KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KONAĞA VERİLEN İNDOL-3-ASETİK ASİT'İN KONAK *Achoria grisella* FABRİCUS, 1794 (Insecta:Lepidoptera: Pyralidae) HEMOSİTLERİNE ETKİSİ

DİLEK ÇELİK

KOCAELİ 2014

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KONAĞA VERİLEN İNDOL-3-ASETİK ASİT'İN KONAK *Achoria grisella* FABRİCUS, 1794 (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae) HEMOSİTLERİNE ETKİSİ

DİLEK ÇELİK

Yrd.Doç.Dr. Fevzi UÇKAN
Danışman, Kocaeli Üniv. .....

Prof.Dr. Fazıl ÖZEN
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv. .....

Prof.Dr. Ünal ZEYBEKOĞLU
Jüri Üyesi, Ondokuz Mayıs Üniv. .....

Tezin Savunulduğu Tarih: 25.03.2014

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Son yıllarda ülkemizde tarım sektörü hızla gelişmiştir. Bununla beraber tarımsal üretimde bazı bitki gelişim düzenleyicileri (BGD) de kullanılmaya başlamıştır. Bu sebeple BGD'lerin böcekler üzerindeki etkileri çalışmamızın konusunu belirlememizde önemli bir unsur olmuştur.

Yüksek lisans eğitimimde çalışmalarımı destekleyen ve tecrübeleriyle beni yönlendiren değerli Danışman Hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca aynı laboratuvarı paylaştığım değerli arkadaşlarıma, çalışmalarımda yardımcı olan lisans öğrencilerine ve KOÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında beni yalnız bırakmayan, destekleyen, sabırla anlayışla her zaman yanımda olan ve benden umutlarını kesmeden kararlarıma inanan ve güvenen canım babam, canım annem ve canım kardeşlerime çok teşekkür ederim. Ayrıca tüm sevdiklerime, sevildiğim ve üzerimde emeği olan herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Mart - 2014 Dilek ÇELİK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iii
TABLOLAR DİZİNİ iv
SİMGELER DİZİNİ VE KISATLMALAR v
ÖZET vi
ABSTRACT vii
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 3
2. MALZEME VE YÖNTEM 15
2.1. Laboratuvar 15
2.2. *A. grisella* Kültürü 15
2.3. İndol-3-Asetik Asit ve Uygulanışı 16
2.4. Deney Grupları 16
2.5. *A. grisella* Hemolenf Analizi 17
2.5.1. Toplam hemosit sayısı 17
2.5.2. Hemosit tipleri ve mitotik indeks 18
2.5.3. Apoptotik indeks 19
3. İSTATİSTİK 20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 21
4.1. Hemosit Sayısı 21
4.2. Mitotik İndeks 22
4.3. Hemosit Tipleri 24
4.4. Apoptotik İndeks 29
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 34
KAYNAKLAR 37
ÖZGEÇMİŞ 50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bitki gelişimini düzenleyicilerin etki ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması 4
Şekil 1.2. Böcek hemositlerinin genel görünümleri 10
Şekil 4.1. *A.grisella* larval dönemde mitoz evresinde hemositlerin floresans mikroskop görüntüleri 24
Şekil 4.2. *A. grisella* larval dönemde giemsa boyama yöntemi ile gözlemlenen mitoz evresinde hemositler 24
Şekil 4.3. *A.grisella* larvalarında giemsa boyama yöntemi ile ile gözlemlenen plazmatositler 25
Şekil 4.4. *A.grisella* larvalarında giemsa boyama yöntemi ile gözlemlenen prohemositler 25
Şekil 4.5. *A.grisella* larvalarında giemsa boyama yöntemi ile gözlemlenen granülositler 25
Şekil 4.6. *A. grisella* larvalarında giemsa boyama yöntemi ile gözlemlenen siferülosit ve önositoid 26
Şekil 4.7. *A.grisella* larvalarında hemositler 26
Şekil 4.8. IAA'nın konak *A. grisella* farklı hemosit sayılarına etkileri 28
Şekil 4.9. Acridine Orange ve Ethidium Bromide ile boyanmış *A.grisella* larval hemositlerinin floresans mikroskop görüntüleri 30
Şekil 4.10. *A.grisella* larval dönemde erken apoptotik ve geç apoptotik hemositlerin floresans mikroskop görüntüleri 30
Şekil 4.11. *A.grisella* larval dönemde nekrotik hemositlerin floresans mikroskop görüntüleri 30
Şekil 4.12. IAA uygulamasına bağlı olarak *A. grisella* larvasında apoptotik, nekrotik ve canlı hemosit oranları 33

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Bronskill tarafından önerilen besin içeriği ve içerikte yapılan değişiklik 16
Tablo 4.1. IAA'nın *A.grisella* larvasında toplam hemosit sayılarına ($x10^6$ hücre/ml) etkileri 21
Tablo 4.2. IAA'nın *A.grisella* larva evresindeki mitotik indeks (%) değişimleri 23
Tablo 4.3. IAA'nın *A.grisella* larvalarının farklı hemosit sayılarına etkileri 27
Tablo 4.4. Farklı IAA dozlarının *A.grisella* larva evresinde erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hemosit (%) sayısına etkileri 31

SİMGELER DİZİNİ VE KISATLMALAR

g : Gram
µl : Mikrolitre
ml : Mililitre
ppm : Milyonda bir

Kısaltmalar

ABA : Absisik Asit
AO : Acridine Orange (Akridin Turuncusu Boyası)
BGD : Bitki Gelişim Düzenleyicisi
EB : Etidium Bromide (Etidyum Bromür)
GA_3 : Giberellik Asit
IAA : İndol-3-Asetik Asit
NaCl : Sodyum Klorür
Na_2EDTA : Disodyum Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
NaOH : Sodyum Hidroksit
PBS : Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
SH : Standart Hata

KONAĞA VERİLEN İNDOL-3-ASETİK ASİT'İN KONAK *Achoria grisella* FABRİCUS, 1794 (Insecta:Lepidoptera: Pyralidae) HEMOSİTLERİNE ETKİSİ

ÖZET

Günümüzde nüfus artışıyla birlikte besin ihtiyacı da artmıştır. Bu amaçla birçok bitki gelişim düzenleyicisi (BGD) tarımsal verimi ve kaliteyi arttırmak için kullanılmaktadır. Böylece BGD' lerin bitkiler, böcekler ve diğer canlılar üzerindeki etkileri de merak konusu olmuştur. Bir BGD olan indol-3-asetik asit (IAA), temel oksin olarak kabul edilen bitkisel bir hormondur. Yaptığımız çalışmada IAA'nın konak, küçük balmumu güvesi, *Achroia grisella* Fabr. (Lepidoptera: Pyralidae)'un larval hemositlerine etkileri araştırıldı. Kontrol ve deney grupları, 25 ± 2°C sıcaklık, %60 ± 5 bağıl nem ve 12: 12 saat Aydınlık: Karanlık fotoperiyot şartlarında laboratuvarda yetiştirildi. Farklı dozlarda (2, 5, 10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 ppm) IAA verilen *A. grisella*'nın toplam hemosit sayıları, hemosit tipleri ve hemositlerindeki apoptotik ve mitotik indeks oranları tespit edildi. *A.grisella*'nın kontrol grubunda 6,38 x 106 hücre/ml olarak belirlenen hemosit sayısı tüm IAA dozlarında artış gösterdi. IAA dozuna bağlı olarak hemosit tiplerinde bir farklılık görülmedi. Hemolenfte en çok görülen hemosit tipi plazmatositler, en az görülen hemosit tipi de siferülositler olarak belirlendi. Mitotik indeks oranı IAA uygulanan grupların bazılarında artış bazılarında ise azalma gösterdi. Deney gruplarında apoptotik hemosit ve canlı hemosit oranında artış olduğu, nekrotik hemosit oranında ise azalma olduğu belirlendi. Çalışmamızın sonunda IAA'nın etkisiyle *A.grisella* hemosit sayısında, mitotik ve apoptotik indeks oranlarında değişiklikler olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: *Achoria grisella*, Apoptotik İndeks, Hemosit Sayısı, İndol-3 - Asetik Asit, Mitotik İndeks.

EFFECTS OF INDOLE-3-ACETIC ACID ON HEMOCYTES OF THE HOST *Achoria grisella*, 1794 (Insecta:Lepidoptera: Pyralidae)

ABSTRACT

Today, nutritional needs have increased along with the population growth. Many plant growth regulator (PGR) are used to increase agricultural productivity and quality for this purpose. Thus, PGR 's effects on plants, insects and other organisms has been an object of curiosity. Indole-3-acetic acid (IAA), which is a plant growth regulator, is a plant hormone accepted as the basic auxin. In this study the effects of IAA on the hemocytes of host, small wax moth, *Achoria grisella* Fabr. (Lepidoptera: Pyralidae)'s larvae were investigated. Control and experiment groups were cultivated at the laboratory at 25 ± 2 °C, 60 ± 5 % relative humidity and a photoperiod of 12:12 h Light: Dark conditions. Total hemocyte numbers, hemocyte types and on its hemocytes mitotic and apoptotic indices rates of *A. grisella*, which given different doses of IAA (2, 5, 10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 ppm), were detected. Hemocyte numbers, which is 6,38 x 106 cell/ml in the control group of *A.grisella*, have increased in all doses of IAA. Depending on doses of IAA have any effect on different types of hemocytes. Plasmocytes, the most common type of hemocyte and spherüloctyes, the least common type of hemocytes were identified in hemolymph. The rate of mitotic index, in some of IAA applied groups showed an increase and a decrease in some. An increase of apoptotic hemocyte and living hemocyte rates and a decrease of necrotic hemocyte rate were determined in the experiment groups. At the end of our study, some changes based on the effect of IAA in hemocyte numbers, mitotic and apoptotic indice rates of *A. grisella*'s were observed.

Keywords: *Achoria grisella*, Apoptotic Indices, Hemocyte Count, Indole-3-Acetic Acid, Mitotik Indices.

GİRİŞ

Zararlı bitkilerle ve böceklerle mücadelede ilaç ve sentetik gübre gibi kimyasal maddelerin tarımda kullanımı, 1940'lı yıllarda başlamıştır. Tarımsal üretimde bilinçsizce kullanılan bu kimyasallar, doğal dengeye, insan sağlığına ve çevreye zarar vermektedir. Hava, su ve toprakta birikerek besin zinciri yoluyla biyolojik sistemlere geçen kimyasal maddeler, kimyasal kirliliğe sebep olmaktadır. Bu durum tarım, orman, hayvancılık ürünlerine, bitki örtüsüne ve ekolojik dengeye zarar veren böceklerle biyolojik olarak mücadelenin önemini arttırmıştır. Biyolojik kontrol genel olarak bakıldığında zararlı olan bir tür populasyonunun, onun doğal düşmanı olarak bilinen başka canlı tür populasyonu tarafından baskılanması olarak ifade edilmektedir. Biyolojik kontrolde baskılama amacıyla kullanılan tür biyolojik kontrol ajanı olarak adlandırılmaktadır [1]. Biyolojik kontrol ajanlardan biri olan parazitoidler ekosistemin korunmasındaki katkılarından dolayı; doğal düşmanların en uygunu, en az risk taşıyanı ve en çok spesifik etki yapanıdır [2, 3]. Bir parazitoidin hayatının bir kısmını içerisinde veya üzerinde geçirdiği, besin ihtiyacını veya korunmasını sağladığı organizmaya konak adı verilmektedir. Parazitoidlerin çoğalması konak ile orantılı olduğundan, konak sayısındaki artış parazitoid sayısını artırmakta, konak sayısındaki azalma ise parazitoid sayısını azaltmaktadır [4-6]. Bu şekilde konak ve parazitoid arasında belli bir denge sağlanmaktadır [7].

Yaptığımız çalışmada kozmopolit bir güve türü olan ve bazı parazitoid türler için konak olduğu bilinen *A. grisella* kullanıldı. *A.grisella*, Lepidoptera takımına ait bir türdür. Günümüze kadar 100.000'den fazla Lepidoptera türü saptanmıştır. Bu takımda kelebek ve güveler bulunmaktadır. Genel olarak bakıldığında pullarla kaplı kanatlara sahiptirler. *A.grisella*, büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella*'ya göre yapı olarak daha küçüktür [8-15]. Doğada bal arısı kolonilerinin ve dolaylı olarak meyve ağaçlarının bulunduğu yerlerde beslenir. Bu türe ait dişi bireyler yumurtalarını kovandaki yarık ve çatlaklara bırakırlar ve yumurtadan çıkan larvalar mum ve polen artıkları ile beslenirler. Özellikle rengi koyulaşmış eski peteklerde tahribata neden olurlar. Hatta arı puplarını da kaplayarak onların açılmalarını

önlerler [16]. *A.grisella* yaşamı boyunca yumurta, larva, pup gibi gelişim evrelerinden geçerek ergin bir birey haline gelmektedir.

Tarımsal üretimde güçlüklerle karşılaşılmasına bağlı olarak BGD'lerin bu alanda kullanılması konuyla ilgili birçok çalışmayı da beraberinde getirmiştir. Günümüzde kalite ve verimi artırmak için pek çok BGD, tarım ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır. BGD'lerden oksinlerin bir üyesi olan İndol-3-asetik asit (IAA) bitkilerde büyüme ve gelişmeyi etkileyen önemli gruptur. Yapılan literatür taramasına göre IAA'nın *A.grisella* larval hemositleri üzerine olan etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmadığı için bu konu üzerinde çalışmalarımıza yön verdik.

1. GENEL BİLGİLER

Büyüme, bitkiler için çok önemli bir fizyolojik olaydır. Ancak bitki büyüme ve gelişim düzenleyicileri ile ilgili ilk bilgilere 19. yüzyılın sonlarında ulaşılabilmiştir. Bu dönemde çeşitli çalışmalar yapılarak BGD'lerin bitki büyümesi ve gelişmesindeki etkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bitki düzenleyicilerinin keşfi ile bitki büyümesi ve büyüme ile ilgili çeşitli faaliyetler kontrol altına alınabilmiştir.

BGD'ler bitki hormonlarının sentetik türevleri olan kimyasal maddelerdir. Bitkiler tarafından doğal olarak sentezlenen, bitkide büyüme, gelişme ve diğer fizyolojik olayları tek başlarına ya da diğer hormonlarla birlikte etkileyebilen bu organik maddeler "fitohormonlar" olarak adlandırılırlar. Ayrıca bitkilerde düşük konsantrasyonlarda dahi oluşturdukları sinyal molekülleriyle bitkilerin büyümesinde önemli role sahiptirler [17-19]. Sentezlendikleri yerde etkilerini gösterebildikleri gibi sentezlendikten sonra taşınarak, bitkinin diğer kısımlarında da etkili olabilmektedirler. Bitki hormonları tohumda çimlenme ve büyümeyi, çiçeklenmeyi, meyve oluşumunu ve olgunlaşmasını, gövde büyümesini, yaprakların oluşumu ve senesensi etkiledikleri için bir bakıma bitkiyi biçimlendirmektedir. Bu hormonlar bitki büyümesinde oldukça önemli görevlere sahiptirler [20].

Hücresel düzeyde ve düşük yoğunluklarda dahi etkinlik gösterebilen BGD'lerin bir kısmı bitkilerde gelişmeyi teşvik ederken (teşvik edici) bir kısmı da engelleyebilmektedir (inhibitör ya da engelleyici) [21, 22]. Bu özellikleri sayesinde BGD'ler tohumların çimlendirilmesinden doku kültürüne kadar birçok alanda kullanılmaktadır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin sınıflandırılması Şekil 1.1'de verilmiştir.



Şekil 1.1. Bitki gelişimini düzenleyicilerin etki ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması [22-25].

Hormonlar; hücre bölünmesi, uzaması ve farklılaşmasını etkileyerek bitki büyümesi ve gelişmesini kontrol eder. Ayrıca bazı hormonlar, bitkilerin çevresel uyartılara verdikleri kısa süreli fizyolojik yanıtlara da aracılık ederler. Her bir hormon; etki bölgesi, konsantrasyon ve bitkinin gelişim evresine bağlı olarak oluşan birden fazla etkiye sahiptir. Bunun yanı sıra bir bitkinin büyüme ve gelişimi için o bitkideki hormon dengesi de oldukça önemli yer tutar [25].

Bitki hormonları çok düşük konsantrasyonlarda üretilirler, fakat çok düşük miktardaki hormon, bitkideki bir organın büyüme ve gelişimi üzerinde büyük etki gösterebilir. Bu durum hormonun verdiği sinyalin bazı yollarla arttırılması gerektiğini göstermektedir. Bir hormon genlerin ifadesini, mevcut enzimlerin aktivitesini ya da zarların özelliklerini değiştirerek etkisini gösterebilir. Bu etkilerden herhangi biri, az sayıdaki hormon molekülüne yanıt veren bir hücrenin metabolizmasını ve gelişimini yeniden düzenleyebilir. Sinyal iletim yolları hormonal sinyali arttırır ve hücrenin sinyale karşı özgün bir yanıt vermesini sağlar [25].

Birçok BGD, tarım ürünlerinde kalite ve verimi artırmak için kullanılmaktadır [26]. BGD'lerin önerilen dozlarda kullanılması durumunda herhangi bir sağlık riski taşımadıkları savunulmaktadır [27]. Ancak tarımsal verimi artırmak amacıyla kullanılan BGD'lerin, biyolojik kontrol ajanlarını olumsuz yönde etkileyerek, doğal düşmanın zararlı böcekler üzerindeki baskınlığının azalmasına ve zararlı populasyonun giderek artmasına neden olabileceği düşünülmelidir.

Bitki gelişim düzenleyicilerinin böceklerin farklı biyolojik dönemlerinin gelişmesinde etkili oldukları görülmüştür. Bu etkiler; toksik etki sonucu ölümler [28, 29], deformasyonlar ve ağırlık azalması [30, 31], beslenememe etkisi (Antifedant) [32, 33], morfolojik ve eşeysel gelişmede yavaşlama [31, 34], kısırlık ve doğurganlıkta azalma [28, 31, 35-39], diyapoza girmeyi engelleme [40], konak bitki dokularında ve besin içeriğinde değişiklikler oluşturarak bitki dayanıklılığının arttırılması [28, 35, 41, 42] ve insektisitlerin bitki penetrasyonunu arttırması [43] şeklinde ifade edilmiştir. Hatta Posnova (1974), BGD'lerin böcekleri baskı altına almak amacıyla entegre mücadele programlarında kullanılabileceğini belirtmektedir [44].

Bazı ülkeler tarımsal üretimi arttırmak için kullandıkları bitki büyüme hormonlarının yanında pestisit ve herbisitleri de kullanmaktadır. Fakat bu kimyasalların yarılanma ömürleri çok uzun olduğu için; hem çevre kirliliğine sebep olmakta hem de toprak, sebze ve meyveler üzerinde kalarak besin zinciri yoluyla insana kadar ulaşabilmektedir. Özellikle de BGD'ler canlı sistemlerden tamamen atılmayıp organlarda depolanmakta ve fonksiyon bozukluklarına sebep olabilmektedir [44, 45].

Bitki büyüme hormonları çeşitli fizyolojik etkilere sahip olmakla beraber; bu etkileri konsantrasyonlarına, çevresel faktörlere, bitki türlerine ve bitkinin yaşına bağlı olarak değişebilmektedir. Başlıca fizyolojik etkileri; hücre bölünmesi, hücre uzaması ve genişlemesi, morfogenez, tohum ve tomurcuk dormansisi, embriyo gelişimi ve tohum çimlenmesi, çiçeklenme, büyüme, meyva oluşumu, gelişimi ve olgunlaşması, partenokarpik meyva 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, osmoregülasyon, böceklerde gelişme, fekondite, yumurta verimi ve açılımı sıralanabilir [46, 47]. İlkönce tohumların çimlenmesinde, meyve, fidan ve çeliklerin köklendirilmesinde kullanılan BGD'ler sonraları tüm dünyada özellikle pek çok alanda kullanılmaya başlanmıştır. Bu maddeler, doğal olarak kullanımın pahalı olması nedeniyle sentetik olarak da üretilmektedir.

Oksinler: Bir BGD olan oksinler, keşfedilen ilk bitki hormonu olmasına karşın, oksin tarafından sinyal iletimi ve oksin biyosentezinin düzenlenmesi hakkında pek çok

bilinmeyen vardır. Mevcut kanıtlar, oksinin, bitkilerin sürgün uçlarında bir aminoasit olan triptofandan üretildiğini göstermektedir [25].

Oksinler gövde ve kök ucu gibi meristematik dokularda, genç yapraklarda, kotiledonlarda, çiçek ve meyvelerde sentezlenmekte ve sentezlendikten sonra buradan floem aracılığıyla aşağıya doğru taşınmaktadır [48, 49]. Yapılan çalışmalar sonucunda yalnızca yüksek bitkilerin değil, fungusların ve bakterilerin de oksin içerdikleri saptanmıştır [21, 50-52]. Oksinler, gövde uzamasını (yalnızca düşük konsantrasyonda) kök büyümesini, hücre farklılaşmasını ve dallanmayı teşvik eder. Meyve gelişimini düzenler; apikal dormansiyi arttırır; fototropizma ve gravitropizmada iş görür [53]. Oksinlerin bitki gelişiminde pek çok işlevi olmasının yanında temel görevlerinden biri de genç sürgünlerdeki hücrelerin uyarılmasını sağlamaktır [25].

Günümüzde, oksinler bitki dokularından, mantarlardan ve bakterilerden dietileter, metanol veya etil asetat gibi organik çözücüler kullanılarak elde edilmektedir. Bunun yanı sıra kimyasal analizlerinde ultraviyole (UV) ve infrared spektroskopisi, gaz kromotografisi, gaz-kütle spektroskopisi (GS-MS), yüksek basınçlı sıvı kromotografisi (HPLC), ince tabaka kromotografisi (TLC) vb. hassas fizikokimyasal teknikler de kullanılmaktadır [54-56].

İndol-3-asetik asit: Kristal haldeki oksin ilk kez 1934 yılında Kögl ve arkadaşları tarafından insan idrarından elde edilmiştir. 1935 yılında ise Thimann tarafından *Rhizopus suinus* Nielsen (Mucorales: Mucoraceae) kültüründen elde edilmiş ve elde edilen bu maddeye IAA adı verilmiştir [57, 58]. IAA, bitkilerde bulunan ve temel oksin olarak kabul edilen bir BGD'dir. İçsel bir oksin olan IAA'nın keşfinden sonra bu maddenin bitkilerde yaygın olarak bulunduğu yapılan birçok araştırmacı tarafından kanıtlanmıştır [59, 60]. IAA'nın triptofan aminoasitinden sentezlendiği de kesinlik kazanmıştır. Bitki gelişiminde embriyogenezden senesense kadar pek çok önemli olayda görev alır [57]. İndol-3-asetik asitin kapalı formülü $C_{10}H_9NO_2$ olup, molekül ağırlığı 175.2'dir [57].

IAA'nın dört esas yolla sentezlendiğine ilaveten, bakterilerle infekte olmuş bitkilerde indol-3-asetamid yoluyla da sentezlendiği ileri sürülmektedir [61, 62].

IAA'nın fizyolojik etkileri şu şekilde sıralanabilir [57].

- ✓ Bitki hücre çeperinin mekaniksel özelliklerini değiştirerek hücrenin uzamasını sağlar.
- ✓ DNA, RNA ve protein sentezini arttırır.
- ✓ Mitoz bölünmede düzenleyici bir role sahiptir.
- ✓ Dokularda, birçok metabolik olaylarda görev alan enzim sentezini ve aktivitesini arttırmaktadır.
- ✓ Düşük konsantrasyonlarda adventif kök ve esas kök oluşumunu arttırmaktadır.
- ✓ Tomurcuk inhibisyonu ve apikal dominansi üzerine etkilidir.
- ✓ Tohum çimlenmesini teşvik etmektedir.
- ✓ Çiçeklenmeyi arttırır ve dişi çiçek oluşumunu teşvik eder.
- ✓ Kambiyonal aktiviteyi ve odun dokusunun oluşumunu arttırmaktadır.
- ✓ Yaprak ve meyve dökümü üzerine etkilidir.
- ✓ Partenokarpik meyve oluşumuna neden olmaktadır. Partenokarpik meyveler, çoğunlukla fazla sayıda ovaryum içeren türlerde oksin uygulanarak tozlaşmamış çiçeklerde de meydana getirilebilmektedir.
- ✓ Oksinler meyve tutmasını teşvik etmektedir. Örnek olarak domates, biber, tütün, incir ve frenk üzümü verilebilir.

IAA gibi hücre bölünmesini artırıcı maddelerden doku kültürü çalışmalarında yararlanılabilmektedir [63]. Bitki gelişim düzenleyicisi olan IAA, bitki serotonini olarak da bilinmektedir [64]. IAA, bitki kökenli bir bileşik olarak bilinse de birçok hayvanın; embriyo, larva, serebrosipinal sıvı, kan, akciğer, böbrek, karaciğer ve beyninde tespit edilmiştir [65, 66]. İnsanlarda serotonin ve triptofan metabolizmasının bozulduğu durumlarda IAA'nın arttığı bildirilmiştir [67-69]. Yapılan diğer bir çalışmada bitki peroksidazları ile birlikte IAA kullanımının yeni bir kanser tedavi yöntemi olabileceği düşünülmektedir [70].

İnsanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, IAA ve metabolitlerin plazmadaki düzeylerinin, fenilketonuri ve böbrek yetmezliği gibi hastalıkların artmasında etkili olduğu belirtilmiştir [66]. Kowalska [71], IAA'nın insan fibroblast kültüründe DNA ve RNA miktarında artışa sebep olduğunu belirtmiştir. Bertuzzi ve arkadaşları [72] IAA'nın insan serum albümini ile birleştiğini belirtmişlerdir [64].

Yapılan bir çalışmada farelere verilen IAA'nın karaciğer ve böbrekte triptofandan sentezlendiği ve yüksek konsantrasyonlarının, fare fibroblast 3T3 hücrelerine toksik etki yaptığı gösterilmiştir [65]. Furukawa ve ark. (2004)'nin yaptıkları çalışmalar sonucu; hamile sıçanlara 12-14 gün süresince IAA uygulanmasının, seçici olarak nöronların S fazını etkileyebildiği ve nöroepitelde apoptoza uğramalarına neden olduğu belirtilmiştir Bu çalışma sonunda IAA, bazı dokulardaki hücrelerin apoptotik aktivitelerini arttırarak sıçan fetüslerinde mikroensefaliye neden olmaktadır [73].

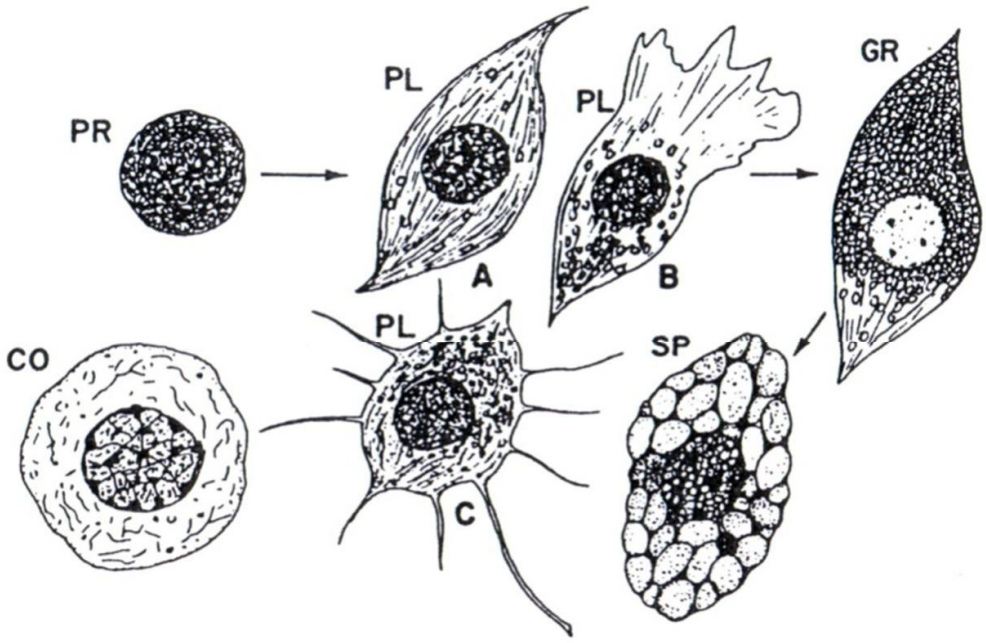
Sıçanlara, deri altına enjeksiyon veya sonda ile besleme yoluyla IAA uygulaması yapılarak, IAA'nın nötrofil fonksiyonu ile nötrofiller ve lenfositlerdeki sitotoksisiteye etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada deri altına enjeksiyon veya sonda ile besleme yoluyla yapılan IAA uygulaması sonunda; lenf bezleri ya da nötrofillerdeki antioksidan enzim aktivitelerinde veya glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Yapılan çalışma sonunda, deri altına enjeksiyon veya sonda ile besleme yoluyla yapılan IAA uygulamasının her ikisi de, nötrofiller yoluyla fagositik kapasitede bir artış sağlamakla birlikte; bu asit uygulaması nötrofiller veya lenfositler üzerinde prooksidan etkilere veya sitotoksik etkilere neden olmamıştır [74].

Hemositler: Omurgasız canlılarda, vücut sıvılarının çoğunlukla kan ve lenfatik damarlar içerisinde sınırlandırıldığı kapalı dolaşımdan farklı olarak; kan ve lenfatik sıvıların ayrımının olmadığı açık dolaşım görülmektedir. Böceklerde, diğer eklembacaklılarda ve açık dolaşım sistemi görülen hayvanlarda kan ve doku sıvısı arasında herhangi bir ayrım olmadığı için vücut sıvıları "hemolenf" olarak adlandırılır. Hemolenf dolaşımındaki hücrelere de "hemosit" adı verilmektedir [75]. Böceklerin vücutlarında dolaşan hemolenf sıvısı genellikle renksiz veya bazı pigmentlerden dolayı çok az yeşil veya sarı renkli olabilmektedir [76]. Böcek türüne göre vücut ağırlığının yaklaşık olarak %5-40'ını oluşturmaktadır. Hemolenf, böceklerdeki metamorfoz süresince metabolitlerin gerekli yerlere taşınması ve depolanmasında oldukça önemli bir yere sahiptir. Omurgalılardakine benzer şekilde böcek kanı da sıvı kısım (plazma) ve hücresel kısım (hemositler) olarak ikiye ayrılır [76-78].

Böceklerde dolaşıma katılan hemositlerin devamlılığı, hematopoietik organlar ve dolaşımdaki hemositlerin mitoz bölünmeleri sayesinde olmaktadır [79, 80]. Hemositler ilk olarak embriyogenez esnasında baş veya dorsal mezodermden gelişirler [75, 81]. Mezodermal hematopoietik organlardaki kök hücrelerin bölünmesiyle ve/veya dolaşımdaki hemositlerin bölünerek çoğalmasıyla böceklerdeki hemositlerin üretimi devam eder [75, 79]. Birçok böcek türünde hematopoietik organlar böceğin farklı vücut kısımlarında bulunmaktadır [7]. Lepidopter larvalarında genellikle toraksta imajinal kanat diski ile beraber, bazı dipterlerde ise abdomenin posterior segmentinde bulunmaktadır [83, 84].

Günümüzde hemositlerin oluşumu ve farklılaşması hakkında farklı teoriler olsa da genel olarak;
(1) Hematopoietik organlarda prohemositlerin ilk olarak plazmatositlere farklılaştığı ve diğer hemosit tiplerinin ise dolaşıma salındıktan sonra farklılaştığı [85],
(2) Dolaşımdaki hemosit populasyonlarının hücre farklılaşmalarından sonra hücre bölünmelerinin devam etmesiyle sağlandığı şeklindedir [85].

Böcek hemositleri türden türe tip, morfoloji ve sayı olarak farklılık gösterse de sınıflandırma şemaları literatürde bulunmaktadır [75, 77, 85, 86]. En genel hemosit tipleri morfolojik, histokimyasal ve fonksiyonel karakterlerine göre; Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattaria, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Collembola gibi takımlarda tanımlanmıştır. Bu hemosit tipleri prohemositler, granülositler, plazmatositler, siferülositler ve önositoidlerdir [77, 85, 86, 87-91]. Böcek hemositlerin genel görünümleri Şekil 1.2'de gösterilmiştir [53].



Şekil 1.2. Böcek hemositlerinin genel görünümleri. PR: Prohemosit, PL: Plazmatosit, GR: Granülosit, SP: Siferülosit, CO: Onositoid [53].

Prohemositler yuvarlak veya oval olabilen düzgün şekilli ve 4-10 µm genişliğinde ve 4-14 µm uzunluğunda hücrelerdir (77, 90, 93-95). Çekirdekleri sitoplazmayı tamamen doldurur. Ribozom ve mitokondri içerirler. Endoplazmik retikulum, golgi aygıtı gibi diğer organeller genellikle az sayıdadır [75, 96]. Prohemositler sentriol ve mikrotübül içermeleri sebebiyle aktif hemosit olarak nitelendirilmekte ve diğer hemosit tiplerinin öncüsü olarak belirtilmektedirler [75, 77, 86, 96]. Temel fonksiyonları bölünmek ve yeni hemositler oluşturmaktır. Bu hemositlerin dolaşımdaki oranları böceğin gelişimine ve fizyolojik durmuna göre farklılık gösterse de genellikle %5 civarındadır [75, 77, 86]. Çalışılan tüm Lepidopter türlerinde bu hemosit tipine rastlanılmıştır.

Plazmatositler küresel veya oval şekilli hemositlerdir. Boyları 3 µm'den 40 µm'ye kadar ulaşabilmektedir [75, 90, 93, 95]. Büyük veya küçük olabilen polimorfik hücrelerdir. Genellikle diğer hemosit tipleriyle karşılaştırıldığında hemolenfte en fazla bulunan hemosit tipidir. Böcek türüne bağlı olarak dolaşımdaki toplam hemosit sayısına oranları %30-60 arasında değişebilmektedir [96].

Plazmatositler transmisyon elektron mikroskobu ile incelendiklerinde birkaç yalancı ayak, pinositotik veziküller, vakuoller ve poliribozomlar gözlenebilir ve ayrıca az gelişmiş bir golgi aygıtına sahiptirler [86]. Birçok Lepidopter türünde plazmatositler

granül içermezken *G. mellonella*'da granül içerebilmektedir [86, 97, 98]. Plazmatositler pseudopodlar ile yayılabilme özelliğine sahip olmalarının yanı sıra karakteristik olarak da ince ve uzun fibroblast benzeri özellikleri sayesinde diğer hemosit tiplerinden kolayca ayırt edilebilmektedirler [99]. Bu hemositler, fagosite edileyemeyecek büyüklükteki yabancı cisimlerin, bakteri topluluklarının ya da nekrotik melanize olmuş materyallerin etrafında kapsüller ve nodüller oluşturabilme yeteğine sahiptir [85, 99]. Plazmatositlerin fagositozda rol aldığını düşünen araştırmacıların [100, 101] dışında bir kısım araştırmacıya göre de bu hemositler fagositik hücreler değildirler [102].

Granülositler küresel veya oval şekilde olabilen ve çapları 4-45 μm arasında değişebilen hemositlerdir [103]. Bu hemositlerin sitoplazmalarında membrana bağlı çok sayıda granül içermeleri en karakteristik özellikleridir [75, 85, 86]. Granülositlerin çekirdekleri yuvarlak ya da uzamış şekilde merkezi olarak konumlanmıştır [104]. Çok sayıda lizozom ve serbest ribozoma sahiptirler fakat mitokondrileri az sayıdadır [77, 95]. Transmisyon elektron mikroskobunda yapılan incelemelerde gelişmiş granüllü endoplazmik retikulumları, çok sayıda pinositik vezikülleri, ince ve uzun yalancı ayakları tespit edilmiştir [86]. Histokimyasal analizler sonucunda granüllerin glikoprotein ve mukopolisakkarit yapısında olduğu belirtilmiştir. Farklı böcek türlerinde dolaşımdaki hemositlere göre oranları %30-60 arasında değişebilirken plazmatositlerle birlikte pek çok böcek türünde en fazla bulunan hücrelerdir [75, 95]. Granülosit hücreleri yabancı yüzeylere yapışma özelliğinden dolayı plazmatositlere benzemekte ve yara iyileştirici ve bağışıklıkta aktif rol aldıkları bilinmektedir [75, 77, 95]. Granülositlerin fagositozda çok önemli bir yeri olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [97, 100, 102]. Bu hemositler kapsül ve ya nodül oluşumunda yabancı cisimlerle ilk temasa geçen ve granüler içeriklerini dışarı veren hücrelerdir. Bir çok araştırmacı, granüler hemosit içeriğinin ekzositozunun plazmatositleri o bölgeye çekmede etkili olduğunu [86] ya da kapsül veya nodül oluşumunda plazmatositlere yardımcı olabileceğini [99] düşünmektedir.

Önositoidler çapları 54 μm'yi bulan yuvarlak veya oval şekilli oldukça büyük hemositlerdir [75, 104]. Çekirdekleri merkezi olmamakla birlikte transmisyon elektron mikroskobuyla yapılan çalışmalarda sitoplazmalarında çok sayıda serbest ribozom ve tipik az gelişmiş organellere rastlanılmıştır [86]. Önositoid hücreleri

toplam hemosit sayısının %1-2 sini oluşturmaktadır [75]. Lepidopter türlerinde diğer hemositlere nazaran en büyük hemosit tipi olarak bilinmektedir [77, 95]. Birçok Lepidopter türünde hazırlanan preparatlarda bu hemosit tiplerinin in vitroda kolayca lizise uğradıkları belirtilmiştir [105]. Ancak lizise uğramaları hemolenfin koagulasyonuna neden olmaz. Lepidopter türleri arasında *G. mellonella* türünün daha dayanıklı önositoidlere sahip oldukları tespit edilmiştir [75]. Fagositik özellikleri olduğuna dair bir bilgiye rastlanılmamıştır. Bazı önositoidler çubuk, iğne veya kristal şeklinde sitoplazmik inklüzyonlar içerebilmektedir. Dropsophila'daki önositoidler, inklüzyonların şekli nedeniyle kristal hücreler olarak adlandırılırlar [81, 106]. Lepidopterlerde bağışıklık sisteminde ve yara iyileştirmede önemli rol oynadıkları ve hemolenfin koyulaşmasından (melanizasyon) sorumlu olan fenoloksidazın bu hemositlerde bulunduğu bilinmektedir [97, 107-109]. Ashida ve ark. (1988) fenoloksidazın *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae)' de önositoidler içinde sentezlendiği ve bu hücrelerin parçalanmaları sırasında plazmaya salındığı tespit edilmiştir [109].

Siferülositler çapları 5-25 µm arasında değişebilen küresel veya oval hemositlerdir [77, 95]. Bu hücrelerin dolaşımdaki oranı tüm hemosit populasyonuna göre %5'den daha azdır [75]. Siferülositler sitoplazmalarını tamamen doldurarak hücre zarının gerilmesine sebep olan 1,5-3 µm çapındaki siferülleriyle (kürecik) tanınırlar [75]. Histokimyasal analizler doğrultusunda siferüllerin mukupolisakkarit ve glikomukoprotein içerikte olduğu belirtilmiştir [77]. Sitoplazmalarında ribozomlar, lizozomlar, golgi aygıtı, mitokondri ve endoplazmik retikulum da bulunmaktadır [104]. Bazı araştırıcılar siferülositlerin; ipek üretimi, melanizasyon, fagositoz ve pıhtılaşmada görev aldıklarını savunsalar da bu hücrelerin bağışıklık sistemindeki işlevleri henüz kesinlik kazanmamıştır [77, 93, 95].

Apoptoz ve nekroz: Hemositler, yabancı organizmalara veya toksik maddelere karşı bağışıklık tepkilerini ortaya koyarken nekrotik veya programlanmış hücre ölümlerinin meydana geldiği bilinmektedir [110-113]. Ayrıca hemosit şekillerinde ve mitotik indekste farklılaşmalar olduğu da belirlenmiştir [77, 114]. Apoptoz hücrenin içsel intihar mekanizmasıdır. Apoptoz sırasında hücre, içeriğini dış ortama bırakmaz ve bu durumdan etraftaki hücreler etkilenmez [115, 116].

Apoptoz geçiren hemositlerde de tipik olarak hücrede küçülme, hücre zarında kabarcıklaşma, kromatinde yoğunlaşma ve DNA'nın parçalanması dikkat çekmektedir [110, 116]. Ayrıca hemosit şekillerinde ve mitotik indekste farklılaşmalar olduğu tespit edilmiştir [77, 114].

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 [116, 117].

Hücre apoptozuna ve nekrozuna özgü özelliklerin belirlenebilmesi için floresans mikroskobisi 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 çifte boyama tekniği kullanılarak hazırlanan preparatlar ise floresans mikroskobunda 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 [118]. Ethidium Bromide ise membran bütünlüğü bozulmuş hücrelere girerek DNA'ya bağlanıp kırmızı floresans yaymaktadır (apoptozun geç evresi ve nekroz).

Apoptoza uğrayan hücrelerde sitoplazmik kabarcıklar bu hücrelerin plazma zarlarında görülmektedir [119]. Oluşan bu kabarcıklar genellikle hücre iskeleti - hücre zarı ilişkilerinin bozulması sebebiyle gerçekleşmektedir. Bu bozulmanın Ca^{+2}-bağlı proteazların aktivasyonundan kaynaklandığı savunulmaktadır [120, 121]. Proteaz aktivasyonu hücre içi kalsiyum seviyesinde artışa sebep olmaktadır [122]. Ca^{+2}'un L-tipi kalsiyum kanallarıyla plazma membranından hücre içine girmesi ve hücre içi depolardan kalsiyum mobilizasyonu birçok virüsün temel etkisidir [123].

Böcek hemositleriyle ilgili çalışmalar her geçen gün daha fazla önem kazanmaktadır. Farklı yöntem ve teknikler kullanılarak bu konuyla alakalı araştırmalar geniş bir alana yayılmıştır. Literatür taraması sonucu *A.grisella* ile ilgili çalışmaların sınırlı

sayıda olması ve bu güve türünün konak canlı olarak biyolojik mücadelede önemli bir yere sahip olması çalışma konumuzun belirleyici unsurlarından biri olmuştur. Bir BGD olan IAA'nın *A.grisella* hemositlerine etkilerini araştırmak üzere ileride yapılacak çalışmalara yararlı olacağını umut ederek bu çalışmaya başladık. Bitki gelişim düzenleyicilerinin böcekler üzerinde bilinmeyen pek çok etkisinin olduğunu düşünerek bu alandaki çalışmaların çeşitlendirilmesi gerektiği kanısındayız.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Laboratuvar

Laboratuvar olarak 1,93 x 2,40 x 3,00 ve 1,37 x 2,20 x 3,00 metre boyutlarında birbirinden farklı iki oda kullanıldı. Bütün deneyler süresince laboratuvarlarda, 25 ± 2°C sıcaklık, %60 ± 5 bağıl nem ve 12: 12 saat A: K (Aydınlık: Karanlık) fotoperiyot şartları devam ettirildi. Sıcaklık termostatlı radyatör kullanılarak, oda içi nispi nem radyatörün her iki yanına asılan içi su dolu plastik kaplarla ve gerektiğinde belli zamanlarda laboratuvar zeminine su dökülerek sağlandı. Sıcaklık ve nem maksimum-minimum termometre ve higrometre ile devamlı olarak takip edildi. Aydınlık ve karanlık süresi zaman ayarlı fotoperiyot cihazı ile ayarlandı. İndol-3-asetik asit uygulamaları aynı koşullara sahip ayrı bir odada yapıldı.

2.2. *A. grisella* Kültürü

Deneylerde küçük balmumu güvesi, *A. grisella*'nın larvaları kullanıldı. *A. grisella*'nın laboratuvar süksesif kültürlerinin kaynağını, KOÜ Hayvan Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarından alınan ve içinde *A. grisella*'ya ait larva, pup ve erginler bulunan çekirdek kültür oluşturdu. Bu larva, pup ve erginler bir arada, doğal petek ve yarı sentetik besin içeren, ağzı hava sirkülâsyonunu önlemeyecek şekilde bez ile kapatılmış, çeşitli hacimlerdeki kavanozlara konularak *A. grisella* stok kültürü oluşturuldu. *A. grisella* stok kültürü Bronskill [124] besinindeki kepek oranı değiştirilerek modifiye edilen [125] besin ortamında devam ettirildi. Bronskill'in [124] önerdiği besin içeriği ve Sak ve ark. [125] tarafından yapılan değişiklik Tablo 2.1'de verilmektedir.

Laboratuvarda *A. grisella* süksesif kültürleri oluşturmak için onbeşer gün aralıklarla stok kültürden alınan 3-5 adet en çok iki gün yaşlı dişi ve 3-5 adet en çok iki gün yaşlı erkek *A. grisella* erginleri, yukarıda belirtildiği gibi, içerisinde besin bulunan bir litrelik cam kavanozlar içine bırakıldı. Kavanozların ağzı hava sirkülâsyonunu önlemeyecek şekilde bez ve üstüne ince delikler açılmış metal kapaklar ile kapatıldı.

Stok ve süksesif kültür kaplarına populasyon yoğunluğuna bağlı olarak azalan *A. grisella* besinini karşılamak için zaman zaman yeterli miktarda yarı sentetik besin ve balsız kuru siyahlaşmış petek ilave edildi. Süksesif *A. grisella* kültürlerini kurma işlemine, hem kültürün devamını sağlamak hem de deneylerde kullanılacak larvaları verecek erginleri elde etmek için deneyler boyunca devam edildi.

Tablo 2.1. Bronskill tarafından önerilen besin içeriği ve içerikte yapılan değişiklik

	Bronskill Besini	Kullanılan Besin
Ufalanmış Petek	200 g	200 g
Kepek	500 g	860 g
Süzme Bal	150 ml	150 ml
Gliserin	300 ml	300 ml
Saf Su	150 ml	150 ml

2.3. İndol-3-Asetik Asit ve Uygulanışı

IAA fitohormonlar grunun bir üyesidir. Temel oksin olarak nitelendirilen IAA triptofan amino asiti tarafından sentezlenmektedir. IAA bitkilerde büyüme ve gelişmede oldukça önemli görevlere sahiptir. Beyaz toz halinde bulunan IAA'nın kapalı formülü $C_{10}H_9NO_2$, molekül ağırlığı ise 175.2'dir [57]. Çalışmamızda kullanılan IAA, saf su ile karıştırılarak 2, 5, 10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 ppm'lik dozlarda hazırlandı ve yarı sentetik besine saf su oranı kadar ilave edildi.

2.4. Deney Grupları

Her bir IAA dozu (2, 5, 10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 ppm) için 5 gr sentetik besin içeren 210 ml'lik cam kavanozlara 1-2 günlük bir dişi ve bir erkek *A.grisella* ergini çiftleşip yumurta bırakmak üzere bırakıldı. Kavanozların ağzı hava sirkülasyonunu engellemeyecek şekilde bez ve delinmiş kapaklarla kapatıldı. 25±2°C sıcaklık, %60±5 bağıl nem ve 12: 12 saat (Aydınlık: Karanlık) fotoperiyot şartlar içeren ortamda bekletildiler. Kontrol grupları için de aynı yöntem kullanıldı. Fakat kontrol

gruplarına IAA, yerine saf su verilmiş besin eklendi. Kavanozlara bırakılan yumurtalardan çıkan larvaların gelişimi de yine aynı koşullar altında gerçekleşti. Kavanozlardaki larvalar belirli ağırlığa geldiğinde hemolenf toplamak ve deneylerde kullanılmak üzere ayıklandı. Tekrar gruplarında kullanılacak olan bireylerin farklı zamanlarda ve farklı kültürlerden alınmasına özen gösterildi

2.5. *A. grisella* Hemolenf Analizi

IAA'nın *A.grisella* larval hemositlerine etkilerinin belirlenebilmesi için 2, 5, 10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 ppm' lik dozlar ve kontrol grubu ile çalışıldı. Deneylerde kullanılacak olan *A.grisella* larvalarının 0,02-0,05 gr ağırlığında olanları seçildi. Seçilen larvalar %70 lik alkolle temizlendikten sonra distile su ile yıkandı. Hemolenf almak için üçüncü ön bacak bölgesinden ince uçlu diseksiyon iğnesiyle delinip çıkan hemolenften 4 µl hemolenf mikro kapiller tüp ile çekildi. Alınan hemolenf toplam hemosit sayıları, hemosit tipleri, mitotik indeks ve apoptotik indeks analizleri için kullanıldı.

2.5.1. Toplam hemosit sayısı

Farklı dozlardaki IAA'nın *A.grisella* toplam hemosit sayılarına etkilerinin belirlenmesi için yapılan deneylerde her doz ve kontrol grubu için 15'er larva kullanıldı. Deneylerde kullanılan larvaların farklı zamanlarda hazırlanan kavanozlardan seçilmiş olmasına özen gösterildi. 15'er larva 3'erli gruplara ayrılarak deneyler 5 kez tekrar edildi. 2-1000 ppm doz aralığındaki IAA içeren besin ile beslenen larvalar ile kontrol grubundaki larvaların hemositleri 3 kez sayılarak ortalaması alındı. Bu işlem, her tekrardaki larvaların hemositleri için yapıldı. 0,02-0,05 gr aralığındaki larvaların üçüncü ön bacak bölgesinden 4 µl alınan hemolenf mikrokapiller tüp (Sigma) yardımıyla alındı. Alınan hemolenf buzda bekletilen ve içerisinde 20 µl pıhtılaşmayı önleyen solüsyon (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M Na_2EDTA ve 0,041 M Citric asit, pH 4,5) [100, 114, 126, 127] bulunan ependorf tüplere eklendi. Hücre süspansiyonu 1:6 oranında seyreltilerek mikropipet yardımıyla birkaç kez çekilip bırakılarak karıştırıldı. Karıştırılan bu hücre süspansiyonundan 10 µl mikropipet yardımıyla çekilerek 0,100 mm derinliğindeki Neubauer hemositometresine (Improved Neubauer Hemocytometer) yüklendi. Hemositler Olympus BX51 marka faz – kontrast mikroskobunda sayıldı.

Neubauer hemositometresi üzerinde iki farklı sayım alanı bulunan ve bu sayım alanlarının bir çukurlukla birbirinden ayrıldığı sayma lamı vardır. Her bir sayım alanında köşelerde dört tane büyük kare bulunur. Bunlar 16 orta büyüklükte kareye ayrılmıştır. Ortada bulunan büyük kare ise 25 orta büyüklükte kareye ayrılmışlardır. Orta büyüklükteki karelerin etrafı çift çizgi ile çevrilmiştir. Her bir orta kare de 16 küçük kareye bölünmüştür. Böylece, ortadaki alanda 25 orta kare, 400 küçük kare vardır. 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.

2.5.2. Hemosit tipleri ve mitotik indeks

2-1000 ppm doz aralığındaki IAA'nın *A.grisella* larvalarının hemosit sayıları üzerindeki etkilerinin saptanması amacıyla 0,02-0,05 gr aralığındaki larvalar seçildi. Seçilen larvalardan hemolenf alabilmek amacıyla larvalar hareketlerinin yavaşlaması için buz üstünde bekletildi. Larvalar %70 lik etanol ile silindikten sonra, üçüncü ön bacak bölgesinden bacak üzerinden ince uçlu diseksiyon iğnesi ile delindi. Delinen bölgeden çıkan hemolenf mikrokapiller tüp (SIGMA) yardımıyla alındı. Alınan 4 µl hemolenf melanizasyon oluşmadan hızlı bir şekilde daha önceden alkolle temizlenen lamlar üzerine alınarak yayıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruma gerçekleştikten sonra hemositlerin fiksasyonu için lamlar 5 dakika süre ile metanol: asetik asit (3:1) çözeltisi içinde bekletildi. Metanol üzerlerinden akıtıldı ve lamlar kurumaya bırakıldı. Hemositlerin boyanabilmesi için taze olarak hazırlanan Giemsa (MERCK Giemsa's Azure Eosin Methylene Blue Solution) boya çözeltisi (2 ml giemsa boya solüsyon içerisinde 58 ml PBS (pH 7,4) bulunan lam boyama kaplarına yavaşça damlatılarak karıştırıldı ve 10 dakika bekletildi. Her defasında Giemsa çözeltisi taze olarak hazırlandı.) kullanıldı. Lamlar kuruduktan sonra Giemsa çözeltisinde 5 dakika bekletildi.

Boyanan lamlar sırasıyla saf su ve PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi, Sigma) de 5'er dakika bekletildi. Kuruyan lamlar entellan ile kapatıldı ve Olympus BX51

marka mikroskopta incelendi. İncelenen preparatlardaki hemosit tipleri Er ve ark. (2010)'nın yaptıkları çalışmalar sonucu elde edilen bilgilerden yararlanılarak belirlendi [127]. Ayrıca yukarıda anlatıldığı şekilde alınan hemolenf direkt olarak lam üzerine yayıldı ve hemosit tiplerinin belirlenebilmesi için Olympus BX51 marka faz – kontrast özelliği olan mikroskopta incelendi. Her IAA dozu ve kontrol grupları için hazırlanan preparatlarda 400 hücre sayılarak farklı hemosit tiplerinin sayıları belirlendi. Ayrıca mitotik indeksin belirlenmesi için de hazırlanan bu preparatlarda mitoz evresindeki hemositler sayıldı ve sonuçlar (%) oranlar olarak değerlendirildi. Deneyler her biri üç larvadan oluşan gruplarda beş kez tekrar edildi.

2.5.3. Apoptotik indeks

Acridine Orange (AO) ve Ethidium Bromide (EB) genel olarak apoptozun belirlenmesinde kullanılan floresan boyalardır. Böcek hemositlerinde apoptotik indekste bu yöntem kullanılacağı Er ve ark. (2010)'nın yaptığı çalışmada gösterilmiştir [127]. Yapılan bu çalışmalara dayanılarak boyalar PBS içinde 100 µg/ ml AO (Sigma) ve 100 µg/ ml EB (Sigma) derişimlerinde hazırlandı. *A. grisella* 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 4'er µl ilave edilerek preparat bekletilmeden Olympus BX51 marka floresans mikroskobunda mavi ışıkta incelendi. Preparatlarda incelenen hemositler boyanma özelliklerine göre canlı hücreler, erken apoptotik hücreler, geç apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler olarak 4 farklı şekilde sınıflandırıldı:
Canlı hücreler: Nükleus yeşil, stoplazma turuncu veya kırmızı görünebilir.
Erken apoptotik hücreler: Hücre membran bütünlüğü bozulmamıştır ancak kromatin yoğunlaşması ve fragmantasyonu vardır, nükleus parlak yeşil görünür.
Geç apoptotik hücreler: Sekonder nekroz veya apoptotik nekroz da denmektedir. Ethidium Bromide membran bütünlüğü bozulmuş hücrelere girerek nükleusu turuncu renge boyamaktadır. Kromatin yoğunlaşması ve fragmantasyonu vardır.
Nekrotik hücreler: Şekil olarak normal olan turuncu nükleus gözlenir [83, 84, 128].

Her IAA dozu ve kontrol grubu için hazırlanan preparatlarda yukarıdaki sınıflandırmaya göre 300 hücre sayıldı ve sonuçlar (%) oranlar olarak değerlendirildi. Deneyler her biri üç larvadan oluşan gruplarda beş kez tekrarlandı.

3. İSTATİSTİK

IAA uygulaması ve kontrol gruplarından elde edilen ortalamalar tek 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 17.0) kullanıldı. Değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi $\alpha=0.05$ olarak esas alındı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Hemosit Sayısı

A.grisella larvalarında, farklı dozlardaki (2-1000 ppm) IAA'nın toplam hemosit sayılarına etkileri Tablo 4.1'de verildi. Kontrol grubunda *A.grisella* larvalarının hemosit sayısı 6,38 x 10^6 hücre/ml olarak belirlendi. IAA dozuna bağlı olarak, deney gruplarının toplam hemosit sayılarında kontrol grubuna kıyasla düzenli bir artış ya da azalma olmadığı tespit edildi. IAA uygulanan dozlarda kontrol grubuna göre hemosit sayısında artış görüldü. Özellikle de 2 ppm'de toplam hemosit sayısı 9,55 x 10^6 hücre/ml olarak en yüksek seviyeye ulaştı. 5 ppm ve 10 ppm'de ise hemosit sayısının kontrol grubuna yakın olduğu belirlendi. IAA uygulanan deney grupları ve kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (F=5,488, df=8, P=0,000).

Tablo 4.1. IAA'nın *A.grisella* larvasında toplam hemosit sayılarına (x10^6hücre/ml) etkileri

Deney grupları (IAA)	Min-Maks	(Ortalama ± SH) *
Kontrol	4,60-8,74	6,38±0,38a
2 ppm	6,82-12,92	9,55±0,56c
5 ppm	4,86-9,38	6,91±0,42ab
10 ppm	4,80-9,28	6,72±0,32ab
50 ppm	5,58-9,86	7,19±0,31ab
100 ppm	6,00-10,48	8,38±0,44bc
200 ppm	5,42-10,66	8,08±0,45abc
500 ppm	5,12-11,10	7,47±0,44ab
1000 ppm	5,28-10,42	7,26±0,39ab

* Her biri 15 larvanın toplam hemosit sayısı ortalamaları ve standart hatalarını göstermektedir. Aynı sütunda (a-c) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir. Minimum (Min), Maksimum (Maks).

Lepidoptera'ya ait bazı türlerle yapılan çalışmalarda hemolenfteki hemosit sayılarının; yaralanma, bakteriyal, fungal, viral enfeksiyon ve çeşitli stres koşullarına karşı benzer değişiklikler gösterdikleri belirlenmiştir [80, 129-135]. Yapılan bir çalışmada stres faktörü olan sıcaklık artışına bağlı olarak önce hemosit sayılarının arttığı, sıcaklığın uygulandığı süre uzadıkça hemosit sayılarının azaldığı görülmüştür. Bu durumun hücre döngüsünün durması nedeniyle olduğu belirlenmiştir. Böceklerde hücre bölünmesi böceğin gelişim evresine bağlı olmakla birlikte 20-hidroksiekdizon (20E) ve jüvenil hormon (JH) gibi hormonların hemolenfteki konsantrasyonları ile düzenlenmektedir [155]. İzzetoğlu ve Karaçalı (2003) yaptıkları çalışmada *G. mellonella*'nın hemositlerinde 20-hidroksiektizon'un doza bağlı olarak toplam hemosit sayısını azalttığını belirltmişlerdir [136]. *A.grisella* ile yaptığımız çalışmada ise IAA'nın, larval hemosit sayısında tüm dozlarda artış gösterdiği belirlendi. Özellikle de 2 ppm'de önemli bir artış olduğu tespit edildi. Hemosit sayısının, deney gruplarında artış göstermesi IAA 'ya karşı savunma sisteminin devreye girmesinden kaynaklanabilir. Bu konuda yapılacak tekrarlı denemeler daha kapsamlı sonuçların çıkmasını sağlayacaktır.

4.2. Mitotik İndeks

Farklı dozlardaki IAA'nın farklı hemosit tiplerine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan tüm preparatlarda mitotik evreler de belirlendi (Şekil 4.2). Ayrıca apoptotik indeks çalışmaları için hazırlanan preparatlarda da mitotik evredeki hemositler incelendi (Şekil 4.1). Mitotik indeksin dozlara bağlı olarak % değişimi Tablo 4.2'de verildi. Mitotik indeks oranı en az 2 ppm'de, en az fazla 100 ppm'lik gruplarda görüldü. 5 ppm, 10 ppm ve 100 ppm'de mitotik indeks oranı kontrol grubuna göre artış gösterdi. Mitotik indeks oranının 200 ppm ile 1000 ppm'lik dozlar arasında tekrar kontrol grubundaki orana yaklaştığı ve *A.grisella* hemositlerindeki mitotik indeks oranının IAA'nın yüksek dozlarından etkilenmediği görüldü ($F=0,294$, $df=8$, $P= 0,967$).

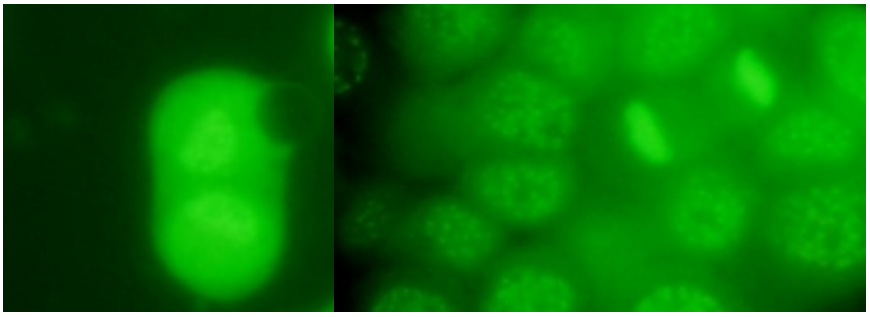
Tablo 4.2. IAA'nın *A.grisella* larva evresindeki mitotik indeks (%) değişimleri

Deney grupları (IAA)	Min-Maks	(Ortalama ± SH) *
Kontrol	0,00-1,75	0,88±0,13a
2 ppm	0,00-2,00	0,72±0,14a
5 ppm	0,00-2,75	0,92±0,20a
10 ppm	0,25-2,75	0,95±0,16a
50 ppm	0,00-1,75	0,75±0,15a
100 ppm	0,00-3,00	0,97±0,21a
200 ppm	0,25-2,25	0,80±0,18a
500 ppm	0,25-2,00	0,88±0,16a
1000 ppm	0,25-2,75	0,78±0,16a

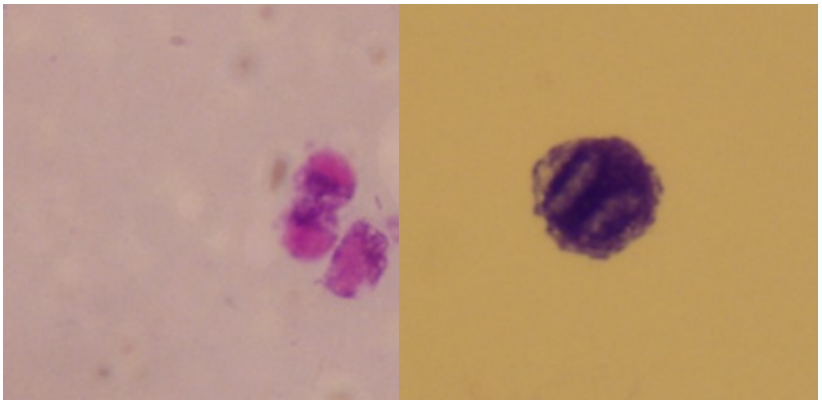
* Her biri 15 larvanın 400 hücredeki mitotik indeks yüzdelerinin ortalamalarını ve standart hatalarını göstermektedir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir. Minimum (Min), Maksimum (Maks).

Hamile farelerin deri altına uygulanan IAA'nın üçüncü nesil fare kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksi kontrol grubuna göre arttırdığı gözlenmiştir [137]. Bunun yanı sıra IAA'nın birinci ve ikinci nesil farelerde kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksi artırdığı da belirtilmiştir [137]. Mitotik indeks artışının, IAA'nın DNA ve RNA miktarlarını arttırması sebebiyle olabileceği tahmin edilmektedir [138].

Bitkilerde hücre bölünmesini uyaran BGD'ler, böceklerde de hücre döngüsünün düzenlenmesini kontrol eden molekülleri uyararak hücre bölünmesini artırmıştır. [139]. *G. mellonella, B. mori* ve *Euxoa declarata* ile yapılan çalışmalarda dolaşıma katılan hemositlerin %1-8 oranında mitotik fazda olduğu belirlenmiştir [79, 121, 122, 128, 143-144]. Mitotik indeksin araştırıldığı bir başka çalışmada *G. mellonella*'daki hemositlerin %1 oranında mitotik fazda olduğu ve bu oranın larval evre boyunca hemosit devamlılığı için yeterli olduğu belirlenmiştir [145]. Yaptığımız çalışmada ise IAA doz uygulamalarının mitotik indeks oranını etkilemediği görüldü. Mitotik indeks oranı kontrol grubunda %0,88 olarak belirlendi. Bu oran benzer çalışmalardaki oranlardan (%1-8) kısmen farklı olsa yakın değerde olması çalışmamızı destekler niteliktedir.



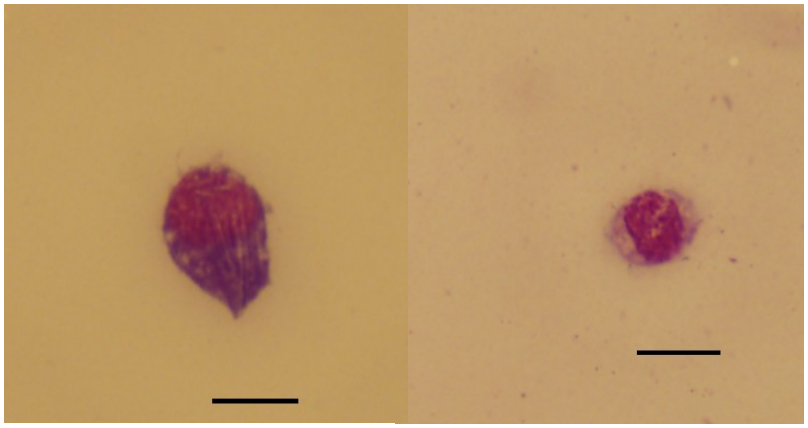
Şekil 4.1. *A.grisella* larval dönemde mitoz evresinde hemositlerin floresans mikroskop görüntüleri. Büyütme: 1000X



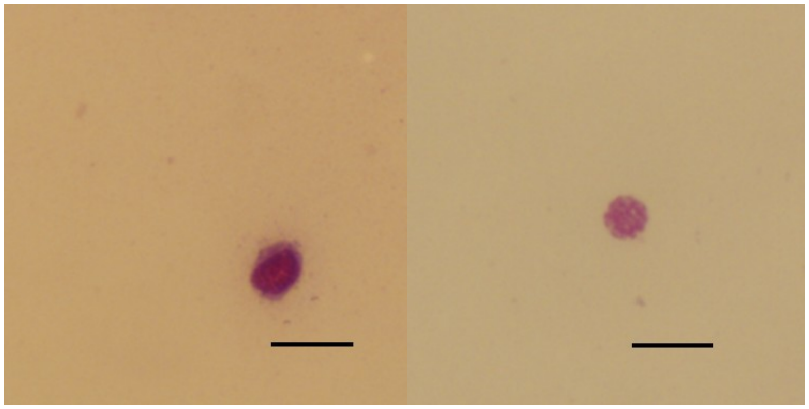
Şekil 4.2. *A. grisella* larval dönemde giemsa boyama yöntemi ile gözlemlenen mitoz evresinde hemositler. Büyütme: 1000X

4.3. Hemosit Tipleri

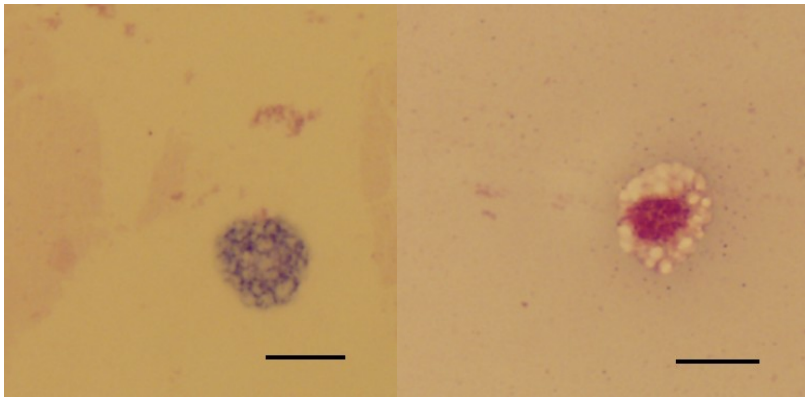
2-1000 ppm doz aralığındaki IAA'nın *A.grisella* larvalarının hemositleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle *A.grisella* larval hemosit tipleri belirlendi. *A.grisella*'nın farklı tiplerdeki hemositleri giemsa ile boyandıklarında çekirdeklerinin açık-koyu pembe, stoplazmalarının ise açık-koyu lacivert olduğu görüldü. Mikroskobik inceleme sonucunda *A.grisella* larval hemosit tipleri plazmatositler (Şekil 4.3), granülositler (Şekil 4.5), siferülositler (Şekil 4.6), prohemositler (Şekil 4.4) ve önositoidler (Şekil 4.6) olarak belirlendi. Ayrıca hemosit tipleri Olympus BX51 marka faz – kontrast mikroskobunda da incelendi (Şekil 4.7). IAA'nın *A.grisella* hemosit tiplerine etkilerinin belirlendiği çalışmalarda tüm hemosit tipleri her preparatta 400 hücre olacak şekilde sayıldı ve veriler Tablo 4.3'de verildi.



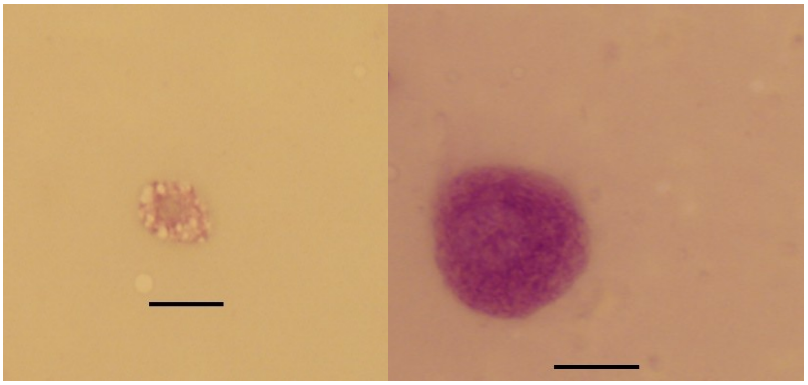
Şekil 4.3. *A.grisella* larvalarında giemsa boyama yöntemi ile gözlemlenen plazmatositler. Ölçü barı: 10 µm



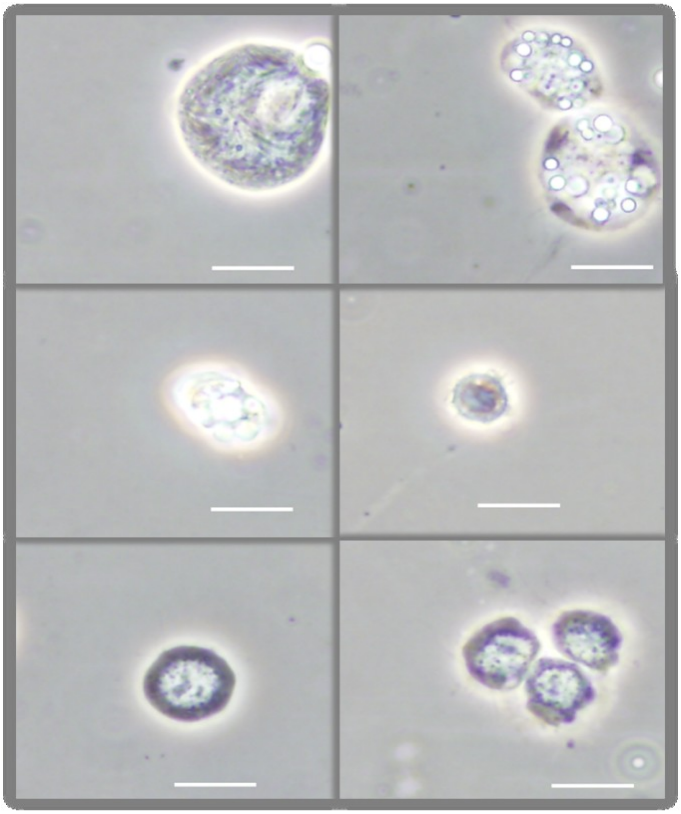
Şekil 4.4. *A.grisella* larvalarında giemsa boyama yöntemi ile gözlemlenen prohemositler. Ölçü barı: 10 µm



Şekil 4.5. *A.grisella* larvalarında giemsa boyama yöntemi ile gözlemlenen granülositler. Ölçü barı: 10 µm



Şekil 4.6. *A. grisella* larvalarında giemsa boyama yöntemi ile gözlemlenen siferülosit ve önositoid. Ölçü barı: 10 µm



Şekil 4.7. *A.grisella* larvalarında hemositler. Faz kontrast fotoğrafı. Ölçü barı = 10 µm. Plazmatosit (PL), granülosit (GR), siferülosit (SF), prohemosit (PR), Önositoid(ON).

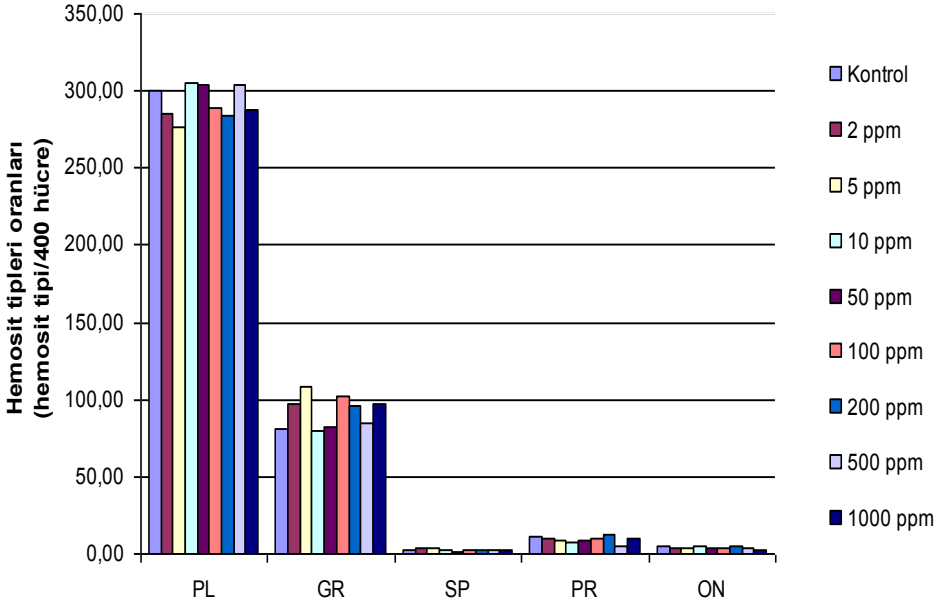
Farklı IAA dozlarına bağlı olarak *A.grisella* larvalarının hemosit tiplerinin belirlendiği çalışmada kontrol ve deney gruplarında en fazla bulunan hemositlerin plazmatositler (PL) olduğu belirlendi. Deney gruplarından 10 ppm, 50 ppm ve 500 ppm'de plazmatosit sayısı artış gösterirken diğer dozlarda kontrole göre azalma olduğu görüldü (Tablo 4.3). Fakat bu farklılıklar kontrol grubuna göre anlamlı

değildi (F= 2,098, df= 8, P= 0,41). Plazmatositler'den sonra *A. grisella* larvalarında 2. en yoğun hemosit tipi granülosit (GR)'lerdi. IAA uygulamasına maruz kalmayan gruplara göre deney gruplarının granülosit sayısında 10 ppm haricinde artış olduğu gözlendi. Granülosit sayılarının en yoğun 5 ppm'de olduğu belirlendi (F= 1,824, df=8, P= 0,78). Diğer hemosit tiplerine göre daha az sayıda bulunan siferülositler (SP) 5 ppm'e kadar artış gösterip en yüksek seviyeye ulaştıktan sonra 10 ppm'den itibaren tekrar azalma gösterdi (F=0,779, df=8, P= 0,622). Prohemosit (PR) sayısında kontrol grubuna göre 200 ppm hariç diğer IAA dozlarında azalma gözlendi (F=1,715, df=8, P= 0,101). Önositoid (ÖN) sayısının ise sadece 10 ppm'lik deney grubunda artış gösterdiği görüldü (F=0,850, df=8, P= 0,561).

Tablo 4.3. IAA'nın *A.grisella* larvalarının farklı hemosit sayılarına etkileri

	Hemosit Tipleri (hücre/400) * (Ortalama ± SH) **				
Deney grupları (IAA)	PL	GR	SP	PR	ÖN
Kontrol	300,67±6,66a	80,87±7,79a	2,40±0,72a	11,53±1,91a	4,53±0,80a
2 ppm	285,40±7,90a	97,67±7,47a	3,13±0,65a	9,60±1,33a	4,27±1,1a
5 ppm	276,93±7,44a	107,80±7,53a	3,60±0,89a	8,73±2,09a	3,60±0,87a
10 ppm	305,60±5,31a	80,33±5,92a	2,07±0,32a	7,27±1,50a	5,40±0,77a
50 ppm	304,13±7,12a	81,87±6,90a	1,80±0,54a	8,47±1,34a	3,93±0,96a
100 ppm	288,80±7,44a	101,60±7,83a	2,13±0,60a	10,00±1,94a	4,13±0,70a
200 ppm	284,20±9,21a	95,47±9,58a	2,73±0,75a	12,47±1,97a	4,53±0,82a
500 ppm	304,20±7,59a	85,20±7,28a	1,93 ±0,51a	5,20±0,97a	3,47±0,63a
1000 ppm	287,53±6,91a	96,93±6,60a	2,73±0,92a	10,07±1,61a	2,73±0,61a

* Her biri 15 larvanın 400 hücredeki farklı hemosit sayıları ortalamaları ve standart hataları göstermektedir.
**Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir. PL: Plazmatosit, GR: Granülosit, SP: Siferülosit, PR: Prohemosit ve ON: Onositoid'in ortalama ve standart hataları.



Şekil 4.8. IAA'nın konak *A. grisella* farklı hemosit sayılarına etkileri

Ashhurst ve Richards (1964) [146] tarafından *G.mellonella* hemositleri üzerinde yapılan bir çalışmaya göre temel hemosit tiplerinin prohemositler, plazmatositler, adipohemositler, siferül hücreler ve önositoidler olduğu belirtilmiştir. Jones (1967) [106] prohemositlerin ve plazmatositlerin ayrımının zor olması nedeniyle iki hemosit tipini "plazmatositoid" olarak adlandırmıştır. Neuwirth (1973) [147] *G.mellonella* ile daha önce yapılan çalışmalarda yağ damlaları içeren adipohemosit olarak adlandırılan hemosit tipinin aslında granüler hemosit olduğunu ve pup evresine yaklaştıkça bu yağ damlalarının genişlediklerini ve sayılarının arttığını belirtmiştir.

B. mori ile yapılan bir çalışmada hematopoietik organdaki dolaşıma katılan prohemositlerin önce plazmatositlere farklılaştığı ve dolaşımdaki granülositler, siferülositler ve önositoidlerin plazmatositlerden köken aldıkları belirtilmiştir. [128, 148]. *B. mori*'de kısa vadeli hemosit kültürü çalışmalarında prohemositlerin plazmatositler, granülositler ve siferülositlere farklılaşabileceği bildirilmiştir [149]. *Pseudoplusia includens* ve *Spodoptera frugiperda* üzerinde yapılan çalışmalarda bu canlıların hematopoietik organlarında prohemositler ve plazmatositlere rastlanılmış fakat diğer hemosit tipleri sadece dolaşımda tespit edilmiştir [150]. Yine aynı çalışmada hematopoietik organlardaki prohemosit veya plazmatositler ile dolaşımdaki önositoidlerin haricinde tüm hemosit tiplerinin aktif olarak bölündüğü de belirtilmiştir [150].

Yapılan çalışmalarda, morfolojik, histokimyasal ve fonksiyonel karakterlerine göre Lepidopterlerdeki temel hemosit tipleri prohemositler, granülositler, plazmatositler, siferülositler ve önositoidler olarak belirlenmiştir [50, 85, 86]. Er ve ark. (2010)'nın çalışmalarında [129] ve farklı bir çalışmada da *G. mellonella* hemosit tipleri belirlenerek [146] larva evresindeki esas hemosit tiplerinin prohemositler, plazmatositler, adipohemositler, siferül hücreler ve önositoidler olduğu belirtilmiştir.

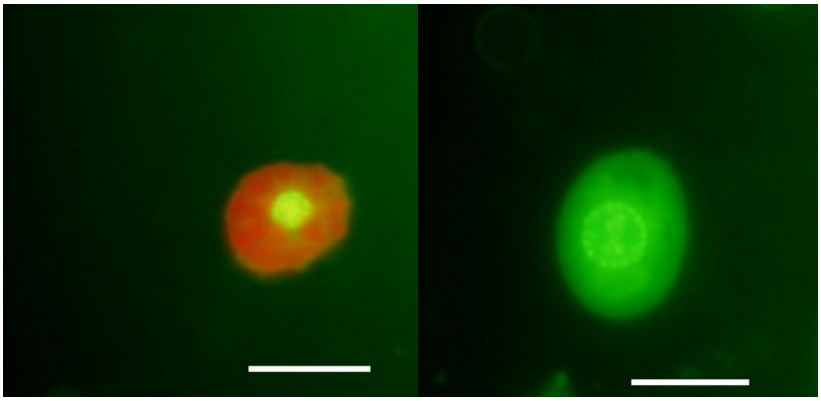
G. mellonella ile yapılan başka bir çalışmada larva hemolenfinde mevcut olan hemosit tipleri prohemositler, plazmatositler, granülositler, siferülositler ve önositoidler; pup hemolenfinde ise prohemositler, plazmatositler, granülositler ve siferülositler temel hemosit tipleri olarak belirlenmiştir. İncelenen pup preparatlarında önositoidlere rastlanılmadığı belirtilmiştir [151]. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalarda pupal evreye yaklaştıkça önositoid sayısının azaldığı ve pupal evrede önositoidlerin görülmediği bildirilmiştir [106, 150, 152-155]. Çalışmamızda hazırlanan preparatların mikroskobik incelemesi sonucunda *A.grisella*'nın larva hemolenfindeki hemosit tipleri; prohemositler, plazmatositler, granülositler, siferülositler ve önositoidler olarak belirlendi. Ayrıca bu çalışmada hemosit tipleri arasında en yoğun bulunanların plazmatositler ve granülositler olduğu görüldü (Şekil 4.8). Benzer çalışmalarda aynı hemosit tiplerinin bulunması çalışmamızı destekler niteliktedir. Yaptığımız çalışmada belirli ağırlıklar arasında larvalar seçildiği için pup evresine gidildikçe önositoid sayısında değişikliklerin olup olmadığı kesinleşmemiştir. Bu konuda tekrarlı deneylerin yapılması daha net sonuçlar elde etmemizi sağlayacaktır.

4.4. Apoptotik İndeks

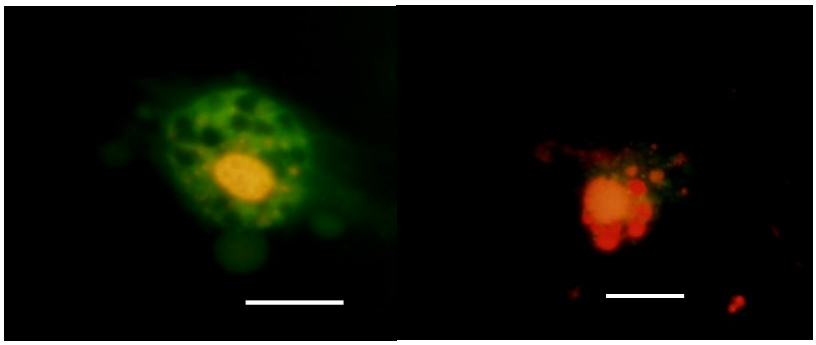
Apoptoza uğrayan hemositlerde büzülme, hücre zarında kabarcıklaşma, sitoplazmada balonlaşma ve sitoplazmik içerikte büzülme gözlenir. Çekirdek zarının çevresinde heterokromatin birikimler, kromatinde yoğunlaşma ve DNA'nın parçalanması meydana gelir [110, 156]. Son olarak, hücre küçük fragmentlere ayrılarak apoptotik cisimcikleri oluşturur [129].

Acridine Orange/ Ethidium Bromide boyama tekniği kullanılarak hazırlanan preparatların mikroskobik incelemesi sonucu larval evrede normal hemositler (Şekil 4.9), erken apoptotik (Şekil 4.10), geç apoptotik (Şekil 4.10) ve nekrotik (Şekil 4.11)

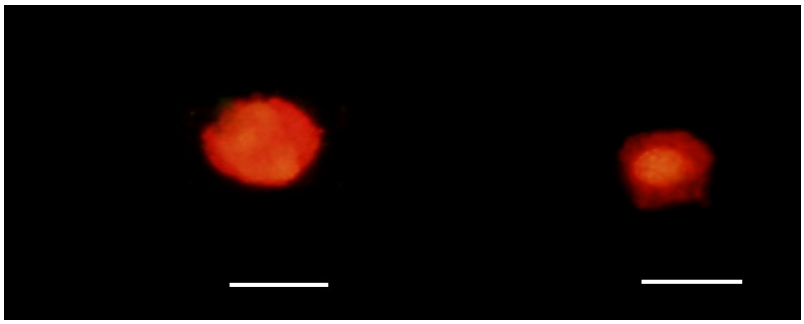
hemositler görülmektedir. Yaptığımız çalışmada IAA'nın belirlenmiş dozlarının *A.grisella*'nın larval hemositlerinde apoptotik indekse etkileri 5 tekrarlı deney serileri ile belirlendi.



Şekil 4.9. Acridine Orange ve Ethidium Bromide ile boyanmış *A.grisella* larval hemositlerinin floresans mikroskop görüntüleri. Ölçü barı = 10 µm



Şekil 4.10. *A.grisella* larval dönemde erken apoptotik ve geç apoptotik hemositlerin floresans mikroskop görüntüleri. Ölçü barı =10 µm.



Şekil 4.11. *A.grisella* larval dönemde nekrotik hemositlerin floresans mikroskop görüntüleri. Ölçü barı = 10 µm.

Kontrol ve deney gruplarında yapılan mikroskobik incelemeler sonucunda erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücrelerin (%) oranları Tablo 4.4'de verildi. IAA doz artışına bağlı olarak canlı hemosit oranında dozlar arasında anlamlı bir değişim olmazken, kontrol grubuna göre IAA uygulanan dozlarda azalma olduğu gözlendi. En az canlı hücre oranı 50 ppm'lik deney gruplarında görüldü. (F= 0,759, df= 8, P=0.64). Erken apoptozdaki hemosit oranında dozlar arasında 50 ppm'e kadar artış gözlense de 50-1000 ppm arasında tekrar azalma olduğu görüldü. Erken apoptotik hemosit oranında IAA uygulamasına bağlı olarak istatistiksel yönden değişiklikler olduğu gözlendi (F= 2,098, df= 8, P=0.04). *A.grisella* geç apoptotik hemosit oranında kontrol grubuyla deney grupları kıyaslandığında IAA uygulanan gruplarda azalma olduğu belirlendi. Özellikle de en az hemosit oranı 10 ppm'de görüldü (F= 1,76, df= 8, P=0.09). *A.grisella* larval hemositlerinde belirlenen nekrotik hücre sayısında ise uygulanan tüm IAA dozlarında kontrol grubuna göre azalma olduğu gözlendi (F= 2,390, df= 8, P=0.20).

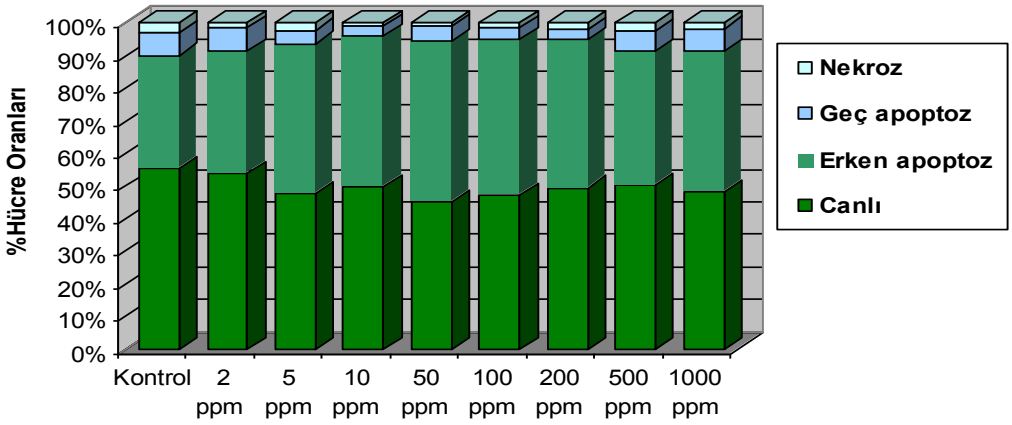
Tablo 4.4. Farklı IAA dozlarının *A.grisella* larva evresinde erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hemosit (%) sayısına etkileri

	Apoptotik İndeks (%)* (Ortalama ± SH) **			
Deney grupları (IAA)	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Nekroz	Canlı
Kontrol	34,80±3,86a	7,00±1,44a	2,91±0,77a	55,22±4,19a
2 ppm	37,64±3,12a	6,91±1,54a	1,55±0,40a	53,84±3,48a
5 ppm	45,93±3.92a	4,11±1,51a	2,20±0,64a	47,96±3,95a
10 ppm	46,36±3,58a	2,98±0,80a	0,84±0,17a	50,05±3,59a
50 ppm	49,40±3,80a	4,67±1,41a	0,93±0,23a	45,02±4,48a
100 ppm	48,02±3,17a	3,49±0,56a	1,40±0,29a	47,09±3,34a
200 ppm	45,56±3,68a	3,18±0,55a	1,80±0,34a	49,47±3,45a
500 ppm	40,20±2,87a	5,87±1,33a	2,60±0,51a	49,11±3,57a
1000 ppm	43,44±2,30a	6,85±1,61a	1,73±0,39a	48,07±2,86a

* Her biri 15 larvanın 300 hücredeki apoptotik indeks yüzdelerinin ortalamaları ve standart hatalarını göstermektedir.
**Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.

Yapılan çalışmalar doğrultusunda viral enfeksiyona uğrayan böceklerde bağışıklık sisteminin baskılanmasıyla hücresel düzeyde hücre iskeletinin bozulması, hemositlerin toplanması ve yayılma ve yabancı yüzeylere yapışma davranışlarının engellenmesi ve apoptotik yolla hücrenin ölüme gitmesi sonucu hemosit sayılarında görülen azalmalar meydana gelmektedir [105, 123, 157].

G.mellonella ile yapılan bir çalışmada Giberellik asit (GA_3)'in belirlenmiş 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 belirtilmiştir [138]. Bu sonuçlar GA_3'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 artırdığı, tümör nekrozis faktörlerinin, çeşitli stres proteinlerinin ve çeşitli hücresel enzimlerin salınmasının artışına neden oldukları belirlenmiştir [98, 158-160]. Deney sonuçlarımıza göre canlı hemosit oranında azalmalar meydana geldi. Apoptotik hücre oranındaki artışlar ise IAA'nın apoptozu tetiklediğini gösterdi. Bu sonuçlar *G.mellonella* ile yapılan çalışmayla benzer nitelikteydi. Fakat bu çalışmanın aksine yaptığımız çalışmada tüm dozlarda nekrotik hücre oranında azalmalar olduğu görüldü. Bu durum IAA uygulamasının nekrotik hücre ölümlerinin yavaşlamasına yol açtığını gösterdi. Apoptozdaki IAA'ya bağlı artış apoptozu uyaran genlerin aktifleşmesi sebebiyle olabileceği gibi apoptozu engelleyen genlerin inaktivasyonu nedeniyle de olabilir. Bu amaçla yapılacak çalışmalar daha spesifik sonuçlar elde etmemizi sağlayacaktır.



Şekil 4.12. IAA uygulamasına bağlı olarak *A. grisella* larvasında apoptotik, nekrotik ve canlı hemosit oranları. Kontrol: Herhangi bir işlem yapılmayan *A. grisella* larvası.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Günümüzde teknolojinin gelişmesi ve sanayileşmenin artmasıyla oluşan toprak, su ve hava kirliliğinin yanı sıra besin üretiminde de kimyasal maddelerin kullanılmaya başlanması çevreyi ve canlıları da etkilemiştir. Kullanılan bu kimyasalların bitki ve hayvanlar üzerinde ve besin zinciri yoluyla dolaylı ya da direkt olarak insanlar üzerindeki etkileri merak konusu olmuştur.

Bitki hormonları, bitkinin büyümesi ve gelişmesinde kullanılan oldukça önemli maddelerdir. Bu hormonlar besin üretiminde yüksek verimin sağlanması için tarımsal üretimde sıklıkla kullanılmaktadır. BGD'leri bitki büyümesi ve gelişmesinde çeşitli etkiler göstermekle birlikle; bitkilerle etkileşim halinde olan diğer canlılar için de oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle BGD'lerin etkileri sitotoksik, fizyolojik ya da gelişim biyolojisi gibi alanlarda yapılacak çalışmalarla belirlenmeli ve farklı çalışmalarla bu sonuçlar doğrulanmalıdır.

Tarımsal alanda besin üretiminde ve tarım zararlılarına karşı kullanılan hormon ve pestisit gibi kimyasal maddeler her geçen gün daha fazla kullanılmakta ve çevreye yayılmaktadır. Bu maddelerin olumsuz etkilerinin bilinmesi ancak yapılacak çalışmalara bağlıdır. BGD'lerin tarımsal faaliyetlerde kullanılmaya başlanması, BGD'lerin böceklerin farklı biyolojik dönemleri üzerindeki etkilerini gündeme getirmiş ve bu bileşimlerle ilgili çalışmaların artmasını sağlamıştır. Bitki gelişim düzenleyicilerinin farklı böcek türlerinin üreme ve verimli olarak çoğalmalarıyla ilgili çalışmalarda bu bileşiklerin zararlı etkilerinin olduğu belirtilmiştir [161, 162]. Çevre kirliliğine bağlı olarak farklı maddelerin omurgasız hayvanlarda hemosit ve diğer doku hücreleri üzerindeki etkileriyle ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. [82, 92, 110, 111, 114, 142, 145, 149]. Yaptığımız çalışmada bir BGD olan *A.grisella* larval hemositlerine etkileri belirlendi. IAA uygulaması toplam hemosit sayılarında artışa neden oldu. Kontrol gruplarında hemosit sayısı minimum 4,60 hücre/ml maksimum 8,74 hücre/ml olarak belirlendi. IAA uygulanan gruplarda hemosit sayıları; 2 ppm'de $9{,}55 \times 10^6$ hücre/ml, 5 ppm'de 6,91 hücre/ml, 10 ppm'de 6,72

hücre/ml, 50 ppm'de 7,19 hücre/ml, 100 ppm'de 8,38 hücre/ml, 200 ppm'de 8,08 hücre/ml, 500 ppm'de 7,47 hücre/ml, 1000 ppm'de 7,26 hücre/ml'dir. Deney grupları kendi aralarında kıyaslandığında toplam hemosit sayısı en fazla 2 ppm'de artış gösterdi (Tablo 4.1). Sonuçlarımıza göre IAA hemosit sayısında pozitif yönde bir etkiye sebep oldu.

Böcek hemositlerinin devamlılığı hemosit bölünmesi ve üretimine bağlıdır. Fakat dış kaynaklı etkilere sebep olarak hemosit bölünmesi durabilir, artış ve azalmalar olabilir. Gün geçtikçe önem kazanan BGD'ler böceklerde hücre bölünmesinde etkili bitkisel kaynaklı hormonlardır. Dışarıdan besin yoluyla alınan BGD'ler böceğin türüne, gelişim evresine, böceğin bulunduğu ortam koşullarına, verilen hormonun dozuna vb. faktörlere bağlı olarak hemosit bölünmesinde farklı etkilere sebep olabilirler. Yaptığımız çalışmada IAA doz uygulanmasının *A. grisella* hemositlerinde mitotik indeks oranında etkili olmadığı görüldü (Tablo 4.2). Sonuç olarak kontrol gruplarımızdan elde ettiğimiz bilgilere dayanarak mitotik indeks oranı % 0,88 olarak belirlendi.

A. grisella larva hemolenfindeki hemosit tiplerinin belirlendiği bu çalışmada IAA'nın hemosit tiplerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı görüldü. Kontrol ve deney gruplarında temel hemosit tipleri prohemositler, plazmatositler, granülositler, siferülositler ve önositoidler olarak belirlendi (Tablo 4.3). Hiçbir işleme tabi tutulmamış *A. grisella* larvasında farklı hemosit sayıları incelendiğinde dolaşımdaki hemositlerin yarısından fazlasının plazmatositler olduğu ikinci en sık karşılaşılan hemosit tipinin de granülositler olduğu tespit edildi. Hemosit tipleri içinde en düşük oranda bulunan hemosit tipinin ise siferülositler olduğu belirlendi. Plazmatosit ve granülosit sayıları yüksek IAA uygulamalarından etkilenmedi. Siferülosit sayısında IAA gruplarından bazılarında artış bazılarında azalma oldu. Prohemosit sayısı 500 ppm'de, önositoid sayısı ise 1000 ppm'de yarı yarıya azaldı.

Böceklerde bağışıklık sisteminde önemli bir yeri olan hücresel bağışıklıkta hemolenfte bulunan hemositler görev almaktadır. Hemositlerde, yabancı organizmalara veya toksik maddelere karşı bağışıklık tepkileri oluşurken programlanmış hücre ölümlerinin (apoptoz) meydana geldiği [110, 111], hemosit şekillerinde ve mitotik indekste farklılaşmalar olduğu [108, 162] daha önceki

çalışmalarda belirlenmiştir. Yaptığımız bu çalışmada IAA'nın belirlenen dozlarında erken apoptotik hücrelerde artış olduğu görüldü. 50 ppm'lik doz uygulanan gruplarda erken apoptotik oran %49,40 olarak en fazla değeri aldı. Geç apoptotik indekste ise uygulanmış IAA dozlarında özellikle de 10 ppm'de kontrol grubuna göre yaklaşık %50 oranında bir azalma meydana geldi. Kontrol grubuna göre deney gruplarında IAA dozlarına bağlı olarak 2-1000 ppm arasında nekrotik hemosit oranında düşüş olduğu yani nekrotik hemosit ölümünde azalmalara neden olduğu belirlendi. Kontrol grubunda %2,91olarak belirlenen oranın 10 ppm'de %0,84'ye kadar düştüğü görüldü. Canlı hemosit oranı ise kontrol grubunda % 55,22 olarak belirlendi ve tüm IAA dozlarında azalma olduğu gözlendi (Tablo 4.4). Elde ettiğimiz sonuçlara göre IAA doz uygulaması, hemosit oranında azalmalara yol açtı ve apoptoz mekanizmasını uyararak hemositlerin ölüme gitmesinde etkili oldu.

Açlık, enfeksiyon ve yaralanma durumunda hemosit miktarındaki farklılıklar [77, 92, 128], mitoz bölünme, hemosit farklılaşması [149], farklı gelişim evrelerinde mitoz bölünme geçiren hemosit sayıları [145] ve hemosit fonksiyonları sırasında gerçekleşen apoptoz [110, 114] gibi böcek hemositleriyle ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar arasında *A.grisella*'nın hemositleriyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. IAA'nın hemositler üzerindeki etkilerini araştırdığımız bu çalışmayla *A.grisella*'nın larva hemolenfindeki toplam hemosit sayısını, hemosit tiplerini ve mitotik indeks ile apoptotik indeks oranlarını belirledik. Yaptığımız bu çalışmada kullandığımız IAA'nın apoptoz mekanizmasını tetiklemesi, hücre bölünmesinde farklılıklara neden olması ve hemosit sayısının belki de bağışıklık savunma etkisiyle artması böcekler üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermektedir. Bu alanla ilgili yapılacak çalışmaların çeşitlilik kazanması canlılar için önemli hayatsal olayların aydınlatılmasında etkili olacaktır. Yapılacak her çalışma bir yapbozun parçaları gibi birbirini tamamlar niteliktedir. Dolayısıyla canlılarla etkileşimde olan BGD'lerin ve diğer kimyasal maddelerin etkilerinin belirlenmesi özveriyle yapılan çalışmalarla anlam kazanacaktır. Sonuç olarak IAA gibi diğer BGD'lerin de böcekler üzerindeki etkilerinin araştırılmasında yaptığımız çalışmanın bir basamak olacağı düşüncesindeyiz. Ayrıca bu çalışmanın biyolojik kontrol ve konak-parazitoid etkileşimiyle ilgili yapılacak çalışmalar için yararlı olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

[1] Hajek A. E., *Natural Enemies: An introduction to biological Control,* 1, Cambridge University Press, USA, 2004.

[2] Xu J., Shelton A. M. and Cheng X., 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*., 2001, **94**, 14-20.

[3] Andow D. A., Ragdale D. W. and Nyvall R. F., *Ecological interactions and biological control*, Westview Press, Colorado, 1997.

[4] Driesche R. G., Field measurement of population recruitment of *Apanteles glomeratus* (L.) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) and factors influencing adult parasitoid foraging success in kale, *Bull. ent. Res*., 1988, **78**, 199-208.

[5] Faulds W., Spread of Bracon phylacteophagus, a biocontrol agent of *Phylacteophaga froggatti* and impact on host, *New Zealand Journal of Foresty Science*, 1991, **21**, 185.

[6] Hassel M. P. and Waage J. K., Host-parasitoid population interactions, *Ann. Rev. Entomol*., 1984, **28**, 89.

[7] Greathead D. J. and Waage J. K., Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries, *World Bank Tecnical Paper*, 1983, **11**, 1-44.

[8] İçen E., Armutçu F., Büyükgüzel K. and Gürel A., Biochemical stress indicators of greater wax moth exposure to organophosphorus insecticides, *J. Econ. Entomol.,* 2005, **98**, 358-366.

[9] Büyükgüzel E., Tunaz H., Stanley D. W., Büyükgüzel K., Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection, *J. Insect Physiol*., 2007, **53**, 99-105.

[10] Büyükgüzel E., Tunaz H., Stanley DW., Büyükgüzel K., The influence of chronic eicosanoid biosynthesis inhibition on life history of the Greater waxmoth, *Galleria mellonella* and its ectoparasitoid, *Bracon hebetor*, *J. Insect Physiol*, 2011, **53**, 99-105.

[11] Durmuş Y., Büyükgüzel K., Biological and Immune Response of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) to Sodium Tetraborate, *J. Econ Entomol*., 2008, **101**, 777-783.

[12] Hyrsl P., Büyükgüzel E., Büyükgüzel K., The Effects of Boric Acid-Induced Oxidative Stres on Antioxidant Enzymes and Survivorship in *Galleria mellonella. Arch. Insect Biochem*., 2007, **66**, 23-31.

[13] Hyrsl P., Büyükgüzel E., Büyükgüzel K., Boric acid-induced effects on protein profiles of *G. mellonella* hemolymph and fat body., *Acta Biol. Hung*., 2008, **59**, 281-288.

[14] Hyrsl P., Büyükgüzel E., Büyükgüzel K., Effect of eicosanoid biosynthesis inhibitors on the haemolymph protein profile of *Galleria mellonella* (Linnaeus) larvae, *Turk. J. Entomol*, 2011, **35**, 397-405.

[15] Büyükgüzel E., Hyrsl P., Büyükgüzel K., Eicosanoids mediate hemolymph oxidative and antioxidative response in larvae of *Galleria mellonella* L., *Comp. Biochem. Physiol.*, 2010, **156**, 176–183.

[16] Demirsoy A., *Yaşamın Temel Kuralları, Omurgasızlar/ Böcekler, Entomoloji*, 2, Meteksan A.Ş., Ankara, 1992.

[17] Dobrev P. I., Havlicek L., Vagner M., Malbeck J. and Kaminek M., Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*., 2005, **2**, 159-166.

[18] Baktır İ., Erdemir S., Göktaş Ö., Süs bitkilerinde hormon kullanımı, Lisans Semineri, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Antalya, 1994.

[19] Akgül H., Büyüme ve Gelişim Düzenleyiciler, Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 2008, **77**, 1.

[20] Öpik H. and Rolfe S. A., *The Physiology of Flowering Plants*, Cambridge University Press, Cambridge, 2005.

[21] Ünyayar S., Poliüretan köpük üzerine tutuklanmış Phanerochaete chrysosporium ME446'da gibberellik asit ve sitokinin üretimi, *Türk. J. Biol., 2000*, **24**, 513-519.

[22] Bidwell R. G. S., *Plant Physiology*, Macmillan, U.S.A., 1974.

[23] Güleryüz M., *Bahçe ziraatında büyütücü ve engelleyici maddelerin kullanılması ve önemi*, Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, 1982.

[24] Sun T. and Gubler F., Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants, *Annu. Rev. Plant Biol*., 2004, **55**, 197-223.

[25] Campbell N. A., Reece J. B., *Biyoloji*, 6, Palme Yayıncılık, Ankara, 2008.

[26] Grodner M. Mcpherson, Louisiana Food Safety and Information Clearinghouse's Food Safety Resource Guide, *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi,* 2006, **77**, 26.

[27] Karakuş C. ve Köker R., Tarımda bitki gelişim düzenleyicilerin (BGD) kullanımı ve hormon riski, *BAU Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2010, **12**, 42-49.

[28] Honeyborne C. H. B., Performance of Brevicoryne brassicae on plants treated with growth regulators, *Journal of the Science Food and Agriculture*, 1969, **20** (7), 388-390.

[29] Önder F., Karsavuran Y., Hakerlerler H. ve S. Tezcan, Bitki büyüme regülatörlerinden MLC'nin laboratuvar koşullarında *Dolycoris baccarum* (L) (Het.: Pentatomidae) üzerinde etkileri, *Türkiye 1. Entomoloji Kongresi Bildirileri*, İzmir, 1987.

[30] Awad T. M. and Taha F. A., The effect of some plant growth inhibitors on the developmental stages of *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep.: Noctuidae), *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 1976, **80** (3), 306-310.

[31] Carlisle D. B., Ellis P. E. and Osborne D. J., Effects of plant growth regulators on locusts and cotton stainer bugs, *Journal of the Science Food and Agriculture*, 1969, **20**, 391-393.

[32] Tahori A. S., Zeidler G. and Halevy A. H., Effect of some plant growth retardants on the feeding oh the cotton leaf worm, *Journal of the Science Food and Agriculture*, 1965, **16**, 570-572.

[33] Mansour M. H. and Dimetry N. Z., Effect of three plant growth regulators on the immature stages of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep.: Noctuidae), *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 1976, **80** (1), 88-93.

[34] Van Emden H. F., Plant resistance to aphids induced by chemicals, *Journal of the Science Food and Agriculture*, 1969, **20**, 385-387.

[35] Bhalla O. P. and Robinson A. G., Effect of chemosterilants and growth regulators on the pea aphid and artificial diet, *Journal of Economic Entomology*, 1968, **61**, 552-555.

[36] El-Ibrashy M. T., The sterilent activity of certain biologically active compounds against *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lepid., Noctuidae), *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 1972, **71**, 326-332.

[37] Scheurer S. and Aschermann S., The influence of natural and some synthetic plant growth regulators on the reproductive activity of *Aphis fabae* sucking plant parts, Ed.: Mahunka S., *In Folia Entomologica Hungarica,* Luther-Strasse, German Demokratic Republic, 1976.

[38] Prasad R., Behera H. N. and Das C. C., MLC induced meiotic instability in grasshopper spermatocytes, *Current Science*, 1977, **46**, 191-192.

[39] Dreyer D. L., Campbell B. C. and Jones K. C., Effect of bioregulator- treated sorghum on greenbug fecundity and feeding behavior: Implication for host-plant resistance, *Phytochemistry*, 1984, **23**, 1593-1596.

[40] Bariola L. A., Kittock D. L., Arle H. F., Vail P. V. and Hennebery T. J. Controlling pink bollworms: Effects of chemical termination of cotton fruiting on populations of diapausing larvae, *Journal of Economic Entomology*, 1976, **69**, 633-639.

[41] Smith B. D., Spectra of activity of plant growth retardants against various parasites of one host species, *Journal of the Science Food and Agriculture*, 1969, **20**, 398-400.

[42] Worthing C. R., Use of growth retardants on Chrysanthemums: effect on pest populations, *Journal of the Science Food and Agriculture*, 1969, **20**, 394-397.

[43] Richter S. und Caceda F., Untersuchungen zur Verbesserung der Wirksamkeit von phosphororganischen Insektiziden durch mittel zur Steuerung biologischer prozesse, *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 1984, **20**, 409-418.

[44] Posnova A. N., Plant growth regulators and their use in applied entomology, *Trudy Vsesoyuznogo Nauchno-issledovatel'skogo institua Zashchity Rastenii*, 1974, **40**, 135-145.

[45] Göze İ., Yelkovan İ., Çınar Z., Daminozid'in civcivlerdeki enzimatik etkiler ve histopatolojisi, *Tr J. of Biology*, 1995, **19**, 217-222.

[46] Kim İ. S., Okubo H. and Fujieda K., Endogenous levels of IAA in relation to partenocarpy in cucumber, *Scientia Horticulturae*, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1-8, 1992.

[47] Hiroyasu K. and Yamanishi T., Low temperature effects on levels of some plant hormones at the flowering stage in rice panicles, *Plant Physiol*., 1997, **67**, 45-49.

[48] Parker K. E. and Briggs W. R, Transport of indole-3-acetic acid during gravitropism in intact maize coleoptiles, *Plant Physiol*., 1990, **94**, 1763-1769.

[49] Salisbury F. B. and Ross C. W., *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, 1992.

[50] Fett W. F., Osman S. F. and Dunn M. F., Auxin Production by Plant-Pathogenic Pseudomonads and Xanthomonads, *Applied and Environmental Microbiology,* 1987, **53**, 1838-1845.

[51] Topçuoğlu S. F. ve Ünyayar S., Beyaz çürükçül fungus *Phanerochaete chrysosporium* ME446'da bitki büyüme maddelerinin (oksin, gibberellin, absisik asit ve sitokinin) üretimi ve biyolojik aktivitelerinin tayini, İnönü Üniversitesi Araştırma Fonu, http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-98-22-1/biy-22-1-5-96113.pdf /, (Ziyaret tarihi: 18 Ocak 2014).

[52] Ünyayar S., Topçuoğlu S. F. and Ünyayar A., A modified method for exraction and identification of indol-3-acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA_3), absisic acid (ABA) and zeatin produced by *Phanerochaete chrysosporium* ME446, *10. FESPP Congress,* Florence, Italy, 1996.

[53] Nation J. L., *Insect Physiology and Biochemistry*, CRC press, Boca Raton, London, Newyork, Washington, 2002.

[54] Ames I. H., Hill C. A., Walton D. C. and Dashek W. V., Hormonal Regulation of Genetic Tumor Induction: Cytokinin and Abscisic Acid, *Plant and Cell Physiol.*, 1979, **20**, 1055-1061.

[55] Staden J. V. and Nicholson R. I. D., Cytokinins and mango flower malformation II. the cytokinin complement produced by Fusarium moniliforme and the ability of the fungus to incorporate (8^{-14} C) adenine into cytokinins, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1989, **35**, 423-431.

[56] Prakash L. and Prathapasenan G., NaCl- and gibberellic acid- induced changes in the content of auxin and the activities of cellulase ond pectin lyase during leaf growth in rice, *Annals of Botany*, 1990, **65**, 251-257.

[57] Palavan-Ünsal N., *Bitki büyüme maddeleri*, İ.Ü. Basım Evi ve Film Merkezi, İstanbul, 1993.

[58] Ünyayar S., *Phanerochaete chrysosporium* ME446'da Kültür Periyoduna Bağlı Olarak İndol-3-Asetik Asit (IAA), Gibberellik Asit (GA_3), Absisik Asit (ABA) ve Zeatin Üretimi ve Biyolojik Aktivitelerinin Tayini, Doktora Tezi İnönü Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Malatya, 1995, 29452.

[59] Tucker D. J., The effects of far-red light on the hormonal control of side shoot growth in the tomato, *Ann. Bot*., 1976, **40**, 1033-1042.

[60] Blakesley D., Weston G. D. and Elliott M. C., Endogeneous levels of indole-3-acetic acid and abscisic acid during the rooting of Cotinus coggygria cuttings taken at different times of the year, *Plant Growth Regulation*, 1991, **10**, 1-12.

[61] Roberts A. J. and Hooley R., *Plant Growth Regulators*, 3, Blackie and Son Ltd., Glasgow, London, U.K, 1988.

[62] Kawaguchi M., Fujioka S., Sakurai A., Yamaki Y. T. and Syona K., Presence of a Pathway for the Biosynthesis of Auxin via Indol-3-Acetamide in Trifoliata Orange, *Plant Cell Physiol*., 1993, **34**, 121-128.

[63] Westwood M. N., *Temperate-zone Pomology: Physiology and Culture*, 3, Timber Press Inc., Portland, Oregan, USA , 1993.

[64] Normanly J., Bartel B., Redundancy as a way of life: IAA metabolism, *Curr. Opin. Plant Biol*., 1999, **2**, 207-213.

[65] Sinna G. A., The effect of the plant hormone indole-3-acetic acid and chemically related compounds on the growth of mouse fibroblast 3T3 cells, *Comp. Biochem Physiol*., 1983, **75**, 433-436.

[66] Mello M. R., Curi T. C. P., Miyasaka C. K., Palanch A. C., Curi C. P., Effect of indole acetic acid on oxygen metabolism in cultured rat neutrophil, *Gen Pharmac.*, 1998, **4**, 573-578.

[67] Greco A. V., Mingrone G., Favuzzi A., Bertuzzi A., Gandolfi A., Desmet R., Vanholder R., Gasbarrini G., Subclinical hepatic encephalopathy: role of tryptophan binding to albumin and the competition with indole-3-acetic acid, *J. Investig. Med*., 2000, **48**, 274-80.

[68] Anderson G. M., Gerner R. H., Cohen D. J., Fairbanks L., Central tryptamine turnover in depression, schizophrenia and anorexia: measurement of indole acetic acid in cerebrospinal fluid, *Biol. Psychiatry*., 1984, **19**, 1427.

[69] Antoshechkin A. G., Zuyeva L. A., Maximova L. A., Excretion of phenylpyruvic, 4-hydroxyphenylpyruvic and indolyl-3-acetic acids by the skin fibroblasts from a phenylketonuric child, *J. Inherit. Metab. Dis*., 1988, **11**, 299-301.

[70] Folkes L. K., Candeias L. P., Wardman P., Toward targeted "oxidation therapy" of cancer: peroxidase-catalysed cytotoxicity of indole-3-acetic acids, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1998, **42**, 917-20.

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

[72] Bertuzzi A., Mingrone G., Gandolfi A., Greco A. V., Ringoir S., Vanholder R., Binding of indole-3-acetic acid to human serum albumin and competition with 1-tryptophan, *Clin Chim Acta*, 1997, **265**, 183-192.

[73] Furukawa S., Masayoshi A., Usuda K. and Ogawa I., Indole-3-acetic acid induces microencephaly in rat fetuses, *Toxicologic Pathology*, 2004, **32**, 659-667.

[74] Pugine S. M. P., De Brito P. P., Alba-Loureiro C. T., Costa E. J. X., Curi R. and De Melo M. P., Effect of indole-3-acetic acid administration by gavage and by subcutaneous injection on rat leukocytes, *Cell Biochem. Funct*., 2007, **25**, 723–730.

[75] Rowley A. F. and Ratcliffe N. A., *Insects, In: Invertebrate Blood Cells*, 3, Academic Press, London, 1981.

[76] Romoser W. S., Stoffolano J. G., *The science of entomology*, ed. Kane K., WCB Publishers, 1994.

[77] Gupta A. P., Cellular Elements in the hemolymph, Ed: Kerkut G. A., Gilbert L. I., *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*, 12, Pergamon press, New York, 400-451, 1985.

[78] Wyatt G. R., Loughheed T. C., Wyatt S. S., The Chemistry of insect hemolymph, *J. Gen. Physiol*., 1955, **6**, 853-868.

[79] Jones J. C., *Hematopoiesis in insects, In: Regulation of hematopoieis*, Appleton Press, New York, 1970.

[80] Ratcliffe N. A., Rowley A. F., Fitzgerald S. W. and Rhodes C. P., Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances, *Int. Rev. Cytol*., 1985, **97**, 186–350.

[81] Tepass U., Liselotte I., Fessler L. I., Aziz A. and Hartenstein V., Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in Drosophila, *Development*, 1994, **120**, 1829-1837.

[82] Suzuki M. and Tanaka T., Virus-like particles in venom of Meteorus pulchricornis induce host hemocyte apoptosis, *J. Insect Physiol.,* 2006, **52**, 602– 613.

[83] Akai H. and Sato S., An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*, *J. Insect Physiol*., 1971, **17**, 1665-1676.

[84] Hinks C. F. and Arnold J. W., Haemopoiesis in Lepidoptera II.: The role of haemopoietic organs, *Can. J. Zool*., 1977, **55**, 1740-1755.

[85] Lavine M. D. and Strand M. R., Insect hemocytes and their role in immunity, *Insect Biochem. Molec*., 2002, **32**, 1295-1309.

[86] Ribeiro C. and Brehelin M., Insect haemocytes: What type of cell is that?, *J Insect Physiol*., 2006, **52**, 417-429.

[87] Schmidt O., Theopold U. and Strand M., Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids, *BioEssays*, 2001, **23**, 344-351.

[88] Vilmos P. and Kurucz E., Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system*, Immunol. Lett*., 1998, **62**, 59-66.

[89] Glatz R. V., Asgari S. and Schmidt O., Evolution of polydnaviruses as insect immune suppressors, *Trends in Microbiol*., 2004, **12**, 545-554.

[90] Silva J. E. B., Boleli I. I. C and Simões Z. L. P., Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae, *Braz. J. Biol*., 2002, **62**, 689-699.

[91] Turnbull M. W., Martin S. B. and Webb B. A., Quantitative analysis of hemocyte morphological abnormalities associated with Campoletis sonorensis parasitization, *J. Insect Sci*., 2004, **4**, 11-26.

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

[93] Brehelin M. and Zachary D., Insect haemocytes: a new classification to rule out controversy, Ed: Brehelin M., *Immunity in Invertebrates*, Springer Verlag, Berlin, 36-48, 1986.

[94] Giulianini P. G., Bertolo F., Battistella S. and Amirante G. A., Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in vivo phagocytosis, *Tissue Cell*., 2003, **35**, 243-251.

[95] Chapman R. F., *The Insects: Structure and Function*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998.

[96] Cociancich S., Dupont A., Hegy G., Lanot R., Holder F., Hetru C., Hoffmann, J. A. and Bulet P., Novel inducible antibacterial peptides from a Hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*, *Biochem. J*., 1994, **300**, 567-575.

[97] Ribeiro C., Simoes N. and Brehelin M., 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*., 1996, **42**, 815-822.

[98] Schmit A. R. and Ratcliffe N. A., The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae, *J. Insect Physiol*., 1977, **23**, 175–184.

[99] Pech L. L. and Strand M. R., Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes, *J. Cell Science*, 1996, **109**, 2053- 2060.

[100] Tojo S., Naganuma F., Arakawa K. and Yokoo S., Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, *J. Insect Physiol*., 2000, **46**, 1129-1135.

[101] Ling E. and Yu X. Q., Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells, *Dev. Comp. Immonol*., 2006, **30**, 301-309.

[102] Costa S. C. P., Ribeiro C., Girard P. A., Zumbihl R. and Brehelin M., Modes of phagocytosis of Gram- positive and Gram- negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes, *J. Insect Physiol*., 2005, **51**, 39-46.

[103] Yılmaz H. R., Yüksel E., Türköz Y., F2 nesil farelerde indol-3-asetik asitin böbrek katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine olan etkisi, *Van Tıp Dergisi*, 2004, **11**, 64-68.

[104] Levin D. M., An integrin required fort he encapsulation immune response in the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae), Kansas

State University, http://krex.k-state.edu/dspace/bitstream/handle/2097/412/DavidLevin2007.pdf?sequence=1/, (Ziyaret tarihi: 2 Şubat 2014)

[105] Strand M. R. and Noda T., Alterations in the hemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by Microplitis demolitor, *J. Insect Physiol*., 1991, **37**, 839–850.

[106] Jones J. C., Changes in the hemocyte picture of *Galleria mellonella* (Linnaeus), *Biol. Bull*, 1967, **132**, 211-221.

[107] Kanost M. R., Jiang H. and Yu X. Y., Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*, *Immunol. Rev*., 2004, **198**, 97–105.

[108] Da Silveira E. B., Ribeiro B. M. and Báo S. N., Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), *J. Submicrosc. Cytol. Pathol*., 2003, **35**, 129-139.

[109] Ashida M., Ochiai M. and Niki T., Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of silkworm *Bombyx mori*, *Tissue&Cell*., 1988, **20**, 599-610.

[110] Pech L. L. and Strand M. R., Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells, *J. Insect Physiol*., 2000, **46**, 1565-1473.

[111] Le N. T., Asgari S., Amaya K., Tan F. F. and Beckage N. E. , Persistence and expression of Cotesia congregata polydnavirus in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *J. Insect Physiol*., 2003, **49**, 533-543.

[112] Sung H. H., Kao W. Y. and Su Y. J., Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, *Aquatic Toxicology*, 2003, **64**, 25-37.

[113] Sung H. H., Lin S. C., Chen W. L., Ting Y. Y. and Chao W. L., Influence of Timsen TM on Vibrio populalcons of culture pond water and hepatopancreas and on the hemocytic activity of tiger shrimp, *Aquaculture*, 2003, **219**, 123-133.

[114] Teramoto T. and Tanaka T., Mechanism of reduction in the number of the circulating hemocytes in the *Pseudaletia separata* host parasitized by *Cotesia kariyai*, *J. Insect Physiol*., 2004, **50**, 1103–1111.

[115] Aldırmaz N., Kurşun asetatın bir decapoda türü olan *Palaemonetes turcorum*'un hepatopankreatik seka hücreleri üzerindeki ince yapı değişiklikleri, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2004, 150587.

[116] Halliwell B. and Gutteridge J. M. C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, A.B.D, 2007.

[117] Kumar V., Cotran R. S. and Robbins S. L., *Roobins Basic Pathology,* 9*,* Elsevier Saunders, Philladelphia, A.B.D., 592- 633, 2003.

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

[119] Trump B. F. and Berezesky I. K., Calcium-mediated cell injury and cell death, *FASEB Journal*, 1995, **9**, 219-228.

[120] Nicotera P., Hartzell P., Davis G. and Orrenius S., The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca^{2+} is mediated by activation of a non-lysosomal proteolytic system, *FEBS Letters*, 1986, **209**, 139.

[121] Phelps P. C., Smith M. W. and Trump B. F., Cytosolic ionized calcium and bleb formation following acute cell injury of cultured rabbit renal tubular cells, *Laboratory Investigations*, 1989, **60**, 630-642.

[122] Troyer D. A., Kreisberg J. I. and Venkatachalam M. A., Lipid alterations in LLC-PK1 cells exposed to mercuric chloride, Kidney International, 1986, **29**, 530-538.

[123] Perez J. F., Chemello M. E., Liprandi F., Ruiz M. C. and Michelangeli F., Oncosis in MA104 cells is induced by rotovirus infection through an increases in intracellular Ca^{+2} concentration, *Virology*, 1998, **252**, 17-27.

[124] Bronskill J. F., A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae), *J. Lep. Soc*., 1961, **15**, 102-104.

[125] Sak O., Uçkan F. and Ergin E., Effects of cypermethrin on total body weight, glycogen, protein and lipid contents of *Pimpla turionella* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Belg. J. Zool*., 2006, **136**, 53-58,.

[126] Nealis V. and Frankenhyzen K. V., Interactions between *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Apanteles fumiferanae* Vier. (Hymenoptera; Braconidae), a parasitoid of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera; Tortricidae), *Can*. *Entomol.*, 1990, **122**, 588-594.

[127] Er A., Uçkan F., River D. B. and Sak O., Cytotoxic effects of parasitism and application of venom from the endoparasitoid Pimpla turionellae on hemocytes of the host *Galleria mellonella*, *J. Appl. Entomol*., 2011, **135**, 225-236 .

[128] Beaulaton J., Hemocytes and hemocytopoiesis in silkworms, *Biochimie*., 1979, **61**, 157- 164.

[129] Lackie A. M., Humoral mechanisms in the immune response of insects to larvae of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda), *Parasite Immunol*., 1981, **3**, 201-208,.

[130] Lackie A. M., Haemocyte behaviour, *Adv. Insect Physiol*., 1988, **21**, 85–178.

[131] Narayanan K., Insect defense: Its impact on microbial control of insect pests, *Current Science*, 2004, **86**, 800-813.

[132] Mowlds P., Barron A. and Kavanagh K., Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by Candida albicans, *Microbes and Infection*, 2008, **10**, 628-634.

[133] Phukan M., Hazarika L. K., Barooah M., Puzari K. C. and Kalita S., Interaction of *Dicladispa armigera* (Coleoptera: Chrysomelidae) haemocytes with Beauveria bassiana, *Int. J. Trop. Insect Sci.*, 2008, **28**, 88- 97.

[134] Abd El-Aziz N. and Awad H. H. Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lapidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections, *Micron*, 2010, **41**, 203-209.

[135] Kim G. S. and Kim Y., Up-regulation of circulating hemocyte populationin response to bacterial challenge is mediated by octopamine and 5-hydroxytryptamine via Rac1 signal in Spodoptera exigua, *J. Insect Physiol*, 2010, **56**, 559-566.

[136] İzzetoğlu S. and Karaçalı S., The effects of 20-hydroxyecdysone on hemocytes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) in vitro conditions, *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 2003, **16**, 33-238.

[137] Yılmaz H. R., Yüksel E., İndol-3-asetik asitin üçüncü nesil farelerin kemik iliği hücrelerinde mitotik indeks üzerine etkisi, *S.D.Ü Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005, **12**, 47-48.

[138] Yılmaz H. R., Farelerde sentetik bitki büyüme hormonlarının biyolojik, teratojenik ve kalıtsal etkilerinin araştırılması, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Malatya, 1999, 84277.

[139] Altuntaş H., Effects of gibberellic acid (GA_3) on hemolymph chemistry and hemocytes of the host *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera:Pyralidae) and parasitoid *Pimpla turionella* L.(Hymenoptera: Ichneumonidae), PhD Thesis, Anadolu University, Science Ins., Eskişehir, 2011, 287102.

[140] Shapiro M., Changes in the hemocyte population of the wax moth, *Galleria mellonella*, during wound healing, *J. Insect Physiol*., 1968, **14**, 1725–1733.

[141] Arnold J. W. and Hinks C. F., Haemopoiesis in Lepidoptera. I. A note on the multiplication of spherule cells and granular haemocytes, *Can. J. Zool*., 1976, **61**, 275–277

[142] Sewify G. H. and 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.,* 2001, **125**, 533-536.

[143] Shapir M., Changes in the hemocyte population of the wax moth, *Galleria mellonella*, during wound healing, *J. Insect Physiol*., 1968, **14**, 1725–1733.

[144] Arnold J. W. and Hinks C. F., Haemopoiesis in Lepidoptera. I. A note on the multiplication of spherule cells and granular haemocytes, *Can. J. Zool*., 1976, **61**, 275–277.

[145] Jones J. C. and Liu D. P., A quantitative study of mitotic divisions of haemocytes of *Galleria mellonella* larvae, *J. Insect Physiol*., 1968, **14**, 1055-1061.

[146] Ashhurst D. E. and Richards G., Some histochemical observations on the blood cells of the wax moth, *Galleria mellonella* L., *J. Morph*., 1964, **114**, 247-254.

[147] Neuwirth M., The structure of the hemocytes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *J. Morph*., 1973, **139**, 105-124.

[148] Strand M. R., The insect cellular immune response, *Insect Sci*., 2008, **15**, 1-14.

[149] Yamashita M. and Iwabuchi K., *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures, *J. Insect Physiol*., 2001, **47**, 325-331.

[150] Gardiner E. M. M. and Strand M. R., Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 2000, **43**, 147-164.

[151] Er A., Effects of parasitism and venom from the endoparasitoid *Pimpla turionella* L.(Hymenoptera: Ichneumonidae) on hemocytes of the host, PhD Thesis, Balıkesir University, Science Institue, Balıkesir, 2011, 282932.

[152] Arnold J. W. and Hinks C. F., Haemopoiesis in Lepidoptera. III. A note on the multiplication of spherule cells and granular haemocytes, *Can. J. Zool*., 1983, **61**, 275–277.

[153] Nittono Y., Studies on the blood cells in the silkworm, *Bombyx mori* L., Bulletin of the Sericulture Experiment Station Tokyo, 1960, **16**, 171–266.

[154] Ayvalı C., *Metamorfoz sırasında Agrotis ipsilon (Hufn.) (Lepidoptera: Noctuidae) hemositleri üzerine araştırmalar*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 1989.

[155] Beetz S., Holthusen T. K., Koolman J. and Trenczek T., Correlation of hemocyte counts with different developmental parameters during the last larval instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 2008, **67**, 63–75.

[156] Terahara K., Takahashi K. G. and Mori K., Apoptosis by RGD-containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Dev. Comp. Immunol.,* 2003, **27**, 521-528.

[157] Asgari S., Hellers M. and Schmidt O., Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene, *J. Gen. Virol*., 1996, **77**, 2653-2662.

[158] Baba A., Lee E., Ohta A., Tatsuna T. and Iwata H., Activation of adenylate cyclase of rat brain by lipid peroxidation, *J. Biol Chem*., 1981, **256**, 3679-3684.

[159] Saleem M. and Shakoori A. R., Effects of cypermethrin on the free aminoacids pool in an organophosphorus-insecticide-resistant and susceptible strain of *Tribolium castaneum*, *Comp. Biochem. Physiol.,* 1993, **105**, 549-553.

[160] Uçkan F. and Sak O., Cytotoxic Effect of Cypermethrin on *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) Larval Hemocytes, *Ekoloji*, 2010, **19**, 20-26.

[161] Visscher N. S., Regulation of grasshopper fecundity, longevity and egg viability by plant growth hormones, *Experientia,* 1980, **36**, 130-131.

[162] Kaur R. and Rup P. J., Evaluation of Regulatory Influence of Four Plant Growth Regulators on the Reproductive Potential and Longevity of Melon Fruit Fly *(Bactrocera cucurbitae*), *Phytoparasitica,* 2000, **30**, 224-230.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimni İstanbul'da tamamladıktan sonra 2006 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2010 yılında İstanbul Üniversitesi'nde Pedogojik Formasyon eğitimini de alarak mezun oldu. 2011 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı ve halen devam etmektedir.