.C. ve Kalita, S. (2008), "Interaction of *Dicladispa armigera* (Coleoptera: Chrysomelidae) haemocytes with *Beauveria bassiana*," *Int. J. Trop. Insect Sci.*, **28**(2): 88-97.
- Posnova, A.N. (1974), "Plant growth regulators and their use in applied entomology," *Trudy Vsesoyuznogo Nauchno-issledovatel'skogo instituta Zashchity Rastanii*, **40**, 135-145.
- Prasad, R., Behera H.N. ve Das, C.C. (1977), "MLC induced meiotic instability in grasshopper spermatocytes," *Current Science*, **46** (6), 191-192.
- Pugine, S.M.P., De Brito, P.P., Alba-Loureiro, C.T., Costa, E.J.X., Curi, R. ve De Melo, M.P. (2007), "Effect of indole-3-acetic acid administration by gavage and by subcutaneous injection on rat leukocytes," *Cell Biochem. Funct.*, **25**, 723-730.
- Ramadan, M. M., Wong, T. T. Y. ve Messing, R. H. (1995), "Reproductive biology of *Biosteres vandenboschi* (Hym.: Braconidae), a Parasitoid of Early-Instar Oriental Fruit Fly," *Ann. Ent. Soc. Am.*, **88** (2): 189-195.
- Rambabu, J.P., ve. Rao M. B. (1994), "Effect of organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Müller)," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **53**, 142-148.
- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. ve Rhodes, C.P. (1985), "Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances," *Int. Rev. Cytol.*, **97**, 186-350.
- Ribeiro, C., Simoes, N. ve Brehelin, M. (1996), "Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their

role in defence reactions. *in vivo* and *in vitro* studies,” *J Insect Physiol.*, **42**, 815-822.

Ribeiro, S., Sousa, J.P., Nogueira, A.J.A. ve Soares, A.M.V.M. (2001), “Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*,” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **49**, 131-138.

Ribeiro, B.M., Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E. ve Santos, J.P. (2003), “Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae),” *Journal of Stored Products Research*, **39**, 21-31.

Ribeiro, C. ve Brehelin, M. (2006), “Insect haemocytes: What type of cell is that?,” *J Insect Physiol.*, **52**, 417-429.

Richards, E.H. ve Edwards, J.P. (1999a), “Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera, Noctuidae) by the ectoparasitoid wasp *Eulophus pennicornis*, results in the appearance of a 27 kDa parasitism-specific protein in host plasma,” *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **29**, 557-569

Richards, E.H. ve Edwards, J.P. (1999b), “Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) by the ectoparasitoid wasp, *Eulophus pennicornis* effects of parasitization, venom and starvation on host haemocytes,” *J. Insect Physiol.*, **45**, 1073-1083.

Richards, E.H. ve Edwards, J.P. (2002), “Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, disrupts the cytoskeleton of host haemocytes and suppresses encapsulation *in vivo*,” *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **49**, 108–124.

Richter, S. ve Caceda, F. (1984), “Untersuchungen zur Verbesserung der Wirksamkeit von phosphororganischen Insektiziden durch mittel zur Steuerung biologischer prozesse,” *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, **20**, 409-418.

Richards, E.H. ve Dani, M. P. (2008), “Biochemical isolation of an insect haemocyte anti-aggregation protein from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*, and identification of its gene,” *J. Insect Physiol.*, **54**, 1041-1049.

- Riddiford, L. M. ve Law, J.H. (1983), *Larval serum proteins of Lepidoptera: In the larval serum proteins of insects* (Ed: Schelleri, K.), Thieme Stuttgart, 75-85.
- Riley, P.A. (1997), "Melanin", *Int J Biochem Cell Biol*, **29**, 1235-1239.
- Rivers D.B., Ergin, E. ve Uçkan, F. (2007), "Cell death in the host-parasitoid relationship," *In: New Developments in Cell Apoptosis Research*. (Ed: Alan, J. C.), Chapter 3, Nova Science Publishers, Inc., 6080 Jericho Turnpike Suite 207, COMMACK, NY 11725, U.S.A. p. 69-96.
- Romoser, W.S. ve Stoffolano, J.G. (1994), *The science of entomology*, (Ed: Kane, K.), WCB Publishers, 532.
- Rosen, D. (1985), "Biological Control," *In: Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*, (Ed: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I.), 12, Pergamon Press, New York, 413-464.
- Rosetto, M., Manetti, A.G., Giordano, P.C., Marri, L., Amons, R., Baldari, C.T., Marchini, D.ve Dallai, R. (1996), "Molecular characterization of ceratotoxin C, a novel antibacterial female-specific peptide of the ceratotoxin family from the medfly *Ceratitis capitata*," *Eur. J. Biochem.*, **241** (2), 330.
- Rowley, A.F. ve Ratcliffe, N.A. (1981), "Insects," *In: Invertebrate Blood Cells*, (Ed: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F.), Vol 2, Academic Press, London, 421-488.
- Rup, P. J., R. Kaur, ve J. Kaur., Effect of gibberellic acid (GA₃) on the protein, lipid and carbohydrate contents of banana fruit fly, *Zaprionus paravittiger* larvae, *Insect Sci. Appl.* 18: 145-148, 1998.
- Russell, V.W. ve Dunn, P.E. (1996), "Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis," *J. Insect Physiol.*, **42**, 65-72.
- Ryan, R. O. ve Van der Horst, D. J. (2000), "Lipid transport biochemistry and its role in energy production," *Annu. Rev. Entomol.* **45**: 233-260.
- Sak, O., Uçkan, F. ve Ergin, E. (2006), "Effects of cypermethrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae)," *Belg. J. Zool.* 136: 53-58.

- Saleem, M., ve Shakoori A.R. (1993), "Effects of cypermethrin on the free amino acids pool in an organophosphorus-insecticide-resistant and susceptible strain of *Tribolium castaneum*" *Comp. Biochem. Physiol. C* **105**, 549-553.
- Salisbury, F. B. ve Ross, C. W. (1992), *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Company, syf. 1-682.
- Samakovlis, C., Kylsten, P., Kimbrell, D.A., Engstrom, Y. ve Hultmark, D. (1991), "The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity," *Embo. J.*, **10**, 163.
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Fernández, C. ve Andreu, E. (1998), "Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **41**, 168-175
- Schmidt, O., Theopold, U. ve Strand, M. (2001), "Innate immunity and its evasion and suppression by Hymenopteran endoparasitoids," *BioEssays*, **23**, 344-351.
- Scheurer, S. ve Aschermann, S. (1976), "The influence of natural and some synthetic plant growth regulators on the reproductive activity of *Aphis fabae* sucking plant parts," *In Folia Entomologica Hungarica* (Ed.: Mahunka, S.) Luther-Strasse, German Democratic Republic, 221-226.
- Schneider, M.I., Smagghe, G., Gobbi, A. ve Viñuela, E. (2003), "Toxicity and pharmacokinetics of insect growth regulators and other novel insecticides on pupae of *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of early larval instars of lepidopteran pests," *J. Econ. Entomol.*, **94**(4), 1054-1065.
- Serebrov, V.V., Alekseev, A.A. ve Glupov, V.V. (2001), "Changes in the activity and pattern of hemolymph esterases in the larvae of greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) during mycosis," *Biology Bulletin*, **28**(5), 499-503.
- Sewify, G.H. ve Hashem, M.Y., "Effect of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on cellular defence response and oxygen uptake of the wax moth *Galleria mellonella* L. (Lep., Pyralidae)," *J. Appl. Ent.*, **125**, 533-536.

- Shakoori, A.R. ve Saleem, M.A. (1989), "Some macromolecular abnormalities developed by the interaction of malathion and permethrin and subsequent refeeding in *Tribolium castaneum* larvae," *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **11**(4), 203-215.
- Shakoori, A.R., Malik, M.Z. ve Saleem, M.A. (1993), "Toxicity of Karate to malathion-resistant Pakistan strain of red flour beetle (*Tribolium castaneum*) adults," *Pakistan Journal of Zoology*, **25**(3), 261-271.
- Shapiro, M. (1968), "Changes in the hemocyte population of the wax moth, *Galleria mellonella*, during wound healing," *J. Insect Physiol.*, **14**, 1725–1733.
- Shapiro, J. P., Keim, P. S., Law, J. H. (1984), "Structural studies on lipophorin, an insect lipoprotein," *J. Biol. Chem.*, **259**(6): 3680-3684.
- Sierpińska, A. (1998), "Towards an integrated management of *Dendrolimus pini* L.," *Proceedings: Population Dynamics, Impacts, and Integrated Management of Forest Defoliating Insects*, USDA Forest Service and General Technical Report NE-247, 129-142.
- Silva, M.T.B., Costa, E. C. ve Boss, A. (2003), "Control of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with insect growth regulators," *Cienc. Rural* 33: 601-605, 2003.
- Silva, J.E.B., Boleli, I.I.C ve Simões, Z.L.P. (2002), "Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae," *Braz. J. Biol.*, **62**(4A), (2002) 689-699.
- Slama, H. S., Sharaby, A., Ragei, M. (1983), "Chemical changes in the hemolymph of *Spodoptera littoralis* (Lep: Noctuidae) as affected by *Bacillus thuringiensis*," *Entomophaga*, **28**, 331-337.
- Simmonds, M.S.J., Manlove, J.D., Blaney, W.M. ve Khambay, B.P.S. (2002), "Effects of selected botanical insecticides on the behaviour and mortality of the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* and the parasitoid *Encarsia formosa*," *Entomol. Exp. Appl.*, **102**, 39-47.
- Soderlund, D.M. ve Knipple, D.C. (1999), "Knockdown resistance to DDT and pyrethroids in the house fly (Diptera: Muscidae): from genetic trait to molecular mechanism", *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **92**(6), 909-915.

- SPSS (2010), Inc., SPSS 18.0 Statistics. SPSS, Chicago, IL.
- Soulages J. L. ve Wells M. A. (1994), "Lipophorin: the structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insect," *Adv. Protein Chem.*, **45**, 371-415.
- Strand, M.R. ve Noda, T. (1991), "Alterations in the hemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by *Microplitis demolitor*," *J. Insect Physiol.*, **37**, 839-850.
- Strand, M.R. ve Pech, L.L. (1995), "Immunological basis for compatibility in parasitoid host relationships," *Annu Rev Entomol*, **40**, 31-56.
- Suh, C.P.C., Orr, D.B. ve Van Duyn, J.W. (2000), "Effect of insecticides on *Trichogramma exiguum* (Trichogrammatidae: Hymenoptera) preimaginal development and adult survival," *J. Econ. Entomol.*, **93**(3), 577-583.
- Sung, H.H., Kao, W.Y. ve Su, Y.J. (2003a), "Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*," *Aquatic Toxicology*, **64**: 25-37.
- Sung, H.H., Lin, S.C., Chen, W.L., Ting, Y.Y. ve Chao, W.L. (2003b), "Influence of TimsenTM on *Vibrio popualcons* of culture pond water and hepatopancreas and on the hemocytic activity of tiger shrimp," *Aquaculture*, **219**: 123-133.
- Sun, T. ve Gubler, F. (2004), "Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants," *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 197-223.
- Suzuki, M. ve Tanaka, T. (2006), "Virus-like particles in venom of *Meteorus pulchricornis* induce host hemocyte apoptosis," *J Insect Physiol* **52**, 602-613, 2006.
- Şengonca, Ç. ve Peters, G. (1993), "Biology and effectiveness of *Apanteles rubecula* Marsh. (Hym., Braconidae), a solitary larval parasitoid of *Pieris rapae* (L.) (Lep., Pieridae)," *J. Appl. Ent.*, **115**, 85-89.
- Tahori A.S., Zeidler G. ve Halevy, A.H. (1965), "Effect of some plant growth retardants on the feeding oh the cotton leaf worm," *J. Sci. Food Agri.*, **16**, 570-572.

- Takada, Y., Kawamura, S. ve Tanaka, T. (2001), "Effects of various insecticides on the development of the egg parasitoid *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae)," *J. Econ. Entomol.*, **94**(6), 1340-1343.
- Telfer, W. H. ve Kunkel, J. G. (1991), "The function and evolution of insect storage hexamers," *Annu. Rev. Entomol.* **36**, 205-228.
- T.C. (2010), Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. <http://www.kkgm.gov.tr/birim/ilac/bgd/hormon.htm>.
- Tepass, U., Fessler, L.I., Aziz, A. ve Hartenstein, V. (1994), "Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*," *Development*, **120**, 1829-1837.
- Terahara, K., Takahashi, K.G. ve Mori, K. (2003), "Apoptosis by RGD-containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*," *Dev. Comp. Immunol.*, **27**: 521-528.
- Teramoto, T. ve Tanaka, T. (2004), "Mechanism of reduction in the number of the circulating hemocytes in the *Pseudaletia separata* host parasitized by *Cotesia kariyai*," *J Insect Physiol.*, **50**, 1103–1111.
- Tillman, P.G. ve Mulrooney, J.E. (2000), "Effect of selected insecticides on the natural enemies *Coleomegilla maculata* and *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae), *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae), and *Bracon mellitor*, *Cardiochiles nigriceps*, and *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae) in cotton", *J. Econ. Entomol.*, **93**(6), 1638-1643.
- Tojo, S., Naganuma, F., Arakawa, K. ve Yokoo, S. (2000), "Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*," *J Insect Physiol.* **46**, 1129-1135.
- Tomberlin, J.K., Sheppard, D.C. ve Joyce, J.A. (2002), "Susceptibility of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae and adults to four insecticides," *J. Econ. Entomol.*, **95**(3), 598-602.
- Tuluçe Y. ve Çelik I. (2006), "Influence of subacute and subchronic treatment of abscisic acid and gibberelic acid on serum marker enzymes and erythrocyte and tissue antioxidant defense systems and lipid peroxidation in rats," *Pest. Biochem. Physiol.*, **86**(2), 85-92.

- Turnbull M.W., Martin, S.B. ve Webb, B.A. (2004), “Quantitative analysis of hemocyte morphological abnormalities associated with *Campoletis sonorensis* parasitization,” *J. Insect Sci.*, **4**, 11-26.
- Uçkan, F. ve Gülel, A. (1990), “Endoparazitoit *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae) dişilerinde zehir aparatının yapısı ve zehirinin başlıca kimyasal grubunun tayini,” *X. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Erzurum, 73-83.
- Uçkan, F. ve Gülel, A. (2002), “Age-related fecundity and sex ratio variation in *Apanteles galleriae* (Hym., Braconidae) and host effect on fecundity and sex ratio of its hyperparasitoid *Dibrachys boarmiae* (Hym., Pteromalidae),” *J Appl. Entomol.*, **126**:10, 534.
- Uçkan, F. ve Ergin, E. (2003), “Temperature and food source effects on adult longevity of *Apanteles galleriae* Wilkinson (Hymenoptera: Braconidae),” *Environ. Entomol.* **32**: 441- 446.
- Uçkan, F., Hepçorman Sengül, S., Sak, O. ve Korkmaz, M. (2007), “Effects of 5-Aza-2-deoxycytidine on biological parameters of the larval endoparasitoid *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae), and on its host, *Achoria grisella* (Lepidoptera: Pyralidae),” *Ann. Entomol. Soc. Am.* **100**: 265-269.
- Uçkan, F., Tüven A., Er A., ve Ergin E. (2008), “Effects of gibberellic acid on biological parameters of the larval endoparasitoid *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae),” *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **101** (3): 593-597.
- Uçkan, F., Er, A., Ergin E. (2010), “Levels of encapsulation and melanization in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) parasitized and envenomated by *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae),” *J. Appl. Entomol.* **134**, 718-726.
- Uçkan, F. ve Sak, O. (2010), “Cytotoxic effect of cypermethrin on *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) larval hemocytes,” *Ekoloji*, **19**(75), 20-26.
- Uçkan, F., Haftacı, İ. ve Ergin, E. (2011), “Effects of indol-3-acetic acid on biological parameters of the larval endoparasitoid *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae),” *Annals of the Entomological Society of America*, **104**, 77-82.

- Uçkan, F., Öztürk, Z, Altuntaş, H. ve Ekrem E. (Basılmadı), “Effects of gibberellic Acid (GA₃) on biological parameters and hemolymph metabolites of the pupal endoparasitoid *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and its host *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae),” *J. Res. Entomol. Soc.*
- Usmani, K.A. ve Knowles, C.O. (2001), “Toxicity of pyrethroids and effect of synergists to larval and adult *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*, and *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae),” *J. Econ. Entomol.*, **94**(4), 868-873.
- Ünal, E. (1998), *Funalia trogii*'de kültür periyoduna bağlı olarak indol-3-asetik asit (IAA) üretimi ve peroksidaz aktivitesi arasındaki ilişki, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Mersin, 10.
- Ünyayar S. (2000), Poliüretan köpük üzerine tutuklanmış *Phanerochaete chrysosporium* ME446'da gibberellik asit ve sitokinin üretimi, *Türk. J. Biol.*, **24**, 513-519.
- Xu, J., Shelton, A.M. ve Cheng, X. (2001a), “Comparison of *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and *Microplitis plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) as biological control agents of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): field parasitism, insecticide susceptibility, and host-searching,” *J. Econ. Entomol.*, **94**(1), 14-20.
- Xu, J., Shelton, A.M. ve Cheng, X. (2001b), “Variation in susceptibility of *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) to permethrin,” *J. Econ. Entomol.*, **94**(2), 541-546.
- Van Emden, H.F. (1969), “Plant resistance to aphids induced by chemicals,” *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 385-387, (1969).
- Vardar Y. ve Güven A. (1996), *Bitki Fizyolojisine Giriş*, syf. 1-213, Barış Yayınları, Fakülteler Kitapevi, İzmir.
- Vesely D.L., Hudson, J.L., Pipkin Jr, J.L., Pack L.D.ve Meiners S.E. (1985), “Plant growth-promoting hormones activate mammalian guanylate cyclase activity” *Endocrinology*, 45-48.

- Vilmos, P. ve Kurucz, E. (1998), "Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system," *Immunol Lett.* 62: 59–66.
- Visscher, N. S. (1980), "Regulation of grasshopper fecundity, longevity and egg viability by plant growth hormones," *Experientia* 36, 130-131.
- Wells, M.L., McPherson, R.M., Ruberson, J.R. ve Herzog, G.A. (2001), "Coccinellids in cotton: population response to pesticide application and feeding response to cotton aphids (Homoptera: Aphididae)," *Environ. Entomol.*, **30**(4), 785-793.
- Wharton, R. A. (1993), "Bionomics of the Braconidae," *Annu. Rev. Ent.*, **38**, 121-143.
- Wheeler, D. E. ve Kawooya, J. K. (1990), "Purification and characterization 555–566 of honey bee vitellogenin," *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **14**, 253–267.
- WHO (World Health Organization) (1984), "Environmental health criteria 29, 2,4-Di-chlorophenoxyacetic acid (2,4-D)", *Geneva*.
- WHO (1990), *Public health impact of pesticides used in agriculture*. WHO/UNEP, Geneva.
- Weaver, R.J. ve Pool, R.M. (1965), "Bloom spraying with gibberellin loosens clusters of thompson seedless grapes," *Calif. Agr.*, 19:14-15.
- Weise C., Franke P., Kopacek P. ve Wiesner S. (1998), "Primary structure of apolipophorin-III from the greater wax moth, *Galleria mellonella*," *J. Protein Chem.*, **17**(7), 633-641.
- Wheeler D. E. ve Martinez T. (1995), "Storage proteins in ants (Hymenoptera: Formicidae)," *Comp. Biochem. Physiol.* **112B**:15-19.
- Whitten M. M. A., Tew I. F., Lee B. L. ve Ratcliffe N. A. (2003), "A novel role for an insect apolipoprotein (apolipophorin III) in β -1,3- glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions," *J. of Imm.*, 2178-2185.
- Wilkinson C. F. (1976), *Insecticide Biochemistry and Physiology*, Plenum press, New York, USA.
- Yabuta, T. (1935), "Biochemistry of the "bakanae" fungus of rice," *Agric. Hort (Tokyo)*, **10**, 17-22.

- Yamashita, M. ve Iwabuchi, K. (2001), “*Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures,” *J. Insect Physiol.*, **47**, 325-331.
- Yazgan, Ş. (1981), “A meridic diet and quantitative effects of Tween 80, fatty acid mixtures and inorganic salts on development and survival of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L.,” *Z. Angew. Entomol.*, **91**, 433-441.
- Yegen O. (1993), *Yabancı otlar ve mücadelesi*, Akdeniz Üniversitesi Basımevi, Antalya, III+27-41.
- Yeşilada, E. ve Bozcuk, A.N. (1995), “*Drosophila melanogaster*’in yumurta verimi üzerine ABA ve kinetin’in etkisi,” *Tr. J. of Biology*, **19** (1), 37-44.
- Yılmaz, H.R. ve Yüksel, E. (2004), “The effect of indole-3-acetic acid on some metabolic enzymes in kidney of the second cross maternal mice and their offsprings,” *EJM*, **9** (1), 1-3.
- Yılmaz, H.R., Yüksel, E. ve Türköz, Y. (2004), “F2 nesil farelerde indol-3-asetik asitin böbrek katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine olan etkisi,” *Van Tıp Dergisi*, **11** (3), 64-68.
- Yılmaz, H.R. ve Yüksel, E. (2005), “İndol-3-asetik asitin üçüncü nesil farelerin kemik iliği hücrelerinde mitotik indeks üzerine etkisi,” *S.D.Ü Tıp Fakültesi Dergisi*, **12** (2), 47, 48.
- Zalinian GG, Arutiumian R.M. ve Sarkisian G.G. (1990), “The cytogenetic effect of natural mutagenesis modifiers in a human lymphocyte culture. The action of amino benzamide during the gibberellic acid induction of chromosome aberrations,” *Tsitol Genet*, **24**(3), 31-41.
- Zhao, Y., Li, W. ve Chou, I.N. (1987), “Cytoskeletal perturbation induced by herbicides of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T),” *J. Toxicol. Environ. Health*, **20**: 11-26.
- Ziegler R., Willingham L. A., Engler D. L., Tolman K. J., Bellows D. ve Van der Horst D. J. (1999), “A novel lipprotein from the hemolymph of the cochineal insect, *Dactylopius confusus*,” *Eur. J. Biochem.*, **261**, 285-290.