KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNDOL-3-ASETİK ASİTİN KONAK *Galleria mellonella* L. VE ENDOPARAZİTOİDİ *Pimpla turionellae* L.'NIN ANTİOKSİDAN ENZİMLERİNE ETKİLERİ

DİLARA ÖZYILMAZ

KOCAELİ 2018

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNDOL-3-ASETİK ASİTİN KONAK *Galleria mellonella* L. VE ENDOPARAZİTOİDİ *Pimpla turionellae* L.'NIN ANTİOKSİDAN ENZİMLERİNE ETKİLERİ

DİLARA ÖZYILMAZ

Dr.Öğr.Üyesi Fevzi UÇKAN
Danışman, Kocaeli Üniv. .....

Doç.Dr. Hülya ALTUNTAŞ
Jüri Üyesi, Anadolu Üniv. .....

Dr.Öğr.Üyesi Yonca Yüzügüllü KARAKUŞ
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv. .....

Tezin Savunulduğu Tarih: 05.06.2018

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisansüstü çalışmalarım süresince değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgisini, sabrını ve hoşgörüsünü esirgemeyen ve yanımda olan, değerli Danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın her aşamasında değerli öneri ve bilgilerinden yararlandığım hocam Doç. Dr. Hülya ALTUNTAŞ, çalışma arkadaşım Arş. Gör. Rabia ÖZBEK, laboratuvar arkadaşlarım ve deneylerime içtenlikle yardımcı olan arkadaşım Ebru ÇAKIR'a ve tez yazım sürecinde yanımda olan ve desteğini esirgemeyen arkadaşım İsmail MERCAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Benim için her konuda fedakarlıkta bulunan, destekleyen, eğitimimi sürdürebilmem için bana her türlü imkanı tanıyan aileme minnettar olduğumu belirtmek isterim. Tüm sıkıntılarıma ortak olan, manevi desteğini her zaman hissettiren, sevgili dostum Başak BALKIR'a teşekkürlerimi iletirim.

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından (BAP) 2014/068 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Haziran - 2018 Dilara ÖZYILMAZ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iii
TABLOLAR DİZİNİ iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ v
ÖZET vii
ABSTRACT viii
GİRİŞ 1
1.GENEL BİLGİLER 4
1.1. Antioksidan Enzimler 8
1.1.1. SOD (EC 1.15.1.1) 8
1.1.2. GST (EC 2.5.1.18) 8
1.1.3. KAT (EC 1.11.1.6) 9
1.2. Lipid Peroksidasyonu 9
1.3. Konak *Galleria mellonella* 10
1.4. Endoparazitoid *Pimpla turionellae* 11
2. MATERYAL VE METHOD 13
2.1. Konak ve Parazitoid Kültürleri 13
2.2. Deney Gruplarının Hazırlanması 14
2.2.1. İndol-3-asetik asit uygulanması 14
2.2.2. Hemolenf toplama ve saklama 14
2.2.3. Protein analizi 15
2.2.4. SOD aktivitesinin ölçümü 16
2.2.5. GST aktivitesinin ölçümü 18
2.2.6. KAT aktivitesinin ölçümü 20
2.2.7. TBARS (MDA ölçümü) analizi 21
2.3. İstatistik 24
3. BULGULAR 25
3.1. SOD Aktivitesi 25
3.2. GST Aktivitesi 27
3.3. KAT Aktivitesi 29
3.4. TBARS (MDA) 31
4. TARTIŞMA 34
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 41
KAYNAKLAR 44
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 51
ÖZGEÇMİŞ 52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. IAA_3 Formülü: $C_{10}H_9No_2$ 4
Şekil 2.1. SOD standart eğri 17
Şekil 2.2. MDA standart eğri 22
Şekil 3.1. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün SOD aktivitesine etkisi (U/mg) 26
Şekil 3.2. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün SOD aktivitesine etkisi (U/mg) 27
Şekil 3.3. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün GST aktivitesine etkisi (µmol/mg/dak) 28
Şekil 3.4. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün GST aktivitesine etkisi (µmol/mg/dak) 29
Şekil 3.5. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün KAT aktivitesine etkisi (mmol/mg protein/dak) 30
Şekil 3.6. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün KAT aktivitesine etkisi (mmol/mg protein/dak) 31
Şekil 3.7. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün MDA miktarına etkisi (µM/mg protein) 32
Şekil 3.8. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün MDA miktarına etkisi (µM/mg protein) 33

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. SOD standartları 17
Tablo 2.2. MDA kolorimetrik standartları 22
Tablo 3.1. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün SOD aktivitesine etkisi (u/mg) 25
Tablo 3.2. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün SOD aktivitesine etkisi (u/mg) 26
Tablo 3.3. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün GST aktivitesine etkisi (µmol/mg/dak) 27
Tablo 3.4. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün GST aktivitesine etkisi (µmol/mg/dak) 28
Tablo 3.5. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün KAT aktivitesine etkisi (mmol/mg protein/dak) 29
Tablo 3.6. *G. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün KAT aktivitesine etkisi (mmol/mg protein/dak) 30
Tablo 3.7. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün MDA miktarına etkisi 31
Tablo 3.8. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün MDA miktarına etkisi 32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C : Derece Celcius
cm : Santimetre
dak : Dakika
g : Gram
kg : Kilogram
L : Litre
mg : Miligram
µg : Mikrogram
ml : Mililitre
µl : Mikrolitre
M : Molar
mm : Milimetre
nm : Nanometre
mM : Milimolar
mmol : Milimol
ppm : Parts Per Million (Milyonda Bir Birim)
U : Ünite

Kısaltmalar

AChE : Asetilkolinesteraz
AZA : Azadiraktin
BGD : Bitki Gelişim Düzenleyicisi
BSA : Sığır Serum Albümini
CDNB : 1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen
Cu : Bakır
DNA : Deoksiribonükleik Asit
dH_2O : Distile Su
EDTA : Diaminetetraasetik Asit
GA_3 : Giberellik Asit
GPx : Glutatyon Peroksidaz
GSH : Glutatyon
GST : Glutatyon-S-Transferaz
H_2O : Su
H_2O_2 : Hidrojen Peroksit
IAA_3 : İndol-3-Asetik Asit
KAT : Katalaz
KCl : Potasyum Klorür
LC_{50} : Lethal Konsantrasyon
LD_{50} : Deney Hayvanlarının % 50'sini Öldürmek İçin Gerekli Lethal Doz
LO^- : Alkoksil
LOO^- : Peroksil
LOOH : Lipid Hidroperoksit
MDA : Malondialdehit
Mn : Mangan
NaCl : Sodyum Klorür

NaOH : Sodyum Hidroksit
NO : Nitrik Oksit
O_2 : Moleküler Oksijen
$^1O_2$: Singlet Oksijen
O_2^- : Süperoksit
OH^- : Hidroksil
PMSF : Fenil Metil Sülfonilflorid
RNA : Ribonükleik Asit
SOD : Süperoksit Dismutaz
TBA : Tiyobarbitürik Asit
TCA : Tiyokloro Asetik Asit
XA : Ksantotoksin
XOD : Ksantin Oksidaz
Zn : Çinko

İNDOL-3-ASETİK ASİTİN KONAK *Galleria mellonella* L. VE ENDOPARAZİTOİDİ *Pimpla turionellae* L.'NIN ANTİOKSİDAN ENZİMLERİNE ETKİLERİ

ÖZET

İndol-3-Asetik Asitin (IAA_3), böcek türlerinin gelişimine, yaşam uzunluğuna etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, IAA_3'ün farklı dozlarının (0-10,000 ppm) konak *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera; Pyralidae) ve endoparazitoiti *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera; Ichneumonidae) larvalarında antioksidan enzim aktivitelerine ve lipit peroksidasyonuna etkileri incelendi. Süperoksitdismutaz (SOD) aktivitesi, ksantin oksidaz (XOD) kullanılarak belirlendi. Glutatyon-S-Transferaz (GST) aktivitesi, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen ve substrat olarak indirgenmiş glutatyon miktarıyla, katalaz (KAT) aktivitesi ise hidrojen peroksit (H_2O_2) bozunmasına bağlı absorbansta meydana gelen azalma miktarı ölçülerek belirlendi. Lipid peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) ve tiyobarbitürikasit (TBA) reaksiyonuna göre ölçüldü.
Konakta en yüksek SOD aktivitesi kontrol grubu ve düşük doz 50 ppm'de görüldü. *P. turionella'*da SOD aktivitesi konakta olduğu gibi doz artışına bağlı olarak azalma gösterdi. *G. mellonella'* da KAT ve GST aktivitelerinin düşük dozlarda arttığı, yüksek dozlarda tekrar azaldığı belirlendi. Parazitoitte konaktan farklı olarak GST aktivitesinde yüksek dozlarda artış görüldü. IAA_3 uygulaması *G. mellonella* ve *P. turionella'* da lipid peroksidasyonunda değişikliklere neden oldu. Lipit peroksidasyon analizinde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında doz yükseldikçe her iki canlıda da MDA miktarının arttığı gözlemlendi. Sonuç olarak konak *G. mellonella'*nın, besin yoluyla IAA_3'e maruz kalması, hem konak hem de parazitoid antioksidan savunma sisteminde değişikliğe yol açması bağışıklık sistemini etkilediğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan Enzim, *Galleria mellonella*, İndol-3-Asetik Asit, Lipid Peroksidasyonu, *Pimpla turionellae*.

EFFECTS OF INDOLE-3-ACETIC ACID ON THE ANTIOXIDANT ENZYMES OF THE HOST *Galleria mellonella* L. AND ITS ENDOPARASITOID *Pimpla turionellae* L.

ABSTRACT

It is known that, Indol-3-Asetic Acid (IAA_3) has effects on the development and longevity of insect species. We investigated the effects of various doses (0 -10,000 ppm) of IAA_3, on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) and their endoparasitoid *Pimpla turionellae* (Hymenoptera; Ichneumonidae). Superoxidedismutase (SOD) activity determined with using xanthine oxidase (XOD). The Glutathione-S- Transferase (GST) activity was determined with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and reduced glutathione as substrates. The catalase (CAT) activity was determined by measuring the decrease in absorbance due to hydrogen peroxide (H_2O_2) decomposition. Lipid peroxidation determined by measuring of malondialdehyde (MDA) and thiobarbituric acid (TBA) reaction.

Highest activity of SOD in host were at lower dose 50 ppm and untreated group. Either in *P. turionella* SOD activity decreased at high doses. CAT and GST activity in *G. mellonella* were increased at low doses and decreased at high doses of IAA_3. Unlike the results of host GST activity in parasitoid increased at high doses. Treatment with IAA_3 resulted changes lipid peroxidation of *G. mellonella* and *P. turionella.* Lipid peroxidation increased in both species dose dependent comparison to control group. As a result, exposure of the host *G. mellonella* to IAA_3 through food, both in the host and in the parasitoidal antioxidant defense system, has been shown to affect the immune system.

Keywords: Antioxidant Enzyme, *Galleria mellonella*, Indole-3-Acetic Acid, Lipid Peroxidation, *Pimpla turionellae*.

GİRİŞ

Gittikçe artan dünya nüfusu, beslenme problemlerine neden olmaktadır. Bu sorun, besin kaynaklarının ve bu kaynaklardan elde edilen besin maddelerinin en iyi şekilde kullanılması ve korunması zorunluluğunu ortaya koymaktadır (Andow ve diğ., 1997). Tarımsal üretimde, ürün kalitesinin arttırılması, sınırlı bir alandan yeterli oranda ürün alınması ve elde edilen ürünün zararlılara karşı daha dirençli olması amacıyla gübre ve pestisitler gibi çeşitli kimyasal bileşiklerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Altuntaş, 2011). Ancak, bu kimyasalların kullanımı önceden beklenilenin aksine çeşitli problemlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Andow ve diğ., 1997). Büyüme düzenleyicilerinin bilinçsiz bir şekilde kullanılmaları sonucu hava, toprak ve yeraltı sularında birikim meydana gelerek besin zinciri yoluyla biyolojik sistemlere geçebilmekte ve canlılarda toksik etkiler görülebilmektedir. Ayrıca bu kimyasalların, canlıların değişik dokularında (yağ, kas, karaciğer, dalak gibi) birikerek kanserojen, teratojen ve mutajen etki gösterdikleri bilinmektedir (Andow ve diğ. 1997; Algül ve diğ., 2016). Sentetik büyüme düzenleyicilerinin canlılara olumsuz etkilerinin olması ve kullanımının pahalı olması, çevreye zarar vermeyecek doğal alternatif yöntemleri akla getirmektedir (Algül ve diğ., 2016). Tarımsal zararlılarla yapılan savaşta, gereksiz ilaç kullanımı çevre kirlenmesi, doğal dengenin bozulması ve zararlılarda kısa sürede direnç gelişmesi gibi problemlere neden olmaktadır (Stumpf ve Nauen 2001; Yorulmaz ve Ay, 2010). Kimyasal mücadelede ortaya çıkan bu sorunlar tarım, orman, hayvancılık ürünlerine, bitki örtüsüne ve ekolojik dengeye zarar veren böceklerle biyolojik mücadelenin önemini arttırmıştır. Biyolojik kontrolde kullanılan ajanlar arasında, en az risk oluşturan ve spesifik etki yapanlar parazitoidlerdir (Andow ve diğ., 1997; Uçkan, 2002). Parazitoid türlerin ekolojik denge ve biyolojik kontrol uygulamalarının yeniden yapılandırılması için en uygun aday olarak görülmelerinin sebebi konaklarına uyum sağlamaları, belirli konağa etki etmeleri ve çevresel riskleri azaltmaya eğilimli olmalarıdır (Hokkanen ve Lynch, 1995; Andow ve diğ., 1997). Parazitoit türler gelişimleri için uygun ortam sağlamak amacıyla genellikle konakları olan böceklerin zararına olacak şekilde, konak bağışıklık, endokrin, gelişim ve metabolik faaliyetlerinin düzenlenmesini içeren çeşitli mekanizmalara sahiptirler (Beckage ve Gelman, 2004). Biyolojik kontrol programlarının başarı oranı parazitoit ve konak arasındaki davranışsal ve

fizyolojik ilişkinin iyi bilinmesiyle alakalıdır (Andow ve diğ., 1997).

G. *mellonella'*nın arı kovanlarında peteklerde ve depolanmış balmumunda oldukça büyük tahribat yaptığı bilinmektedir (Özer, 1962). Arı bulunan her yerde yaşamaktadır ve dişiler yumurta bırakmak için akşam karanlığında arı kovanlarına girmektedir. Kovan içinde yumurtadan çıkan larvalar bal peteklerine büyük zarar vermektedir. Çünkü larvaları petek, mum ve bal ile beslenmektedir (Altuntaş, 2011).

P. turionellae L. değişik konak türlerine ait pupları parazitleyen yüksek derecede polifaj bir türdür. Parazitoidlerin biyolojik kontroldeki etkinliğinin arttırılabilmesi için doğal yaşam alanlarındaki kimyasal uygulamaların biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerine etkilerinin belirlenmesi önemlidir (Kansu ve Uğur, 1984). Parazitoidlere ait konakların larval dönemde besin yoluyla aldığı insektisitler, pupal dönemde vücutlarında birikime neden olmaktadır. Bu yüzden *P. turionella*'nın da insektisite maruz kalması mümkündür (Sak ve diğ., 2006).

Doğal çevredeki kimyasallar ve onların neden olabileceği ekotoksik riskler hakkındaki endişeler daha çok pestisitler üzerinde yoğunlaşmıştır (Tucker, 1976, Blakesley ve diğ., 1991). Pestisitler oksidatif stresi indükleyerek serbest radikallerin oluşumunu ve dolayısıyla antioksidan ya da serbest oksijen radikal temizleyici enzim sistemlerinin zarar görmesine neden olabilmektedir (Agrawal ve diğ., 1991; El-Sharkawy ve diğ., 1994; Almeida ve diğ., 1997).

Olası bir toksisite nedeni olan pestisit indüklü oksidatif stres son zamanlarda toksikolojik araştırmaların ilgi odağı olmuştur. Henüz pestisitlerin oksidatif strese neden olma mekanizmaları tamamen anlaşılmamıştır (Banerjee ve diğ., 2001). Banerjee (1999), insanlara ait kan örneklerinde pestisit olan lindane malatyon ve propoksur zehirlenmesi üzerinde çalışmış ve artan lipid peroksidasyonu, serbest oksijen radikal temizleyen enzimlerin oksidatif strese bağlı bozunmalarını incelemiştir. Ortaya çıkan sonuçlara göre KAT, SOD, GST aktiviteleri kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, bu enzimlerin aktivitelerinde belirgin bir artış olduğu görülmüştür. Çalışmanın sonuçları insan eritrositlerinde yer alan glutatyon bağlı enzimler içeren hücresel antioksidan savunma sisteminin lindan, malatyon ve propoksur gibi pestisitlerinden etkilendiğini göstermektedir (Banerjee, 1999). BGD'lerin toksikolojik özellikleriyle ilgili çalışmalar daha çok memeliler üzerinde yapılmıştır (Tuluce ve Çelik, 2006; Banerjee, 1999). Ancak farklı BGD'lerin böceklere etkileri ile ilgili araştırmalar da mevcuttur (Kaur ve Rup, 2002; Kaur ve

Rup, 2003a; Altuntaş, 2015). Tarımsal verimi artırmak amacıyla kullanılan BGD'lerin, biyolojik kontrol ajanlarının olumsuz yönde etkilemesinin, doğal düşmanın zararlı böcekler üzerindeki baskınlığının azalmasına ve zararlı populasyonun giderek artmasına neden olabileceği düşünülmelidir.

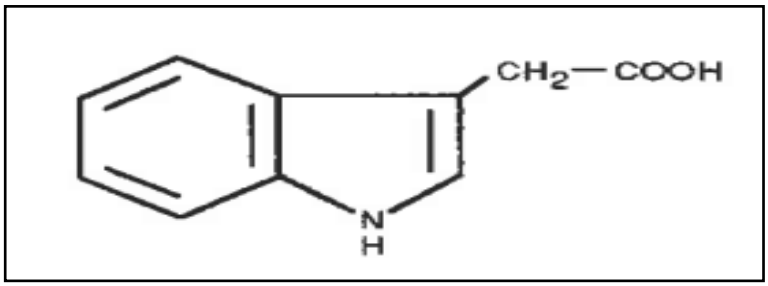
1.GENEL BİLGİLER

Doğal bitki gelişim düzenleyicileri; teşvik ediciler; oksinler, sitokininler ve gibberellinler, engelleyiciler; dorminler ve etilen olarak beş grup altında toplanabilirler (Kumlay ve Eryiğit, 2011).

Oksinler 4 grup altında incelenmektedir ve önemli olan büyüme düzenleyicileri şu şekildedir:

a) Indol grubu
b) Naftelen grubu
c) Fenoksi grubu
d) Benzol grubu

Büyümeyi uyarıcılar arasında ilk bilinen bitki büyüme düzenleyiciler oksinlerdir. Oksinlerin bitkilerde görevleri; hücre büyüme ve bölünmesini hızlandırmak, adventif kök oluşumunu sağlamak, meyve ve yaprakdökümünü engellemektir (Çetin, 2002). Oksin grubunun en önemli bireyi kabul edilen IAA_3 bitki büyüme maddesi olarak bitkilerde embriyogenezden yaşlılığa kadar gelişimin her evresinde etkilidir (Tucker, 1976; Blakesley ve diğ., 1991). Çalışmamızda oksidatif stres oluşturması beklenen IAA_3 kullanıldı.



Şekil 1.1. IAA_3 formülü: $C_{10}H_9NO_2$ (Patten ve Glick, 1996).

Kaur and Rup (2002), kavun sineği *Bactrocera cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae) larvaları üzerinde GA_3, IAA_3, kinetin ve kumarin etkisini araştırmış ve üreme potansiyellerine etki edebildiklerini bulmuşlardır. Larval *Spodoptera litura* F.

(Lepidoptera: Noctuidae) türünün büyüme, gelişme ve hayatta kalmasına GA_3'ün toksik etki ettiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Altuntaş, 2012).

Awad ve Taha (1976), *Spodoptera littoralis* (Lepid., Noctuidae) üzerinde 3 farklı bitki gelişim düzenleyici kullanmış ve kontrolle karşılaştırıldığında canlı kalabilen yetişkin hayvan sayısının azaldığını gözlemlemiştir. Bütün gelişim evrelerinde şekil bozukluğu gözlemlenmiştir (Awad ve Tahaf, 1976). Giberellinlerin (GA) toksik etki yapmamasına karşın hayvanlar üzerinde bazı olumsuz etkileri olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda fareler ve kurbağaların karaciğerinde deformasyonlara yol açtığı ve eşey farklılaşmasını etkilediği belirlenmiştir (Farrow ve diğ., 1976; Özmen ve diğ., 1995). Bir BGD olan GA_3 böceklerin büyüme ve gelişimine negatif etki ettiği bilinmektedir (Altuntaş, 2015). İndol asetik asit (IAA), naftelen asetik asit (NAA), 2-4 diklorofenoksi asit (2,4-D) ve giberellinin deniz canlıları üzerindeki toksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, IAA_3 'ün bu dört büyüme düzenleyicisi içinde toksisitesinin en yüksek olduğu belirlenmiştir (Morshed ve diğ., 2005). Aşırı dozda IAA_3 kontaminasyonun canlılar üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda; farelerin içme suyuna karıştırılan IAA_3 ve indolbütirik asitin (IBA) bağışıklık sistemi, böbrek ve karaciğer enzimlerine zarar verdiği gözlemlenmiştir (Çelik ve diğ., 2006; Çelik ve diğ., 2002). Çelik ve diğ., 2002' nin absisik asit ve GA_3 ile yaptığı çalışmalarda sıçanların bazı dokularında lipit peroksidasyonuna neden oldukları ve savunma sistemindeki enzimlerin aktivitelerini değiştirdiği gözlemlenmiştir. Yine, Çelik ve arkadaşlarının (2003) sıçanlar üzerinde IAA_3, IBA ve kinetin ile yaptığı çalışmalarla IAA_3 ve IBA' nın alyuvar, akyuvar, trombosit miktarlarında artışa neden olduğu görülmüştür. Daminozid, herbisitler (ot öldürücüler) ve pestisidler (böcek öldürücüler) gibi verimi artırmak amacı ile tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan bir bitki gelişim düzenleyicisidir (Kvien ve diğ., 1989; Gao ve Cahonn, 1990). Bir çalışmada absisik asit ve giberellik asitin, sıçanlarda eritrosit ve dokularda antioksidan savunma sistemine ve lipit peroksidasyonuna etkileri incelenmiştir. Buna göre subakut ve subkronik olarak, absisik asit ve giberellik asidin, toksik etki gösterdiği öne sürülmüştür (Tuluce ve Çelik, 2006).

Birçok tür için elzem olan oksijenin, buna paralel olarak canlı dokular için toksik olabileceği son zamanlarda keşfedilmiştir (Larson, 1988). Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirleticileri, radyasyon, pestisitler, çeşitli tıbbi tedaviler ve kontamine sular gibi birçok etken yüzünden kaçınılmaz bir şekilde oksijen türevi serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır (Kaur ve Kapoor, 2001). Serbest

radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, kararsız bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktiflik kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid, koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır (Koca ve Karadeniz, 2003). Aerobik yaşamın vazgeçilmez elemanı oksijen, temel enerji seviyesindeki moleküler oksijenin (O_2) süperoksit radikali (O_2 .), hidrojen peroksit (H_2 O_2) ve hidroksil radikaline (HO.) dönüşümü nedeniyle toksik etkilere de sahip olmaktadır (Fridovich,1998). Radikallerin başlıcaları; tekli oksijen ($^1O_2$), süperoksit anyonu ($\cdot O_2$-), hidroksi ($\cdot$OH), peroksi (ROO$\cdot$) ve alkoksi (RO$\cdot$) radikalleridir (Kaur ve Kapoor 2001). Reaktif oksijen türlerinin zararları, vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri tarafından kontrol altında tutulmaktadır (Koca ve Karadeniz, 2003). Bu durum günlük yaşamda oksijenli solunumun kaçınılmaz sonuçlarındandır (Turancı, 2013). Serbest radikal oluşumundaki artışa veya antioksidan savunma sistemindeki yetersizliğe bağlı olarak organizmada oksidatif stres gelişmektedir (Lobo ve diğ., 2010; Valko ve diğ., 2007). Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri ile hücrenin antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlikten ortaya çıkmaktadır (Büyükuslu ve Yiğitbaşı, 2015).

Aerobik organizmalarda, dioksijenin güçlü yükseltgen özelliği organik bileşenlerin biyolojik olarak kullanılabilir enerji üretmek için oksidatif bozulmasını sağlamada kullanılmaktadır. Neyse ki bu işlem oksijen aktivasyonu gerektirir çünkü dioksijen ve onun temel hali $3O_2$ biradikaldir. Bu hali çiftleşmemiş 2 elektron bulundurmaktadır. Çoğu biyomolekülümüz eşleşmemiş elektron bulundurmamakta ve bu yüzden kendiliğinden $3O_2$ ile reaksiyona girmemektedir. Fakat çok sayıda serbest radikal ile karşılaşırsa bu moleküllerle reaksiyona girer ve hücreye zarar veren çeşitli peroksitler oluşturmaktadır. Bu yüzden hücrelerimiz istenmeyen oksijen aktivasyonuyla başa çıkmak zorundadır (Chaudière ve Ferrari-Iliou, 1994).

Oksidatif stres kanser, nörolojik bozukluklar, aterosklerozis, hipertansiyon, iskemi, diyabet, akut respiratuvar distres, idiyopatik pulmoner fibrozis, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, astım gibi çok sayıda patolojik durumlara ve hastalıklara neden olmaktadır. Reaktif oksijen türleri çeşitli yollarla DNA modifikasyonuna neden olmaktadır. Purin, primidin ya da şeker bağımlı modifikasyonlar, mutasyonlar, kopmalar ya da translokasyonlar ve çapraz bağlı proteinlerle DNA hasar görmektedir. Bu DNA modifikasyonları karsinojen hastalıklarla yaşlanma ve nörodejeneretif, kardiyovasküler, otoimmun hastalıklarla yakından ilişkilidir (Birben ve diğ., 2012).

Omurgalı hayvanlar hem doğal hem de edinsel bağışıklık sistemine sahiptir, böcekler ve diğer omurgasızlarda ise yalnızca doğal bağışıklık sistemi bulunmaktadır (Strand ve Pech, 1995). Omurgalı ve omurgasız hayvanlar arasındaki en önemli farklardan biri omurgalılarda vücut sıvıları çoğunlukla kan ve lenfatik damarlar içerisinde sınırlandırılırken, omurgasızlarda açık dolaşım mevcuttur (Theopold ve diğ., 2002). Böceklerde ve açık dolaşım sistemine sahip diğer hayvanlarda, omurgalılarda olduğu gibi kan ve lenfatik sıvıların ayrımı olmadığı için vücut sıvıları hemolenf olarak adlandırılmaktadır. Böcek hemolenfi genellikle renksiz veya bazı pigmentlerden dolayı çok az yeşil veya sarı renkli bir sıvıdır. Böcek hemolenfi çeşitli proteinler içermektedir. Bunlar vitellogenler, depo proteinleri, enzimler, hormonlar ve konağın humoral savunma reaksiyonlarından sorumlu proteinlerdir (Altuntaş, 2011).

İndirgenme ve yükseltgenmenin düzenlenmesi hücrenin yaşayabilmesi, aktivasyonu, çoğalması, organ fonksiyonu için kritik öneme sahiptir. Aerobik organizmalar reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini bloke eden enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlarla bütünleşmiştir. Ancak patolojik durumlarda antioksidan sistemler yıkılabilmektedir (Birben ve diğ., 2012). Antioksidanlar mekanizmalarına göre, birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Birincil antioksidanlar; radikallerle reaksiyona giren ve daha zararlı formlara dönüşmelerini böylece yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir. SOD, glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve KAT gibi enzimler serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir. Bu enzimler genel olarak serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücresel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmak suretiyle bir hücresel bölgeden diğerine geçişini de önleyebilmektedirler (Koca ve Karadeniz, 2005). İkincil antioksidanlar ise oksijen radikalini yakalayıp ve radikal zincir reaksiyonlarını kırmakla görevli C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilurubin ve polifenol gibi bileşiklerdir (Ou ve diğ., 2002). Enzimatik olmayan antioksidanlar düşük moleküler ağırlıklı komponentlerdir (Birben ve diğ., 2012). Hücre içi antioksidanlar oksitleyen türleri bertaraf eden düşük moleküler ağırlıklı temizleyeciler ve süperoksit ve hidroperoksitleri indirgeyen enzimleri içermektedir. Bu antioksidan sistemleri kontrol edilemeyen serbest radikal ve aktive olmuş oksijen formlarının oluşumunu önler ya da biyolojik yapılarla reaksiyonlarını inhibe etmektedir. Çoğu serbest radikalin ve aktive olmuş oksijen türlerinin yıkımı, içsel antioksidanların oksidasyonuna çoğunlukla bertaraf edici ve indirgeyici moleküllerin yükseltgenmesine dayanmaktadır (Banerjee ve diğ., 1999).

Patofizyolojik durumlarda üretilen serbest oksijen radikalleri böceklerde de antioksidan sistemler ile uzaklaştırılmaktadır (Felton ve Duffey, 1991; Felton ve Summers, 1995; Krishnan ve diğ., 2006). Hemolenfte bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki değişiklikler *G. mellonella'* da oksidatif stres için biyomarker görevi görmektedir (Lozinskaya ve diğ., 2004). Omurgalılarda olduğu gibi böceklerde de serbest oksijen radikallerinin yapmış olduğu hasarı önleyen enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri vardır. Enzimatik sistemin başlıcaları SOD, KAT, GSHPx, glutatyon redüktaz (GR), GST enzimleridir (Ahmad ve diğ., 1989, 1990, 1991, 1992, 2005; Krishnan ve Kodrik, 2006).

1.1. Antioksidan Enzimler

1.1.1. SOD (EC 1.15.1.1)

SOD, oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan ve O_2 anyonunun, daha az reaktif olan O_2 ve H_2O_2'ye dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir (Yılmaz, 2010; Doyotte ve diğ., 1997).

$$M^{(n+1)}\text{+-SOD} + O_2^{\cdot-}M^{n+} - \longrightarrow \text{SOD} + O_2$$

$$M^{n+}\text{-SOD} + O_2^{\cdot-} + 2H^+M^{(n+1)}\text{-} \longrightarrow \text{SOD} + H_2O_2$$

Bu enzim tarafından redüktif detoksifikasyon gerçekleştiğinde, her O_2- radikali için bir H_2O_2 molekülü oluşmaktadır ve çeşitli hücresel indirgeyiciler, örneğin NADPH tüketilmektedir (Benov ve Fridovic, 1998).

Tüm aerobik canlılarda bulunmaktadır (Koca ve Karadeniz, 2003). Bütün canlılardaki SOD enzimleri, kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre sınıflandırılmaktadır (Yılmaz, 2010). İntraselüler olarak; prokaryotlarda matrikste Mn-SOD, periplazmik boşlukta Fe-SOD, ökaryotlarda ise sitozol ve nukleusda Cu-Zn SOD bulunmaktadır (Kılınç, 1985). Cu-Zn SOD enyüksek katalitik aktiviteye sahip dismutazdır ve ökaryotik hücre sitozolüne ek olarak eritrositlerde de bulunmaktadır (Turancı, 2013).

1.1.2. GST (EC 2.5.1.18)

GST, memelilerde, böceklerde, balıklarda, kuşlarda, annelid, mollusk ve birçok mikroorganizmada bulunmaktadır (Habig ve diğ., 1974). GST katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptir. Detoksifikasyonun yanı sıra hücre içi

bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. GST'ler, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin, daha az reaktif maddelere dönüşümünü sağlamaktadır (Özbey, 2009). Böceklerde insektisitlerden korunmada rol alan detoksifikasyon enzimlerinin büyük bir ailesidir (Yu, 2004).

1.1.3. KAT (EC 1.11.1.6)

H_2O_2, O_2 radikalinin dismutasyon ürünlerinden birisi olup peroksidazlar ya da KAT tarafından detoksifiye edilmektedir (Sonntag, 1992). KAT H_2O_2'yi su ve oksijene indirgemektedir (Ahmad ve diğ., 1991). SOD aktivitesi sonucunda oluşan toksik H_2O_2, KAT tarafından H_2O ve O_2'ye dönüştürülmektedir (Koca ve Karadeniz, 2003).

$$H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

H_2O_2 güçlü bir oksidandır, bitki dokularında bulunması herbivorların gelişiminde ve hayatta kalabilmesinde olumsuz etki yaratmaktadır. (Cadenas, 1989; Fridovich, 1989). H_2O_2 tarafından amino asitlerin dekarboksilasyonu tiyollerin oksidasyonuna bağlı olarak protein enzim ve glutatyonların fonksiyonları bozulmaktadır (Slump ve Schreuder, 1973; Berlett ve diğ., 1990). Bu radikal DNA, membran lipitleri ve esansiyel hücresel yapıtaşları ile reaksiyona girebilmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1984; Fridovich, 1989).

Genellikle peroksizomlarda bulunan KAT, SOD ve peroksidaz gibi enzimlerle birlikte aerobik hücrelerde süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksite karşı savunmadan sorumludur (Sonntag, 1992).

1.2. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonunun pestisite bağlı zehirlenmenin yol açtığı moleküler mekanizmalardan biri olduğu öne sürülmüştür (Kehrer, 1993). ROS lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Membran lipit tabakasında düzenin bozulmasına, böylece membran bağlanma reseptörlerinin inaktif hale gelmesine ve doku geçirgenliğinin artışına neden olmaktadır (Girotti, 1985). Lipid peroksidasyonu oldukça zararlı bir reaksiyondur. Membran yapısına direk olarak, reaktif aldehitler üreterek de indirekt olarak da hücre bilesenlerine zarar vermektedir. Lipid radikalleri hidrofobik yapıda olduğundan reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelmektedir. Membran permeabilitesi büyük oranda etkilenmektedir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehit (MDA), membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına sebep olmaktadır. Bu da hücre yüzey bilesenlerinin yer

değiştirmesine sonuç olarak membran yapısının değişimine neden olmaktadır (Atmaca, 2010). Membran lipit tabakasında düzenin bozulması, membran bağlanma reseptörlerinin inaktif hale gelmesine ve doku geçirgenliğinin artışına neden olmaktadır (Girotti, 1985). Böceklerin lipid peroksidasyonuna duyarlı olma potansiyeli oldukça yüksektir çünkü lipidler kolesterol ve esansiyel hücre membran komponentlerinin yapı taşıdır ve benzersiz fizyolojik fonksiyonlara sahiptir (Downer, 1986). Böceklerde de MDA miktarının artışı, lipid peroksidasyonu seviyesi hakkında bize bilgi vermektedir (Krishnan ve diğ., 2009).

1.3. Konak *Galleria mellonella*

Büyük balmumu güvesi olarak bilinen *G. mellonella,* yumurtalarını petekler üzerine bırakır, larval fazdayken bal petekleri ile beslenmekte, bu larvalar peteğin orta taban kısmında tüneller açarak, yıkıntı ve döküntü oluşturmak suretiyle zarar vermektedir. Dolayısıyla arıcılık endüstrisinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Laboratuvar koşullarında rahatlıkla üretilmesi nedeniyle toksisite ve fizyolojik araştırmalarda kullanmak için iyi bir model organizmadır. Larval dönemleri, böceklerin hem hücresel hem de humoral savunma mekanizmalarında uygun model oluşturmaktadır (Altuntaş, 2011; Dere, 2015).

Normal koşullarda (24-26°C) bu yumurtalardan yaklaşık 5-10 gün içinde larvalar çıkmaktadır. Larvalarda 3 çiftön üye ve bir takım yalancı abdominal üye vardır. Sıcaklık ve besin varlığınabağlı olarak larval gelişim 1-5 ay arasında; pupal dönem ise sıcaklık ve neme bağlı olarak 8-14 gün sürebilmektedir. Pupadan çıktıktan sonra ergin dişi ve erkekler 24 saat içinde çiftleşebilmektedir. Dişiler çiftleştikten 4-10 gün sonra yumurtlamaya başlamaktadır. Hayatları süresince yaptıkları yumurta sayısı 300-600 arasında değişmektedir. Ergin dönemde beslenmemektedir ve yaklaşık olarak 3-30 gün yaşamaktadır. Çiftleşen dişiler yumurtalarını bıraktıktan sonraki 7 gün içinde ölmektedirler (Özer, 1962). Sistematikteki yeri aşağıda verilmiştir:

Alem: Animalia
Şube: Arthropoda
Sınıf: Insecta
Takım: Lepidoptera
Üstfamilya: Pyraloidea
Familya: Pyralidae
Altfamilya: Galleriinae

Cins: Galleria Fabricius, 1798
Tür: *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)

1.4. Endoparazitoid *Pimpla turionellae*

P. turionellae çok sayıda zararlı Lepidopter türün prepup ve pupunda soliter, idiobiont ve endoparazitoit olarak gelişen bir türdür (Kansu ve Uğur, 1984). İdiobiont türler konaklarını kalıcı olarak felçederek kendi yavrularının beslenip gelişmesine uygun hale getirmektedirler (Wharton, 1993).

Bu organizmaların yaşamının devamı için parazitlemenin ilk evresi çok önemlidir. Örneğin, konak böceğin parazitoit larvasının beslenmesine uygun hale getirilmesi amacıyla ergin dişi parazitoit konak içine konağın savunma tepkilerini baskılayacak çeşitli faktörler enjekte etmektedir. Endoparazitoit yumurta ve larvaları genellikle konak tarafından yabancı madde olarak algılanmayan yüzey faktörlerine sahiptirler (Asgari ve Schmidt, 1994). Alternatif olarak, dişi parazitoit ovipozisyonu tamamlasa bile parazitoit yumurta ve larvaları konak bağışıklık tepkileriyle yok edilebilmektedir (Er., 2011).

Konak- endoparazitoit ilişkisindeki süreçte; ergin dişi parazitoit tarafından konağa yumurta bırakmaktadır ve parazitlemeye bağlı olarak konakta fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir. Konağın ölümüyle sonuçlanan, parazitoit neslinin konak vücut boşluğundan parazitoidin yumurtalarından çıkan larvalar konakların dokularıve vücut sıvıları ile beslenerek larval gelişimlerini devam ettirmektedir. Ergin dişilerin yumurta bırakmaları yaklaşık 3-6 gün sürmekte, dişiler yaklaşık 50 gün süreyle yumurta koyabilmektedirler. Dişilerde yumurta bırakmaya yarayan belirgin bir ovipozitör bulunmaktadır. Ergin dişiler çoğunlukla konakları büyüklüğüne göre seçmektedir. Çıkan erginin cinsiyeti ve yumurtadan ergin döneme geçiş süresi konağa bağlı olarak değişiklik göstermektedir. *G. mellonella*'nın puplarında gelişme süresi dişiler için ortalama 17-19 gün iken, erkeklerde 16-18 gün arasındadır. *P. turionellae* erginleri hem meyve özleri, bal ve nektarla beslenirler hem de dişiler konaklarına yumurta bıraktıktan sonra ovipozitorla deldikleri bölgeden dışarı sızan hemolenf ile beslenmektedir (Reed ve diğ., 1998). Sistematikteki yeri aşağıda verilmiştir.

Alem: Animalia
Şube: Arthropoda
Sınıf: Insecta

Takım: Hymenoptera
Üstfamilya: Ichneumonoidea
Familya: Ichneumonidae
Altfamilya: Pimplinae
Cins: Pimpla
Tür: *Pimpla turionellae* (Linnaeus, 1758)

Bu çalışma ile BGD olan IAA_3 'ün zararlı konak türü *G. mellonella* L. ve biyolojik mücadelede bu zararlı türün doğal düşmanı olan *P. turionellae* L.'nın serbest radikallerini detoksifiye eden antioksidan enzim aktivitelerinin nasıl etkilendiği araştırıldı.

2. MATERYAL VE METHOD

2.1. Konak ve Parazitoid Kültürleri

Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi laboratuarında bulunan *G. mellonella* ve *P. turionellae* erginleri ile konak ve parazitoid türün stok kültürlerinin devamlılığı sağlandı. *G. mellonella* stok kültüründen alınan 2 dişi ve 2 erkek ergini, içerisinde dişilerin yumurta bırakması amacıyla 2 gr doğal koyulaşmış petek bulunan 1 L'lik cam kavanozlara bırakıldı. Kavanozların ağzı hava sirkülâsyonunu önlemeyecek şekilde bez ile kapatıldı ve larvalar çıktığında üstüne delikler açılmış kapaklar (larvaların bezi delip kaçmalarını önlemek için) kapatıldı. Kültür kurulması ardından geçen 10 gün sonra larva çıkışı gözlemlendiğinde sentetik besinden yaklaşık 10 gr verildi. Kavanozlar 25±2°C sıcaklık, %60±5 bağıl nem ve günlük 12:12 (K:A) fotoperiyot uygulanan laboratuar koşullarında bekletildi. Larvaların beslenebilmesi amacıyla populasyon yoğunluğuna bağlı olarak, kavanozlara zaman zaman yeterli miktarda doğal petek, bal,su, gliserin ve kepek karıştırılarak hazırlanan besin haftanın 3 günü, 1 gün ara ile ilave edildi. (Besin hazırlanırken, 100 g petek, 250 g kepek, 75 ml bal, 150 ml gliserin, 75 ml saf su homojen hale gelene kadar karıştırıldı.) İçinde fazla birey olan kavanozlar bölündü ve yeterli olarak beslenmeleri sağlandı. Konak larvaları son larva evrelerine doğru kültürden alınıp içerisinde sadece katlanmış kağıt bulunan kavanozlara bırakıldı. Kavanozlara 20'den fazla larva koyulmamasına özen gösterildi ve tarih atıldı. Bu şekilde elde edilen konak pupaları turunculaştıkları dönem yani 5- 7 günlük pupalar, geniş tüplere alınan parazitoidlere yumurtalarını bırakmak üzere en verimli döneminde olan parazitoidlere haftada 3 kez, 3 pupa, daha az verimli olanlara 2 ya da 1 kez verildi. Parazitoidlerin bulunduğu yarım kiloluk kavanozların üzeri sadece lastik ile kumaşla kapatıldı. Ergin bireylerin beslenmesi amacıyla 1'er gün arayla 1:3 oranında temiz su ile hazırlanan ballı su pamuklara emdirilerek, şişe kapaklarına yerleştirildi. Uzun bir pense yardımıyla dikkatle kavanoza bırakıldı.

2.2. Deney Gruplarının Hazırlanması

2.2.1. İndol-3-asetik asit uygulanması

Stok kültür için hazırlanan sentetik besinin aynısı susuz olarak hazırlandı. Farklı konsantrasyonlarda (50, 500, 1.000, 5.000, 10.000 ppm) IAA_3, çözünmesi için önce NaOH ile karıştırıldı. Çözündükten sonra saf su eklendi. Solüsyonlar yarı sentetik besin içerisine, besindeki su oranında ilave edilerek konak larvalarının beslenmesi için kavanozlara bırakıldı. Besini verme işlemi stok kültürle aynı şartlarda aynı mitarda ve sıklıkta yapıldı. Kontrol grubunda ise, konaklar saf su ile dozlu solüsyonlarla aynı miktarda NaOH karıştırılarak hazırlanmış sentetik besin ile beslendi. Deney ve kontrol gruplarından elde edilen 0,18±0,2 g ağırlığa ulaşan konak larvaları, içinde sadece katlanmış teksir kâğıdı bulunan plastik petri kaplarında parazitoidlere verilmek üzere pupa olmaları sağlandı. Kullanılan petri kapları üzerine bant yapıştırılarak larvaların kaçması önlendi.

2.2.2. Hemolenf toplama ve saklama

-*G. mellonella* son evre larvalarından 0,18 ± 0,2 g ağırlığına gelen bireylerden hemolenf örnekleri toplandı.

-Saf alkole sokulup hemen çıkarılan larvalar buz kalıbına konularak hareketleri yavaşlatıldı.

-Bu bireylerin üçüncü ön bacak bölgesi ince uçlu diseksiyon iğnesi ile delinerek birey başına 10 µl hemolenfi alınarak, feniltiyoüre bulunan 1 ml'lik mikrotüplere konuldu. Tüm örnekler analiz edilinceye kadar -20°C'de saklandı.

-Aynı şekilde *G. mellonella* son evre larvalarından 0,18 ± 0,2 g ağırlığına gelen bireyler toplandı. Ancak parazitoidlere verilmek üzere kağıt ile plastik petri kaplarına yerleştirildi ve kaçmamaları için kenarlarına bant yapıştırıldı. Turunculaşan pupalar parazitoidlere sunuldu.

-Parazitleme yapmalarının ardından 6 gün içinde ve hatta sonraki 4-5. gün de kontrol edilerek farklı dozlardan parazitlenmiş olan konak pupaları dissekte edildiler ve çıkan parazitoid larvalarından hemolenf toplandı. Bu larvaların yan kısmından dikkatlice delinerek mikrokapiler tüp ile 5 µl miktarda hemolenf aynı şekilde feniltiyoüre bulunan tüplere alındı ve örnekler -20°C'ye kaldırıldı.

-Tüplerde tarih ve hangi doza ait oldukları, alınabilen hemolenf miktarı belirtildi.

-Analiz için kullanılan larva miktarı larvadan alınabilen hemolenf miktarına göre değişkenlik gösterdi. Verimli şekilde larva elde edilemedi. Dolayısıyla 1 tekrar için aynı dozdan birleştirilenler oldu ve 10 µl'den fazla hemolenf alınabilen larvalar 1 tekrar için ayrıldı.

2.2.3. Protein analizi

Bradford (1976) yöntemi ile ELISA cihazında endpoint okuma yapılarak tayin edildi. Larval protein miktar tayini için; stok olarak 1 mg/ ml protein kullanıldı. 1 mg protein Bovine serum albümin (BSA) üzerine 1 ml distile su ilave edilerek hazırlanan stok çözelti ile 0,01 mg ile 1 mg/ ml arasında standart protein solüsyonları hazırlandı. Her bir standart çözeltiye Bradford (1976) metodu uygulanarak 595 nm'de absorbans değerleri elde edildi. Çıkan absorbans değerlerine göre regresyon eğrisi çizilerek y= 0,202x + 0,011 formülü belirlendi (x absorbans değerini ifade eder). Bu denklem kullanılarak larval protein miktarları hesaplandı.

-Hemolenf örnekleri buz üstünde çözdürüldükten sonra alınan hemolenf miktarına eşit miktarda homojenizasyon tamponu ((w/v 1,15% KCl, 25 mM (potasyum dibazik) K_2HPO_4, 5 mM etilen-diaminetetraasetik asit (EDTA), 2 mM fenil metil sülfonilflorid (PMSF)) hemolenf üzerine eklendi. PMSF taze kullanılması gerektiğinden deney yapılacağı zaman 2 µl PMSF, 98 µl homojenizasyon tamponu olmak üzere 1/49 oranında eklendi. Hazırlanan homojenizasyon tamponu vortekslendi. Deneye göre örnek daha yoğun kullanılacaksa saf hemolenf santrifüj edilip, homojenizasyon tamponu sadece protein tayini yaparken kullanıldı.

-Örnekler 1000xg'de 10 dak. +4°C'de santrifüj edildi.

-Alınan süpernatant yeni bir ependorf tüpe aktarıldı ve +4°C'ye kaldırıldı.

-Tüm deneylerde homojenizasyon tamponu aynı gün içerisinde kullanıldı ve gün içerisinde kullanılmadığı anlarda örneklerle birlikte +4°C'de saklandı.

-Hemolenften alınan 1 µl kuyucuğa konuldu ardından 4 µl homojenizasyon tamponu üzerine eklendi. Son olarak bradford boyasından her kuyucuğa 200 µl çoklu pipet yardımıyla aktarıldı. 595 nm'de endpoint okuma yapıldı. Ölçüm sonrası elde edilen absorbans değerleri regresyon doğrusu formülüne göre hesaplanarak protein miktarları (mg) belirlendi.

2.2.4. SOD aktivitesinin ölçümü

G. mellonella ve *P. turionellae* larvaları üzerinde SOD (EC 1.15.1.1) aktivitesini ölçmek için proje bütçesinden faydalanarak alınan (Cayman Chemical, 706002) ticari deney kitinin deney protokolü izlenerek ELISA cihazında yapıldı. Deneye başlamadan önce aşağıdaki açıklandığı gibi hazırlık yapıldı.

-Deney tamponu: Deney tamponunun 3 ml'sini 27 ml HPLC saflığında su ile 96 kuyucuğu test etmek için konsantre edildi. Son deney tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0,1 Mm DTPA (dietilentriaminpentaasetik asit)) radikal dedektörü seyreltmede kullanıldı.

-Örnek tamponu: Örnek tamponun 2 ml'sini 18 ml HPLC saflığında su ile 96 kuyucuk için konsantre edildi. Gerekli görüldüğünde örnek tampon ilave edildi. Son örnek tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) SOD standartları ve ksantin oksidaz ve SOD örneklerini deney öncesi hazırlamada kullanıldı. Deney sırasında kullanılmadığı sürece +4°C'de saklandı.

-Radikal belirleyici: 250 µl tetrazolium tuz solüsyonu içeren vial kullanmadan önce 50 µl verilen soluyon başka bir viale alınıp 19,95 ml dilue edilmiş deney tamponu ile seyreltildi. Alimünyum folyo ile kaplandı. Radikal dedektör kullanılmadığında -20°C'de saklandı.

-SOD standart: 100 µl bovine eritrosit SOD (Cu/Zn) içeren vial içeren buz üstünde saklandı ve standart eğri hazırlamak için kullanıldı. Kullanılmadığı sürece enzim -20°C'de saklandı.

-XOD: 150 µl içeren şişeler kullanılmadan önce, bir tanesi çözüldü ve 50 µl tedarik edilmiş enzimi başka bir şişeye aktarıldı ve 1,95 ml numune ile seyreltildi. Eritilmiş ve seyredilmiş ksandin oksidaz buzda muhafaza edildi. Seyreltilmiş enzim 1 saat için stabil kalabildiğinden örnek sayısına göre gerektiği kadar ksantin oksidaz hazırlandı. Erimiş enzimi yeniden dondurmamaya özen gösterildi.

-Standart hazırlama: 20 µl SOD standartı 1,98 ml örnek tamponu ile dilüe ederek SOD stok solusyonunu elde edildi. 7 temiz cam test tüpü alındı ve A'dan G'ye kadar harflendirildi. Kullanılan değerler Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

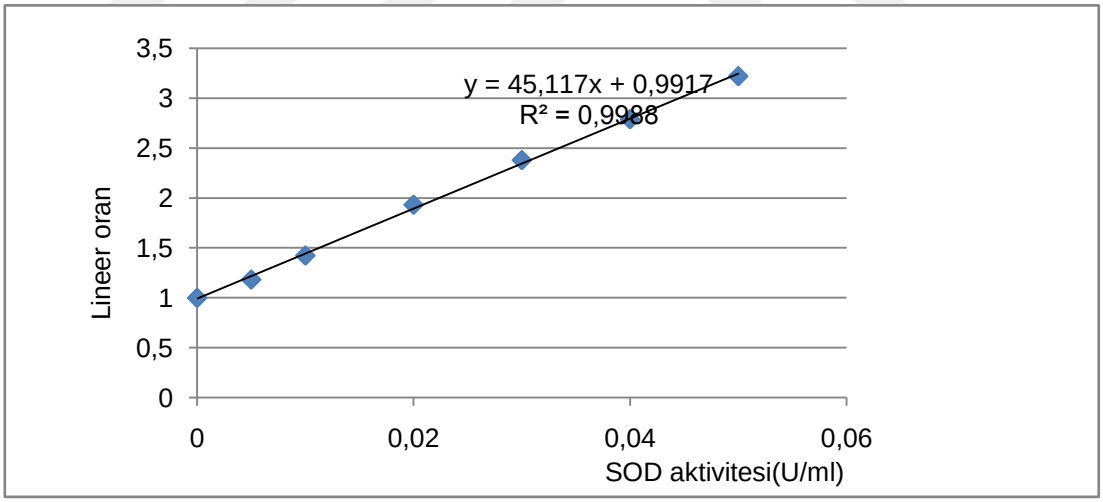
-SOD standart kuyucuklar: 200 µl dilüe edilmiş radikal dedektör ve 10 µl standart A-G tüplere konuldu.

Tablo 2.1. SOD standartları

Tüp	SOD STOK µl	ÖRNEK TAMPONU µl	SON SOD AKTİVİTESİ
A	0	1.000	0
B	20	980	0,005
C	40	960	0,010
D	80	920	0,020
E	120	880	0,030
F	160	840	0,040
G	200	800	0,050

Standart eğri grafiğini hazırlamak için Tablo 2.1'deki şekilde hazırlanan stok ve standart SOD çözeltileri (0, 20, 40 ve 80,120, 160, 200, nmol/ ml) kullanıldı.

Standartlara ait absorbans değerleri ile SOD aktivitesinin hesaplamasında kullanılacak olan doğrusal oranlar hesaplandı. Hesaplama yapılırken içinde enzim bulunmayan standart çözeltinin absorbans değeri, enzim bulunan standartların absorbans değerlerine bölündü. Lineer oran/SOD aktivitesi (U/ml) doğru denklemine ait y = 45,117x + 0,9917 R^2 = 0,9988 formülü hesaplandı, bu formül kontrol ve deney gruplarının SOD enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanıldı (Şekil 2.1). Deneyin yapılışı aşağıda anlatılmıştır.



Şekil 2.1. SOD standart eğri

-Homojenizasyon tamponu ile saf hemolenf +4^{o}C'de 10 dak. boyunca 700-1000xg'de santrifüj edilip, bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı.

-Örnek kuyucukları: 200 µl dilüe edilmiş radikal dedektör ve kuyucuklara eklenen örnek miktarı 0,5 µg olacak şekilde ayarlandı. Örnekler, örnek tamponu ile dilüe edildi.

-Deneyde kullanılan bütün kuyucuklara 20 µl dilüe ksantin oksidaz eklendi. Ksantin oksidaz hızla karanlık ortamda eklendi. Başlama zamanı not alındı.

-Plaka kapağı alüminyum folyo ile kapatıldı.

-Çalkalayıcı üzerinde 30 dak. boyunca oda sıcaklığında plaka inkübe edildi. 440-460 nm'de plate okuyucu kullanarak absorbansı okuma yapıldı.

Örneklere ait ortalama absorbans değerleri alındı. Standart absorbans değeri standart eğri hazırlanırken yapıldığı gibi bu defa örneklere ait absorbanslara bölündü. Örneklerin absorbansından standart eğri grafiğinde elde ettiğimiz denklemde x absorbans değerini ifade eder. Aşağıdaki kite ait Denklem (2.1) kullanılarak, standart eğri grafiğinde elde ettiğimiz denklemde y bilinmeyeni bulundu. Bulunan değer sabit katsayıyla ve dilüsyon faktörü ile çarpılarak enzim aktivitesi değerine ulaşıldı.

$$\text{SOD (U/ml)} = \left[\frac{\text{örnek LR-y-kesişim noktası}}{\text{eğim}} \times \frac{0,23}{0,01}\right] \times \text{örnek dilüsyonu} \qquad (2.1)$$

2.2.5. GST aktivitesinin ölçümü

GST (EC 2.5.1.18) aktivitesi analizleri konak *G.mellonella* ve *P. turionellae* üzerinde proje bütçesinden faydalanarak alınan (Cayman Chemical, 703302) ticari deney kitinin deney protokolü izlenerek ELISA cihazında yapıldı. Reaktif hazırlanışı aşağıda anlatılmıştır.

-GST deney tamponu: (100 mM potasyum fosfat, pH 6.5, % 0,1 Triton X-100 içerir). Kullanmadan önce GST deney tamponunun 10 ml alarak 10 ml HPLC-saflığında su ile seyreltildi. Deney yaparken kullanılmadığı an +4°C'de saklandı.

-GST örnek tamponu: (100 mM potasyum fosfat, pH 6.5, % 0,1 Triton X-100 ve 1 mM glutatyon içerir). GST deney tamponunun 5 ml alarak, 5 ml HPLC saflığında su ile seyreltildi. Hazırlanan son örnek tamponu deney öncesi GST kontrolu ve GST örneklerini seyreltmek için kullanıldı. Deney yaparken kullanılmadığı zaman +4°C'de saklandı.

-GST deney (kontrol): At karaciğeri içeren GST solüsyonu tekrarlanan donma ve erimeyi önlemek için GST küçük viallere bölündü ve -20°C'de saklandı. Kullanmak için öncelikle, 10 µl enzim diğer viale transfer edildi ve 190 µl seyreltilmiş örnek tamponuyla dilüe edildi ve kullanılmadığı müddetçe -20°C'de saklandı. Standart

deney koşullarında deneyin yapılışı kısmında tanımlandığı gibi, seyreltilmiş enzimin 20 µl kısmı yaklaşık olarak 0,04 absorbans unite/dak artışı beklendi.

-GST glutatyon: Bu vial şişe indirgenmiş glutatyon içermektedir. Kullanılmadığı zaman -20°C'de saklandı. Kullanıma hazır olduğundan sadece örnek için gerekli miktar steril ependorf tüpe alındı.

-GST CDNB: 1-kloro-2,4,dinitrobenzenin (CDNB) ethanolik solüsyonunu içermekte olan vial şişe içerisindeki madde kullanıma hazır olduğundan sadece örnek için gerekli miktar steril ependorf tüpe alındı. Kullanılmadığı sürece -20°C'de saklandı.

Deneyin yapılışı aşağıda anlatılmıştır.

-700-1000xg 10 dak. +4°C'de santrifüj edildi ve Bradford ile protein tayini yapıldı. Süpernatantı alınacağından ve elimizde deneyde kullanmak üzere 20 µl hemolenf bulunması gerektiğinden santrifüj öncesi homojenizasyon bufferı ve saf hemolenf eşit miktarda alınarak gerekli miktarda karıştırıldı.

-Enzimatik olmayan kuyucuklar: 2 kuyucuğa 170 µl deney tamponu ve 20 µl glutatyonu koyuldu.

-Pozitif kontrol kuyucukları (at karaciğer GST): 2 kuyucuğa 150 µl deney tamponu , 20 µl glutatyon ve 20 µl dilue edilmiş GST (kontrol) koyuldu.

-Örnek kuyucukları: 150 µl deney tamponu 20 µl glutatyon 3 kuyucuğa eklendi. Kuyucuğa eklenen örnek miktarı daima 20 µl idi.

-Reaksiyonu başlatmak için hızla kuyucuklara 10 µl CDNB eklendi.

-Her dakika 340 nm'deki absorans plate okuyucu kullanılarak 5 dak. kinetik okuma yapıldı.

Analizler ve Hesaplamalar: Reaksiyon hızı aşağıdaki formüllerle belirlendi. Dakikadaki absorbans değişiminin belirlenmesi için aşağıdaki yollar izlendi:

-Absorbans değerlerinin, lineer eğride belirli zamanların işaretlenmesi ile elde edildi ya da,

-Lineer eğride iki nokta belirlendi ve o süre zarfında absorbans değişikliği Denklem (2.2) kullanılarak belirlendi.

$$\frac{\Delta A_{340}}{\text{dak.}}. = \frac{A_{340}(\text{Zaman 2}) - A_{340}(\text{Zaman 1})}{\text{Zaman2(dak.)} - \text{Zaman1 (dak.)}} \quad (2.2)$$

-Dakikadaki absorbans değişim oranı da enzim içermeyen kuyucuklarda belirlendi ve örnek kuyucuklarındaki oranından çıkarıldı.

-Denklem (2.3) kullanılarak GST aktivitesi hesaplandı. Reaksiyon hızı 340 nm'de CDNB azalma katsayısı kullanarak belirlendi.

$$\text{GST Aktivitesi} = \frac{\Delta A_{340}\ /\text{dak.}}{0{,}00503\ \mu M^{-1}} \times \frac{0{,}2\ \text{ml}}{0{,}02\text{ml}} \times \text{Örnek dilüsyonu} = \text{nmol/dak/ ml} \quad (2.3)$$

2.2.6. KAT aktivitesinin ölçümü

-Homojenatlar 700-1000xg 10 dak. +4°C'de santrifüj edildi. Protein analizi yine Bradford yöntemi ile yapıldı. Deney aralarında örnekler +4°C'de saklandı.

-Süpernatant enzim aktivitesini belirlemede kullanıldı.

-*G. mellonella* üzerinde KAT (EC 1.11.1.6) aktivitesini belirlemek için Chance ve Maehly tarafından geliştirilen metot kullanıldı.

-Hemolenf örnekleri için fosfat tamponu ((potasyum dibazik) K_2HPO_4, (potasyum monobazik) KH_2PO_4) hazırlandı.

-Okuma yapmak için kuvarz küvet kullanıldı.

-Örneklere ait okuma yapılmadan önce kör okuması yapıldı.

-Kör için hazırlanan küvete 900 µl fosfat tamponu, 100 µl H_2O_2, 200 µl distile su, numune için küvete 900 µl fosfat tamponu, 100 µl H_2O_2, 200 µl homolizat koyuldu.

-Okuma ELISA cihazında 240 nm'de 3 dakikalık periyotlarda kinetik ölçüm yapıldı.

-Periyot sonrası absorbanstaki H_2O_2 bozunmasına bağlı azalma ölçülerek belirlendi.

-Köre ait absorbans değeri, örneklere ait absorbans değerlerinden çıkarılarak absorbans değerleri elde edildi.

Parazitoid üzerinde KAT aktivitesinin ölçümünde farklı bir yöntem izlendi:

-*P.turionella* larvaları üzerinde KAT aktivitesini belirlemek için Aebi (1984) tarafından geliştirilen metot kullanıldı.

-Hemolenf örnekleri için fosfat tamponu (KH_2PO_4, Na_2HPO_4 • $2H_2O$ (Disodyum fosfat)) hazırlandı.

-Okuma yapmak için kuvars küvet kullanıldı.

-Kör için hazırlanan küvete 50 mM fosfat tamponu ve 500 mM H_2O_2 konuldu. Okutulduktan sonra üzerine örnekten 10 µl eklenerek 5 dak. ölçüm yapıldı.

-Okuma ELISA cihazında 240 nm'de 5 dakikalık periyotlarda kinetik olarak yapıldı.

-Periyot sonrası absorbanstaki H_2O_2 bozunmasına bağlı azalma ölçülerek belirlendi.

2.2.7. TBARS (MDA ölçümü) analizi

Ticari deney kiti (Cayman Chemical, 700870) kullanılarak lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA miktarı, asidik koşullarda sıcağa maruz kalan örneklerin TBA (tiyobarbiturik asit) ile etkileşerek pembe renk oluşturmasına dayalı yöntem uygulanarak belirlendi. Deney yapılmadan önce kitte bulunan kimyasallar aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

-Tiyobarbitürik asit deney reaktifi: Renk reaktifi hazırlamada kullanıldı.

-TBA asetik asit: Renk reaktifi hazırlamada kullanılmak üzere 10 ml solüsyondan 40 ml HPLC suyu ile seyreltilmesi gereken solüsyon örnek sayısına göre miktar azaltılarak seyreltildi. Dilüe hali falkon tüp içinde saklandı.

-NaOH deney tamponu: Renk reaktifi hazırlamada kullanılmak üzere 10 ml solüsyondan 40 ml HPLC suyu ile seyreltilmesi gereken solüsyon örnek sayısına göre miktar azaltılarak seyreltildi. Dilüe hali falkon tüp içinde saklandı.

-TBA malonaldehit standart: Kullanıma hazır solüsyon standart eğri hazırlamada kullanıldı. Kolorimetrik standart hazırlanışı Tablo 2.2'deki değerler uygulanarak yapılmıştır.

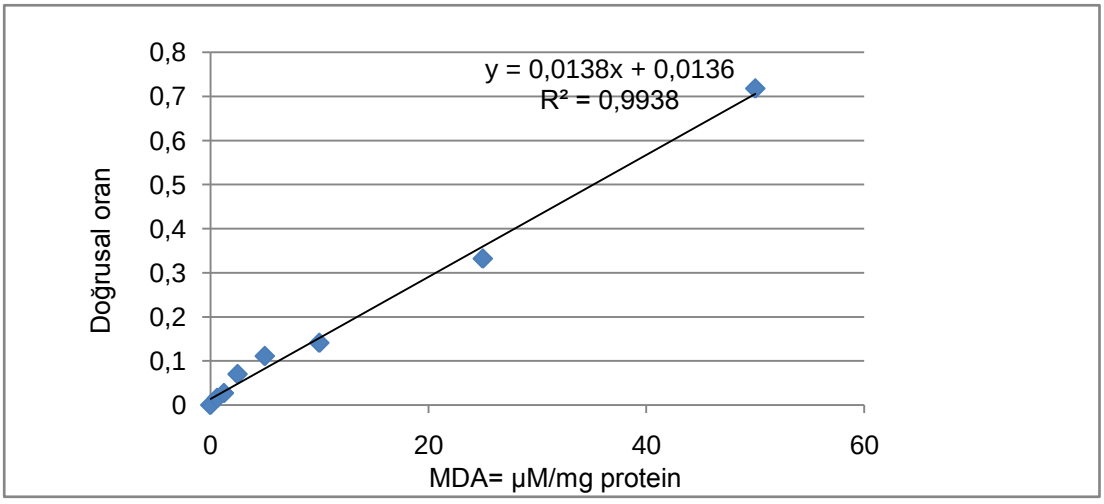
-TCA deney reaktifi: Kullanıma hazır olduğundan gerekli miktar ependorf tüpe ayrıldı.

-Renk reaktifi: 24 örnek için 106 mg Tiyobarbitürikasit deney reaktifi eşit miktarda 10 ml TBA asetik asit ile 10 ml NaOH deney tamponu içinde tortu kalmayana kadar çözdürülerek hazırlandı.

Tablo 2.2. MDA kolorimetrik standartları

Tüp	MDA	SU (µl)	MDA konsantrasyonu (µM)
A	0	1.000	0
B	5	995	0,625
C	10	990	1,25
D	20	980	2,5
E	40	960	5
F	80	920	10
G	200	800	25
H	400	600	50

Standart eğri hazırlanmadan önce MDA standarttan 250 µl alınıp 750 µl HPLC ile dilüe edilmesi gerektiğinden kullanacağımız miktar kadar harcamak için bu oran 50 µl te 150 µl HPLC su şeklinde ayarlandı. Bu işlem için Tablo 2.2'deki şekilde hazırlanan stok ve standart MDA çözeltileri (0, 5, 10, 20, 40, 80, 200 ve 400 nmol/ ml) kullanıldı. Standart eğri hazırlanırken deney yapılışı aynı şekilde uygulandı. MDA miktar tayini için öncelikle standart eğri denklemi oluşturuldu. Standarta ait absorbans değerleri ile oluşturulan doğru denklemi y = 0,0138x + 0,0136 R^2 = 0,9938 formülü hesaplandı. Aşağıda verilen kalibrasyon eğrisine göre örnekteki MDA miktarı belirlendi.



Şekil 2.2. MDA standart eğri

Deneyin yapılışı sırasıyla aşağıda verilmektedir.

-Süpernatantı alınacağından ve elimizde deneyde kullanmak üzere 25 µl bulunması gerektiğinden santrifuj için alınan saf hemolenf miktarı 30 mcl üzerinde 2 ml lik ependorf tüpe alındı.

-Homojenatlar 700-1000xg'de 10 dak. +4°C'de santrifüj edildi ve Bradford ile protein tayini yapıldı.

-Sadece protein tayini yaparken homojenizasyon tamponu kullanıldı. Protein tayini sonrası örnekler +4°C de bekletildi. Aynı şekilde Tbars Cayman Kiti de daima +4°C de tutuldu.

-Örnek hemolenf HPLC ile eşit miktarda deney öncesi seyreltildi.

-Ne kadar örnek varsa 5ml'lik cam tüpler örneğe göre adlandırıldı.

-İlk olarak hemolenfe eşit miktarda 25 µl HPLC saflığında su tüplere konuldu.

-Ardından örnekler aynı miktarda tüplere eklendi.

-TCA deney reaktifi 50 µl tüplere aktarıldı.

-Son olarak 400 µl her tüpe renk reaktifi eklendi ve kaynamakta olan suyun içine tüpler üstleri alüminyum folyo ile sıkıca kapatılarak ısıya dayanıklı tüplüğe sabitlendikten sonra yerleştirildi. 1 saat boyunca kaynamakta olan suyun içinde bekletildi. Suyun buharlaşması göz önüne alınarak aralıklı olarak kaynar su eklendi.

-1 saat sonra hemen örneklerin bulunduğu tüpler buz havuzuna yerleştirildi ve 10 dak. boyunca burada reaksiyonun durması için tutuldu.

-Buz havuzundan alınan örnekler 2 ml'lik ependorf tüplere alınarak 10 dak. 1600xg'de +4°C'de santrifüj edildi.

-Santrifüj sonrası santrifüje koyulduğu açı bozulmadan alınan tüplerden her kuyucukta 200 µl olacak şekilde işaretli kuyucuklara örnekler ELISA cihazında okutulmak üzere mikrotitre plakaya koyuldu. 530 nm'de endpoint absorbans sonuçları alındı.

2.3. İstatistik

Her iki canlıda IAA_3 uygulanan 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 kullanıldı. Sonuçlar $P< 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

3. BULGULAR

Farklı dozlarda BGD IAA_3'ün antioksidan enzimlerin aktivitesine etkilerinin belirlenmesi amacıyla hem konak hem de parazitoit, düzenli olarak besinle birlikte belirli miktarlarda IAA_3'e maruz bırakıldı. Ardından konak ve dozlu grupları parazitlemiş yeni çıkan parazitoid larvalarından alınan hemolenf üzerinde yapılan deneyler sonucu elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.1. SOD Aktivitesi

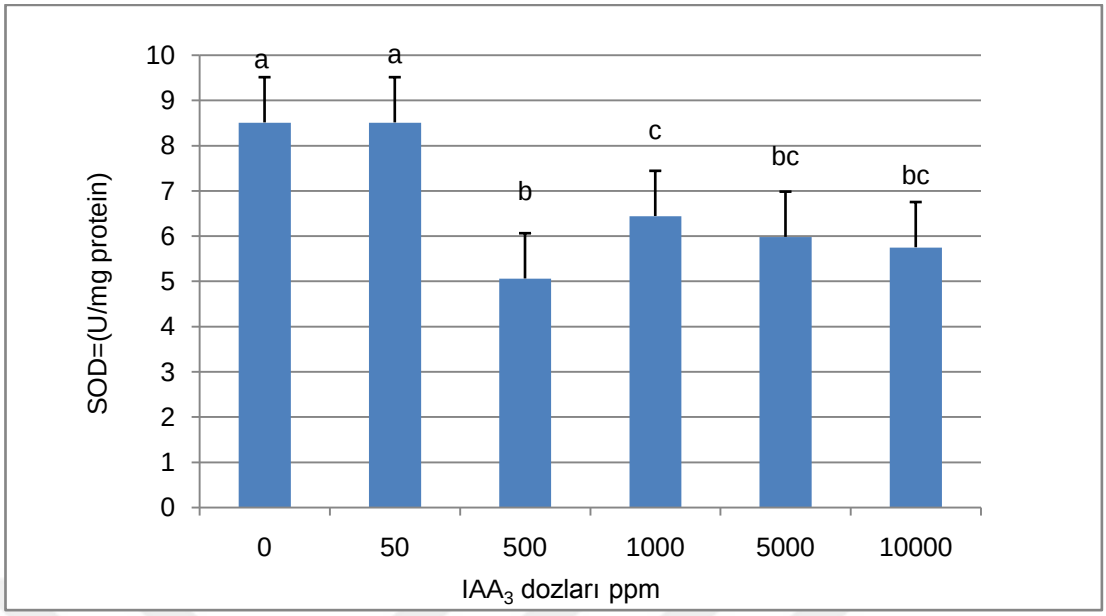
Farklı IAA_3 dozlarına maruz kalan *G. Mellonella* larval hemolenfinde belirlenen SOD enzim aktivitesine ait sonuçlar Tablo 3.1'de yer almaktadır.

Tablo 3.1. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün SOD aktivitesine etkisi (U/mg)

IAA_3 DOZ ppm	SOD=U/mgprotein ORT±SH
Kontrol	8,51±0,23a
50	8,51±0,00a
500	5,06±0,23b
1000	6,44±0,23c
5000	5,98±0,23bc
10000	5,75±0,23bc

Deney grubu sonucu her biri 10 bireyden oluşan 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05), SH; Standart Hata.

Şekil 3.1 incelenecek olursa 50 ppm'in enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmadığı görülmektedir. Enzim aktivitesinde en fazla düşüş 500 ppm'de görülmekle birlikte 500 ppm ve üzerindeki tüm dozlar aktivitede düşüşe neden oldu. Dozlar arasında 500 ppm ve 1.000 ppm haricinde diğer dozlarda anlamlı fark belirlenmedi. 500 ppm'e göre 1.000 ppm'de aktivitede artış belirlendi.



Şekil 3.1. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün SOD aktivitesine etkisi (U/mg)

Deney grubu sonucu her biri 10 bireyden oluşan 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).

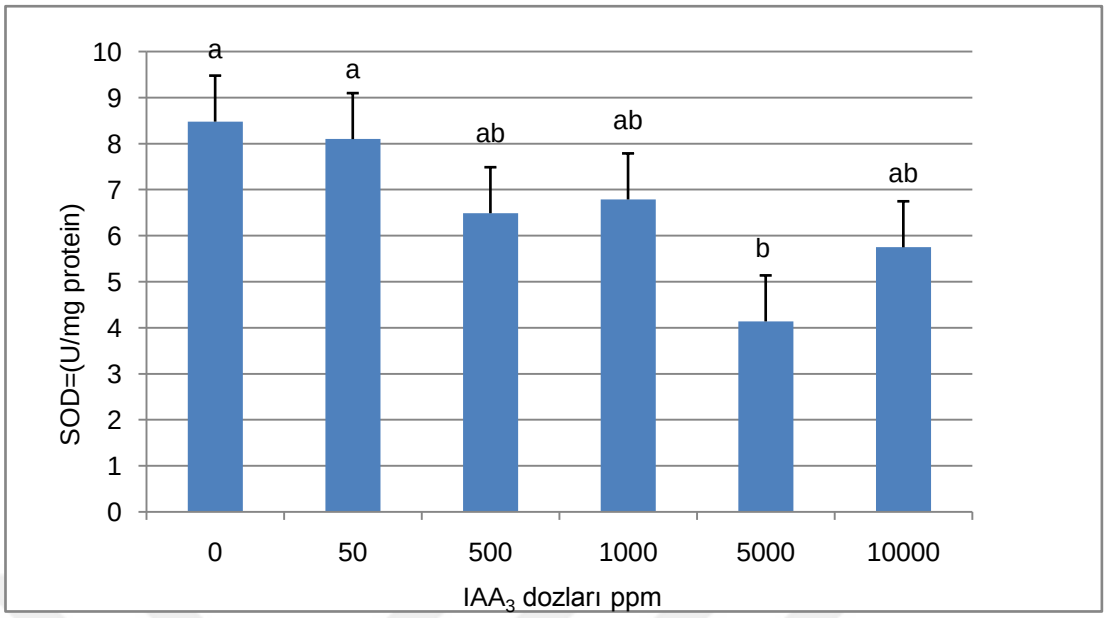
Farklı IAA_3 dozlarına maruz kalan *P. turionella* larval hemolenfindeki SOD enzim aktivitesine ait istatistiksel sonuçlar Tablo 3.2'de verilmektedir.

Tablo 3.2. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün SOD aktivitesine etkisi (U/mg)

IAA_3 DOZ ppm	SOD=U/mgprotein ORT±SH
Kontrol	8,48±0,36a
50	8,10±0,39a
500	6,49±1,06ab
1000	6,79±1,19ab
5000	4,14±0,49b
10000	5,75±0,94ab

Deney grubu sonucu 10 bireyden oluşan 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05), SH; Standart Hata.

Kontrol grubunda enzim aktivitesinin en yüksek seviyede olduğu görüldü. Enzim aktivitesinde 50 ppm'in etkili olmadığı, ancak 50 ppm üzerindeki dozlar enzim aktivitesinde düşüşe yol açtığı görüldü. En düşük SOD aktivitesi 5.000 ppm'de belirlendi. 500, 1.000, 10.000 ppm'lik dozlarda kontrol grubuna göre azalma görülse de (Şekil 3.2) anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 3.2. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün SOD aktivitesine etkisi (U/mg)

Deney grubu sonucu 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).

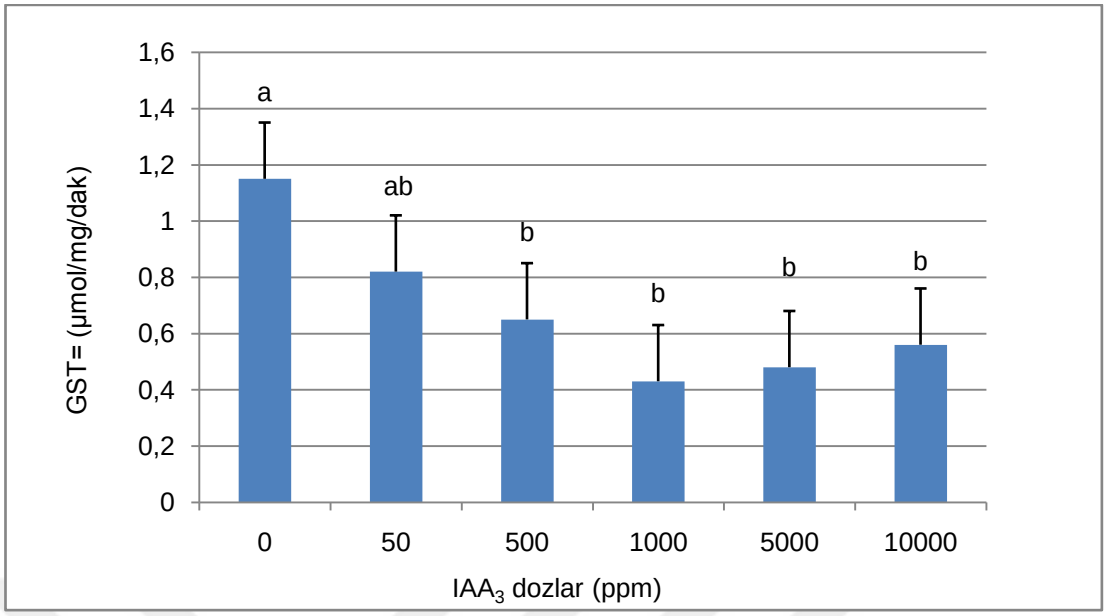
3.2. GST Aktivitesi

Farklı dozlarda IAA_3'ün *G. mellonella* larval hemolenfindeki GST aktivitesine etkisine ait istatistik sonuçlar Tablo 3.3'te verilmektedir. En düşük doz 50 ppm enzim aktivitesinde değişikliğe yol açmadı. Şekil 3.3'te de görüldüğü gibi 500 ppm'de enzim aktivitesinde yaklaşık 2 kat azalma olduğu belirlendi. Doz artışına bağlı olarak 500 ppm'lik dozda anlamlı fark tespit edildi. 500, 1.000, 5.000, 10.000 ppm'lik dozlar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamakla birlikte 50 ppm dışında tüm dozlar GST aktivitesinde düşüşe yol açtı.

Tablo 3.3. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün GST aktivitesine etkisi (µmol/mg/dak)

IAA_3 DOZ ppm	GST= µmol/mg/dak ORT±SH
Kontrol	1,15±0,10a
50	0,82±0,02ab
500	0,65±0,12b
1000	0,43±0,07b
5000	0,48±0,12b
10000	0,56±0,09b

Deney grubu sonucu 10 bireyden oluşan 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05), SH; Standart Hata.



Şekil 3.3. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün GST aktivitesine etkisi (µmol/mg/dak)

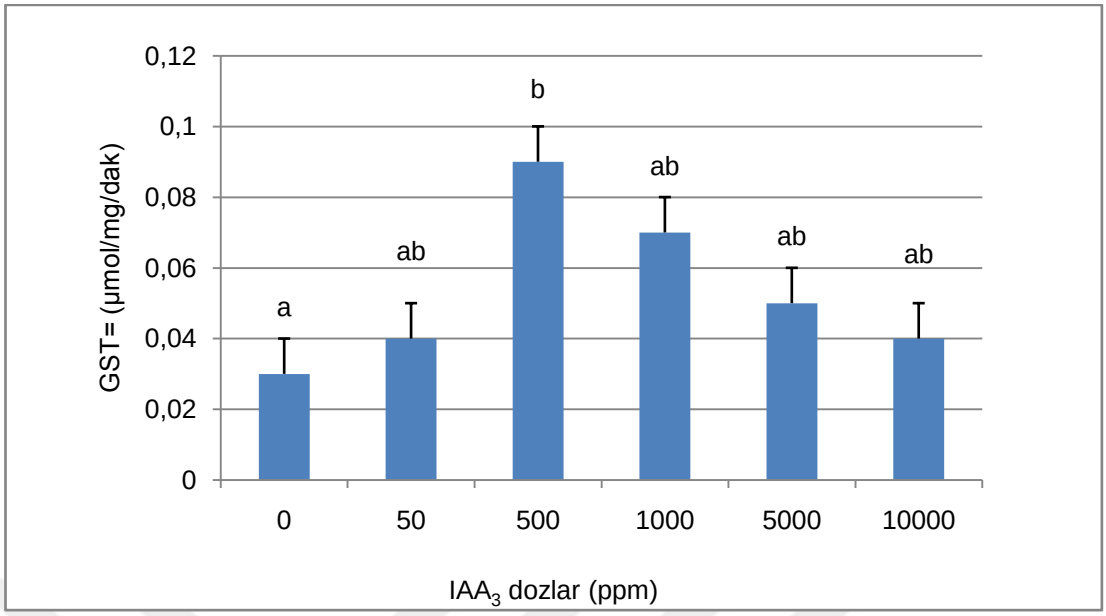
Deney grubu sonucu her biri 10 bireyden oluşan 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).

IAA_3'ün farklı dozlarına maruz kalan *P. turionella*'nın, larval hemolenfinde GST aktivitesine etkisine ait sonuçlar Tablo 3.4'te verilmektedir. Şekil 3.4'te de görüldüğü gibi en yüksek GST aktivitesi 500 ppm'de belirlendi. En düşük doz 50 ppm enzim aktivitesinde istatistiksel olarak değişikliğe neden olmadı. 500 ppm'e kadar enzim aktivitesinde artış görüldü ancak sonraki dozlarda enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla birlikte azalma meydana geldi. 50 ppm ile 1.000, 5.000, 10.000 ppm dozlar arasında anlamlı fark bulunmadı.

Tablo 3.4. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün GST aktivitesine etkisi (µmol/mg/dak)

IAA_3 DOZ ppm	GST= µmol/mg/dak ORT±SH
Kontrol	0,03±0,00a
50	0,04±0,00ab
500	0,09±0,02b
1000	0,07±0,02ab
5000	0,05±0,01ab
10000	0,04±0,01ab

Deney grubu sonucu 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05), SH; Standart Hata.



Şekil 3.4. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün GST aktivitesine etkisi (µmol/mg/dak)

Deney grubu sonucu 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).

3.3. KAT Aktivitesi

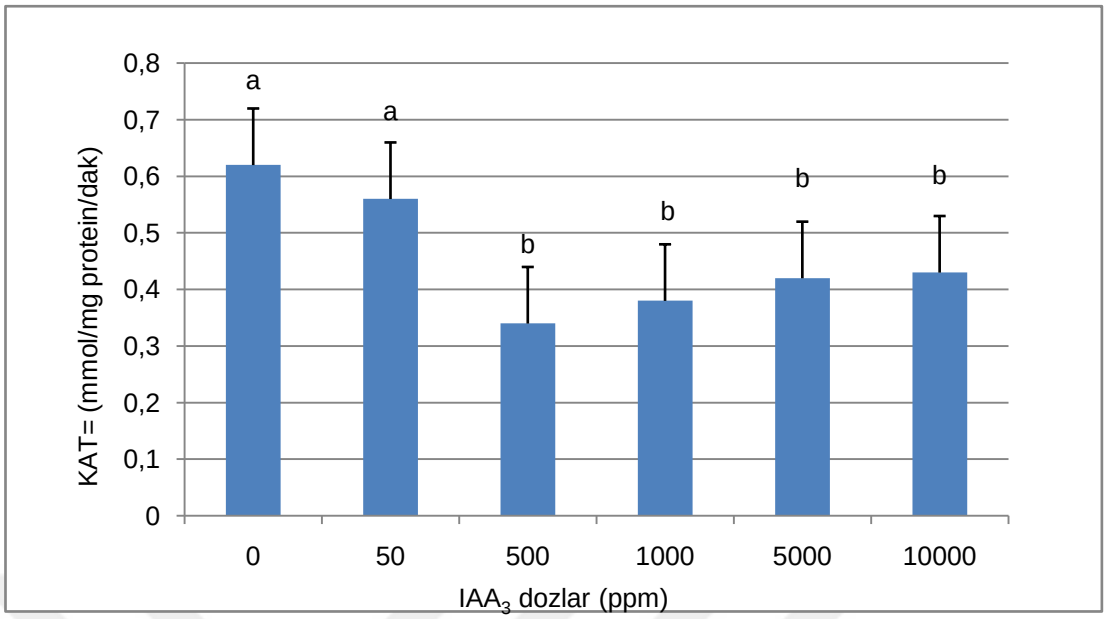
Farklı IAA_3 dozlarına maruz kalan *G. mellonella* larval hemolenfindeki KAT aktivitesine ait istatistiksel sonuçlar Tablo 3.5'te verilmektedir. Kontrol grubu ve en düşük doz 50 ppm IAA_3'e maruz kalan deney grubu arasında anlamlı fark bulunmadı.

Tablo 3.5. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün KAT aktivitesine etkisi (mmol/mg protein/dak)

IAA_3 DOZ ppm	KAT=mmol/dak/mg protein ORT±SH
Kontrol	0,62±0,04a
50	0,56±0,03a
500	0,34±0,02b
1000	0,38±0,02b
5000	0,42±0,02b
10000	0,43±0,02b

Deney grubu sonucu her biri10 bireyden oluşan 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05), SH; Standart Hata.

Şekil 3.5 'te de görüldüğü gibi 50 ppm dışında tüm dozlarda enzim aktivitesinde düşüş belirlendi. 500, 1.000, 5.000, 10.000 ppm'lik dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. 500 ppm ve daha yüksek dozlarda istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi.



Şekil 3.5. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün KAT aktivitesine etkisi (mmol/mg protein/dak)

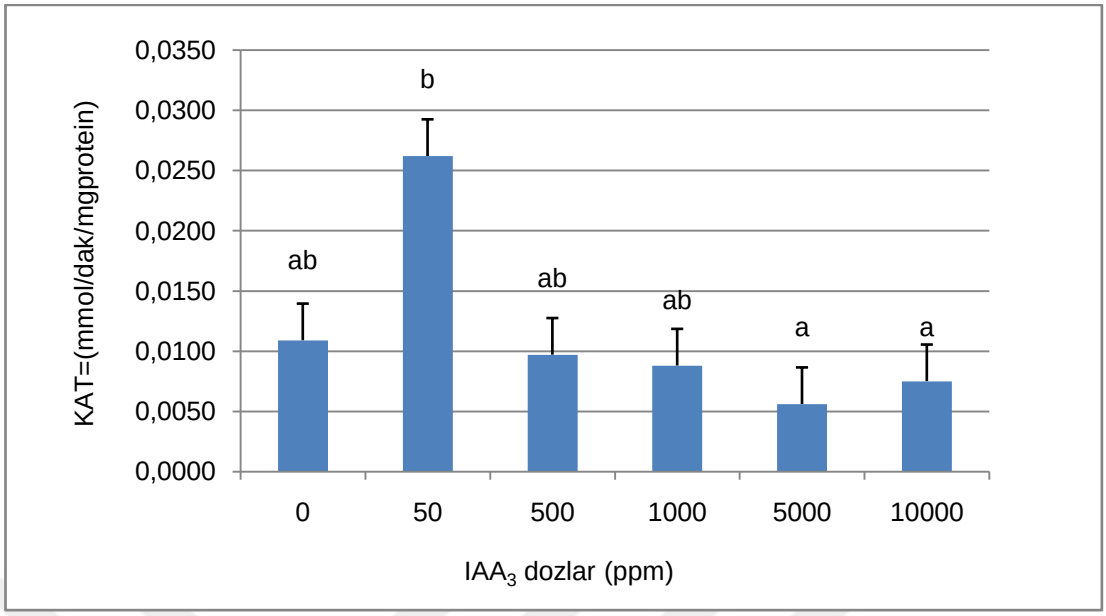
Deney grubu sonucu her biri 10 bireyden oluşan 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).

IAA_3'ün *P. turionella* larval hemolenfindeki KAT aktivitesine etkisine ait sonuçlar Tablo 3.6'da verilmektedir. 50 ppm'lik dozda enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre 2 kattan fazla artış görülse de anlamlı fark belirlenmedi. Şekil 3.6'da görüldüğü gibi 50 ppm dışındaki dozlarda enzim aktivitesi değişimi görülmedi. 50 ppm ile en yüksek dozlar 5.000 ve 10.000 ppm arasında anlamlı fark tespit edilmesine rağmen hiçbir doz kontrol grubuna göre anlamlı değişikliğe yol açmadı.

Tablo 3.6. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün KAT aktivitesine etkisi (mmol/mg protein/dak)

IAA_3 DOZ ppm	KAT=mmol/min/mg protein ORT±SH
Kontrol	0,0109±0,0027ab
50	0,0262±0,0076b
500	0,0097±0,0026ab
1000	0,0088±0,0047ab
5000	0,0056±0,0005a
10000	0,0075±0,0016a

Deney grubu sonucu 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05), SH; Standart Hata.



Şekil 3.6. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün KAT aktivitesine etkisi (mmol/mg protein/dak)

Deney grubu sonucu 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).

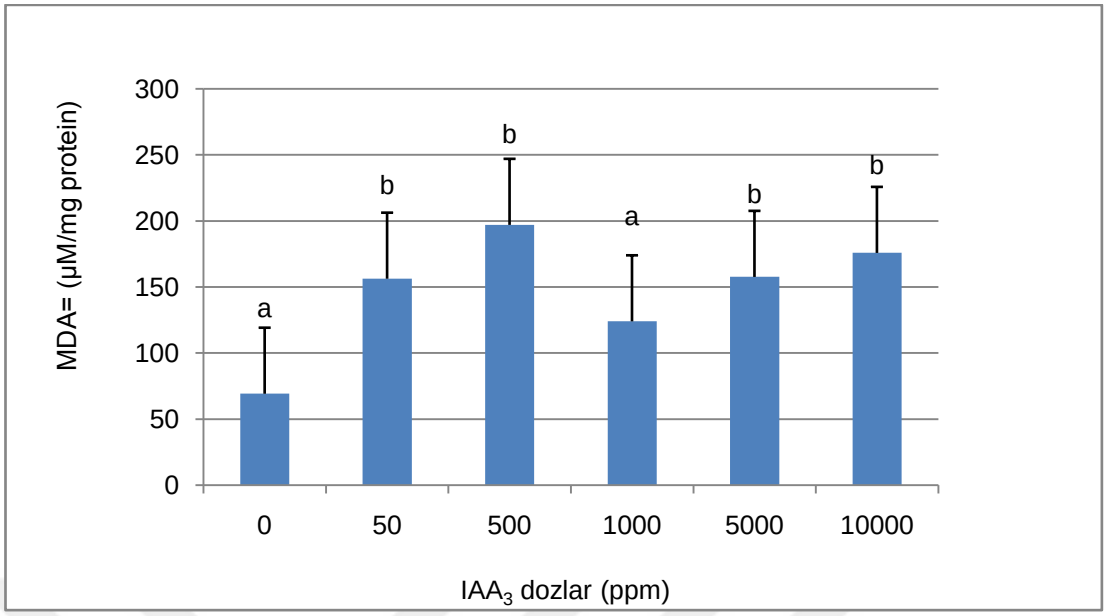
3.4. TBARS (MDA)

Farklı dozlarda besinsel IAA_3'ün *G. mellonella* larval hemolenfinde MDA oluşumuna etkisi Tablo 3.7'de verilmektedir. Elde edilen sonuçlarla oluşturulan Şekil 3.7'de de görüldüğü gibi en düşük MDA miktarı kontrol grubunda görüldü. 50 ppm'de MDA miktarında artış görüldü., en yüksek MDA miktarı ise 500 ppm'de belirlendi. 1.000 ppm dışındaki tüm dozlar MDA miktarında anlamlı değişikliklere neden oldu. 1.000 ppm dışındaki diğer dozlar arasında istatistiksel fark bulunmamaktadır. En önemli fark 500 ppm'de görüldü.

Tablo 3.7.*G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün MDA miktarına etkisi

IAA_3 DOZ ppm	MDA= µM/mg protein ORT±SH
Kontrol	69,22±17,81a
50	156,28±24,13b
500	197,03±20,05b
1000	124,02±27,52a
5000	157,65±27,02b
10000	175,81±37,01b

Deney grubu sonucu her biri 10 bireyden oluşan 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05), SH; Standart Hata.



Şekil 3.7. *G. mellonella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün MDA miktarına etkisi (µM/mg protein)

Deney grubu sonucu her biri 10 bireyden oluşan 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).

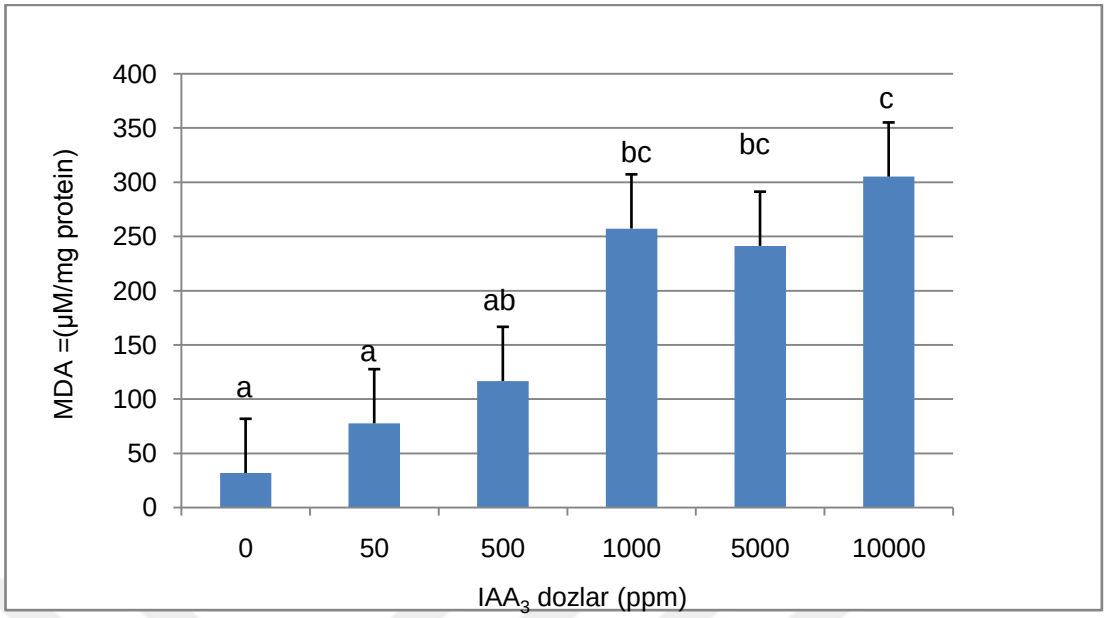
Farklı dozlarda IAA_3 uygulamasına konak aracılığıyla maruz kalan *P. turionella* larval hemolenfinde belirlenen MDA miktarları Tablo 3.8'de verilmektedir. MDA miktarında 50 ppm'in değişikliğe yol açmadığı görüldü. 500 ppm'de düşük doza oranla artış tespit edilse de anlamlı fark görülmedi. MDA miktarında 5.000 ppm'lik dozda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 4 kat artış, en yüksek MDA miktarı ise 10.000 ppm'lik doza maruz kalan larval hemolenfte görüldü.

Tablo 3.8. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün MDA miktarına etkisi

IAA_3 DOZ ppm	MDA= µM/mg protein ORT±SH
Kontrol	31,75±7,65a
50	77,54±11,03a
500	116,60±39,49ab
1000	257,26±53,01bc
5000	241,28±24,74bc
10000	305,15±30,86c

Deney grubu sonucu bireylerden oluşan 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05), SH; Standart Hata.

En önemli fark en yüksek dozda görüldü. Şekil 3.8'de de görüldüğü gibi larval hemolenfteki MDA miktarının yüksek dozlarda anlamlı artış gösterdiği belirlendi.



Şekil 3.8. *P. turionella* larvasında farklı dozlarda IAA_3'ün MDA miktarına etkisi (µM/mg protein)

Deney grubu sonucu 4 tekrarın ortalamasına aittir. Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).

4. TARTIŞMA

Tarımsal verimlilik ve zararlılara dayanıklılığın arttırılmasında bitki gelişim düzenleyicileri olarak bilinen kimyasallar yaygın olarak kullanılmaktadır. Pestisitlerin bazıları çok az miktarda bile canlı bünyesinde önemli boyutta zararlı etkilere neden olabilmektedir. Omurgalılara oranla kısa yaşam süresine sahip olmalarına rağmen böceklerin, büyüme ve gelişmeleri, üreme yetenekleri, hayatta kalabilmeleri, yetişkin fazdaki dayanıklılıkları, prooksidanların ve reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stresten olumsuz etkilenmektedir (Ahmad, 1992). *Drosophila melanogaster*' in model organizma olarak kullanıldığı yaşlanma üzerine yapılan çalışmalar ile oksidatif stresin böceklerin yaşam döngüsü üzerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Orr ve Sohal, 1994).

Böceklerde bağışıklık sisteminin önemli bir unsuru olan hücresel bağışıklık tepkileri hemolenfte bulunan hemositler tarafından gerçekleştirilmektedir (Ashhurst ve Richards, 1964). Bu yüzden çalışmamızda pestisit olarak kabul edilen BGD IAA_3 'e karşı oluşturulacak bağışıklık cevabını araştırmak amacıyla, kovan zararlısı *G. mellonella* ve parazitoidi *P. turionellae*' nın, larval hemolenflerindeki antioksidan enzimlerin aktivitelerine etkileri araştırıldı. Bunun yanısıra oksidatif stres oluşumunun göstergesi olan lipid peroksidasyonunun belirlenmesi amacıyla MDA miktarındaki değişimler tespit edildi. Deney grupları yetiştirilirken, *G. mellonellae* bitki gelişim düzenleyicisini beslenme yoluyla direkt aldı ancak *P. turionellae* larvaları parazitlenen dozlu konak aracılığıyla BGD'ye maruz kaldı. Farklı dozlardaki IAA_3 uygulamasının larval hemolenflerinde antioksidan enzim aktivitelerinde ve lipid peroksidasyonunda değişikliklere sebep olduğu görüldü.

G. mellonella ve diğer Lepidopter türler ile ilgili yapılan çalışmalarda çeşitli insektisitlerin ve doğal bitkisel metabolitlerin SOD aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır (Hyršl ve diğ, 2007; Siliğ ve diğ, 2000; Ahmad,1995; Dere ve diğ., 2015). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre besinsel borik asidin *G mellonella*' da düşük dozlarda hemolenfte SOD aktivitesini arttırdığı ancak daha yüksek dozlarda SOD aktivitesinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Besinsel borik asit uygulaması, pupal vücut yağında SOD aktivitesinde artışa neden olurken, hemolenfte artışa neden olmamıştır (Hyrsl vediğ, 2007). Diklon dieti ile beslenmiş

(Lepidoptera) *Spodoptera eridania* ile yapılan çalışmada kontrol grubuna göre düşük dozlarda (%0,01) SOD aktivitesi %18,2 artış göstermiştir. Doz arttığında (%0,25) belirgin bir aktivite artışı meydana gelmiştir (Ahmad, 1995). Farklı dozlarda (0,5,1,1.5,2, ve 3 µg/larva) Azadiraktin *(*AZA) ile G. mellonella üzerinde yapılan bir çalışmada ise 3 µg/larva dozu hariç tüm dozlarda, doz verildikten 24 ve 72 saat sonra SOD aktivitesinde azalma belirlenmiştir (Dere ve diğ., 2015). Ayrıca IAA_3 gibi bir BGD olan GA_3'ün konak *G. mellonella*'nın besinine farklı dozlarda verilmesi ile düşük dozlarda (50–1.000 ppm) larval hemolenfteki SOD enzim aktivitesinin arttığı, yüksek dozlarda ise değişimin olmadığı Altuntaş (2015) tarafından belirlenmiştir. Çalışmamızda da AZA ve GA_3 etkisine benzer olarak, IAA_3 dozlarına maruz kalan konak larval hemolenfteki SOD enzim aktivitesinde en yüksek değer kontrol grubu ve en düşük dozda görüldü. Buna karşın daha yüksek dozlarda SOD aktivitesinin azaldığı belirlendi. Elde ettiğimiz bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmaları destekler nitelikte olup konağa uygulanan ksenobiyotiğin çeşidine göre SOD aktivitesinin artabileceğine ya da azalabileceğine işaret etmektedir. SOD aktivitesinin süperoksit radikalleri tarafından indüklendiği, GA_3 ile yapılan daha önceki çalışmayla uyumlu olarak larvayı düşük IAA_3 dozlarına bağlı meydana gelen strese karşı savunabildiği görüldü.

İnsektisit maruziyetine bağlı oluşan toksisiteyi ortadan kaldırmak için çoğu böcekte GST aktivitesinin yükseldiği saptanmıştır (Vontas ve diğ., 2001). AZA'nın *G. mellonella*'ya ağızdan enjekte edildiği çalışmada, besleme işleminden 24 saat sonra hemolenfteki GST aktivitesinin, kontrol grubuna göre, tüm dozlarda arttığı, artışın özellikle 0,5 µg/larva ve 1 µg/larva AZA dozlarında yüksek olduğu bulunmuştur. Zamana bağlı olarak hem kontrol gruplarında hem de AZA verilen gruplardaki GST aktivitesi 72. saatte, 24. saate göre önemli bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir (Dere ve diğ., 2015). Başka bir çalışmada ise borik asitli dietle beslenen *G. mellonella'* da, borik asidin, larval ya da pupal GST aktivitesini etkilemediği belirlenmiştir (Hyršl ve diğ., 2007). GA_3 ile *G. mellonella* üzerinde yapılan bir çalışmada düşük dozlarda GST aktivitesinde artış görülmüştür (Altuntaş, 2015). Diklon dietinin, *S. eridania* üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, düşük dozda (%0,01) verilen diklon, GST aktivitesine etki etmediği, yüksek dozda ise (%0,25), GST aktivitesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3 katına çıktığı belirlenmiştir (Ahmad, 1995). *G mellonella'* da Ksantotoksinin (XA) GST aktivitesine etkilerinin incelendiği bir çalışmada düşük doz ile kontrol grubu arasında bir fark görülmemiş, ancak yüksek dozlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GST aktivitesinde

yaklaşık 2 kat azalma tespit edilmiştir (Erdem ve diğ., 2015). Çalışmamızda XA ile yapılan çalışmaya benzer olarak doz arttıkça GST aktivitesinde azalma görüldü ve yüksek dozlar arasında aktivitede belirgin bir değişiklik görülmedi. Diğer yandan çalışmamızda uyguladığımız methoda göre, larvalar uzun süre IAA_3' e maruz kalmaktadır. AZA ile yapılan çalışmada da aynı şekilde zaman geçtikçe GST aktivitesinde düşüş belirlenmesi açısından çalışmamız ile uyum göstermektedir. GST aktivitesinin yüksek dozlarda düşmesinde IAA_3'ün hücresel savunma mekanizmasının kapasitesini aşmasının sebep olduğu ya da yüksek dozların GST inhibisyonuna neden olduğu düşünülmektedir.

G. mellonella larvalarında, borik asidin yüksek dozları, larval hemolenfte, belirgin şekilde KAT aktivitesinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur (Hyršl ve diğ., 2007). AZA ile *G.mellonella* larvalarının beslenme işleminden 24. saat sonra 1, 1,5 ve 2 µg/larva dozlarında KAT aktivitesinde azalma görülmüş ancak, 72 saat sonra, KAT aktivitesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 0,5 µg/larva dozu dışında tüm dozlarda artış belirlenmiştir (Dere ve diğ., 2015). *G. mellonella'* ya farklı dozlarda verilen BGD GA_3'ün yüksek dozlarda, kontrol grubuna göre belirgin şekilde KAT aktivitesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. 2.000 ve 5.000 ppm dozlardaki belirgin artışlar dışında dozlu ve dozsuz gruplar karşılaştırıldığında KAT aktivitesindeki artışın dozla bağlantılı olmadığı sonucuna varılmıştır (Altuntaş, 2015). Diklonun *S. eridania* üzerinde antioksidan enzimlere etkisinin araştırıldığı çalışmada, düşük dozda (%0,01) verilen diklonun KAT aktivitesine etki etmediği, ancak yüksek dozda (%0,25) KAT aktivitesini 2 kat arttırdığı belirlenmiştir (Ahmad, 1995). Çalışmamızda; *G. mellonellla*'da en yüksek KAT aktivitesi kontrol grubunda belirlendi. En düşük doz aktivitede bir değişikliğe neden olmadı. Daha yüksek dozlar; enzim aktivitesinde düşüşe yol açtı. Borik asitle yapılan çalışma ile benzerlik göstererek doz artışına bağlı olarak enzim aktivitesinde düşüşün meydana geldiği belirlendi. KAT aktivitesinin H_2O_2 seviyesi düştüğünde inhibe olabildiği rapor edilmiştir (Dere, 2015). KAT aktivitesinin artışı SOD aktivitesinin artışı ile doğrudan bağlantılıdır. SOD aktivitesi arttığında H_2O_2 miktarında artış meydana gelmektedir. Bu da H_2O_2'nin ortadan kaldırılması için KAT aktivitesinin artmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda SOD aktivitesinin artış gösterdiği dozlarda KAT aktivitesinin de artış gösterdiği belirlenerek bu durum doğrulandı. Aynı şekilde SOD aktivitesinin azaldığı dozlarda KAT aktivitesinde de azalma görüldü.

Organofosforlu insektisitlerin veya çevresel kirleticilerin, oksidatif strese ve lipid peroksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir (İçen ve diğ., 2005). Bitkisel

allelokimyasal XA'nın *G. mellonella* üzerinde antioksidan enzimlerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, en düşük dozda (0,001%), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA miktarında 6 kat artış olduğu belirlenmiştir. Diğer yüksek dozların (0,005%-0,1%) verildiği gruplarda ise, kontrol grubuna göre MDA miktarında 3 kat artış bulunmuştur (Erdem ve diğ., 2015). Borik asidin oluşturduğu oksidatif stresin *G. mellonella*' da araştırıldığı çalışmada, en yüksek MDA miktarı,en düşük doz 156 ppm'de belirlenmiştir. Daha yüksek dozlarda ise MDA miktarında kontrol grubuna göre azalma olduğu tespit edilmiştir (Hyršl ve diğ., 2007). AZA ile *G. mellonella* üzerinde yapılan bir çalışmada besleme işleminden 24 saat sonra 0,5, 2 µg/larva ve 3 µg/larva dozlarında; 72 saat sonra MDA miktarında, 1,5, 2 ve 3 µg/larva dozlarında kontrol grubuna göre artış tespit edilmiştir (Dere ve diğ., 2015). Lepidoptera familyasından *S. eridania'*nın dietsel diklona maruz bırakıldığı bir çalışmada, düşük doz (%0,01), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA miktarında anlamlı bir artış görülmemiş, ancak yüksek dozda (%0,25), kontrol grubuna göre lipit peroksidasyonunda belirgin bir artış (%29,7) gözlemlenmiştir (Ahmad ve diğ., 1995). IAA_3 ile yaptğımız çalışmamızda borik asit ve XA etkilerine benzer olarak, en düşük MDA miktarı kontrol grubunda belirlendi. Doz artışı MDA miktarının artmasına neden oldu. Aynı zamanda diklon etkisine benzer şekilde en yüksek doz ile kontrol grubu arasında anlamlı fark belirlendi. Farklı insektisit uygulamalarının doz artışına bağlı olarak canlıda lipid peroksidasyonunda artışa neden olduğu görüldü.

Önceden parazitoidler üzerinde bitkisel kaynaklı insektisitlerin yaşam döngüsüne etkileri araştırılmıştır (Tunca ve diğ, 2014; Hsieh ve diğ., 1986). Bu insektisitlerden, piretrum ve AZA'nın parazitoid *Chelonus oculator* (Hymenoptera) üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada, erkek ve dişi bireylerde gelişim sürelerinin uzadığı tespit edilmiştir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında AZA'nın LC_{25} ve LC_{50} dozlarında yaşama sürelerinde azalma olduğu belirlenmiştir. Yetişkin bireylerin pupadan çıkma oranını, kontrol grubuna göre düşürdüğü, LC_{50} dozunun ise parazitoidin gelişimini tamamen engellediği tespit edilmiştir (Tunca ve diğ, 2014). *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera) üzerinde insektistlerin etkisinin araştırıldığı farklı bir çalışmada ise permetrin ve asefatın parazitoitte hayatta kalma oranını düşürdüğü, malatyon ve diazionun ise %89 oranında parazitoidlerin gelişimini önlediği tespit edilmiştir (Hsiehve diğ., 1986).

P. turionellae gibi endoparazitoidler üzerinde insektisitlerin antioksidan enzim aktivitelerine etkilerinin ve lipit peroksidasyonunun araştırıldığı az sayıda çalışma vardır (Kayış ve diğ., 2012; Büyükgüzel, 2006). *P. turionellae* üzerinde yapılan bir

çalışmada direk diazinona maruz kalan parazitoidlerde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında özellikle yüksek konsantrasyonlarda (0,50 ve 0,75 ppm) SOD aktivitesinde önemli ölçüde artış olduğu belirlenmiştir (Kayış ve diğ., 2012). Malatyon içeren dietle beslenen *G. mellonella* ve dozlu pupaları parazitleyen *P. turionellae*'da kontrol ve dozlu gruplar karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde istatistiksel olarak belirgin fark tespit edilmiştir. En yüksek SOD aktivitesi en düşük dozda belirlenmiştir. Malatyonun düşük konsantrasyonlarında (0,01-1 ppm) SOD aktivitesinde artış görülmüştür. Yüksek dozlarda ise SOD aktivitesinin kontrol gruplarına göre belirgin şekilde düşük olduğu bulunmuştur (Büyükgüzel, 2006). Çalışmamızda *P. turionellae*'da en yüksek SOD aktivitesi en düşük dozda görüldü. Malatyonla yapılan çalışmaya benzerlik göstererek çalışmamızda yüksek konsantrasyonlarda SOD aktivitesinde düşük doz hariç tüm dozlarda düşüş belirlendi. *P. turionella'*nın IAA_3'e indirek olarak maruz kalmasının, artan insektisit dozlarının konakta olduğu gibi parazitoitte de SOD aktivitesinin inhibisyonuna neden olabileceği görüldü.

P. turinonella ile aynı takıma ait arılar üzerinde çeşitli insektisit çalışmaları yapılmıştır (Li ve diğ., 2017; Mohammed ve diğ., 2015; Staron ve diğ., 2017). Bu çalışmalardan birinde *Apis cerena* ve *Apis mellifera* (Hymenoptera) üzerinde insektisit imidakloprid ve klotianidinin GST aktivitesine etkileri incelenmiştir. *A. mellifera'*da imidacloprid maruziyetinden sonra ilerleyen zamanda aktivitede artış görülse de, 48 saat sonra GST aktivitesi inhibisyona uğramıştır. *A. cerena'* da ise GST aktivitesinde değişim gözlemlenmemiştir. Aynı cins olmalarına rağmen *A. cerena*'da imidakloprid maruziyetinin GST aktivitesinin artışına yol açacak şekilde oksidatif strese neden olmadığı sonucuna varılmıştır. Klotianidin maruziyetinin her iki arıda da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında zamanla GST aktivitesinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (Li ve diğ., 2017). Dinotefuranın oral yolla *A. mellifera'* ya verildiği başka bir çalışmada uygulamadan 24 saat sonra düşük dozlarda GST aktivitesinde artışa neden olduğu, ancak yüksek dozların ölüme yol açtığı belirlenmiştir (Mohammed ve diğ., 2015). Bulgularımıza göre çalışmamızda doz artışına bağlı olarak GST aktivitesinde artış belirlenmiş olması imidakloprid maruziyeti ile benzer sonuç göstermektedir. Besin yoluyla farklı bir insektisit formetanat alan bal arılarında tüm konsantrasyonlarda GST aktivitesinde artış belirlenmiştir (Staron ve diğ., 2017). Çalışmamızda benzer şekilde *P. turionella* larvasında konaktan farklı olarak yüksek dozlarda IAA_3 bitki gelişim düzenleyicisinin GST aktivitesinde artışa neden olduğu görüldü.

Formetanatın en düşük dozuna maruz kalan *A. mellifera* larvalarında KAT aktivitesinde azalma belirlenmiştir. Fakat diğer dozlarda KAT aktivitesinde artış tespit edilmiştir. Tiyobarbitürik reaktif miktarlarının artışı ile bal arılarının larvalarında oksidatif stresin meydana geldiği sonucuna varılmıştır (Staron ve diğ., 2017). Diazinon ile yapılan çalışmada *P. turionellae*'da tüm dozlarda KAT aktivitesinde artışların düzensiz olduğu, fakat KAT aktivitesinin hiçbir konsantrasyonda kontrol seviyesinin altına düşmediği belirlenmiştir (Kayış ve diğ., 2012). Bu çalışmadan farklı olarak elde ettiğimiz sonuçlara göre KAT aktivitesi konakta olduğu gibi doza bağlı artış göstermedi. En yüksek aktivite en düşük dozda görüldü. Ancak yüksek dozlar anlamlı farka neden olmadı. *G. mellonella* ve *P. turionella* üzerinde yapılan bir çalışmada düşük malatyon dozları 0,01 - 1 ppm *G. mellonella*'da MDA miktarında artışa neden olduğu fakat ergin *P. turionella*'da MDA miktarına etki etmediği belirlenmiştir. 1 ve 10 ppm dozları ise hem konak hem de parazitoitte MDA miktarında artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Büyükgüzel, 2006). Sonuçlarımız MDA miktarının hem konak hem de parazitoitte doz artışına bağlı olarak artması açısından malatyon ile yapılan çalışma ile uyum göstermektedir. SOD aktivitesinin doz artışına bağlı olarak azalma göstermesi, SOD'a bağımlı olarak KAT aktivitesinde azalma görülebilmesi ve görev yapamaması sonucu lipid peroksidasyonunun gerçekleştiği düşünülmektedir.

Böceklerin çeşitli yabancı bileşiklere karşı direnç geliştirmesinde ve hücresel membranların oksidatif yıkımlara karşı korunmasını sağlamada GST enzimi önemli bir işleve sahiptir (Dere, 2015). SOD aktivitesi inhibe olduğunda veya azaldığında, radikaller uzaklaştırılamaz ve stres koşulları altında hücrelerdeki lipidlerin peroksidasyonu ve dolayısıyla MDA seviyesinde artış meydana gelmektedir (Ahmad ve Pardini, 1990). Bu bilgileri destekleyecek şekilde, *G mellonella*'da, larval hemolenfte MDA miktarı tüm dozlarda artış gösterirken, kontrol grubu dışındaki tüm dozlarda GST aktivitesinde düşüş meydana gelmiştir. Düşük IAA_3 dozlarının *G mellonella*'da SOD ve CAT aktivitesinde, hormotik etki yarattığını düşünmekteyiz. Hormotik etkisi, potansiyel olarak toksik maddelerin düşük dozlarının tamir mekanizmasını indüklenmesi, ancak; daha yüksek dozların savunma cevabını elimine etmesidir (Calabrase ve Baldwin, 2002). Buna göre düşük dozlar bağışıklık sistemini tetikleyebilir ancak; bu yanıtların yüksek dozlarda elimine edilmesi muhtemeldir.

P. turionella'da ise GST aktivitesinin belirgin bir artış gösterdiği dozda bile IAA_3'ün neden olduğu lipit peroksidasyonuna engel olamadı. Hem konak hem parazitoit

canlıda aynı şekilde doz arttıkça SOD enzimi aktivitesinde azalma belirlendi. Tüm bu değişimler her iki canlının da oksidatif strese girdiğinin göstergesidir. Yüksek IAA_3 dozlarının, onarım kapasitesinin aşılmasına ve fizyolojik dirençliliğin sağlanamamasına neden olabileceği düşünülmektedir. IAA_3 gibi BGD'lerin toksikolojik etkilerinin çeşitliliği, dozaja ve hücrelerde meydana gelen düşük seviyede stres koşullarında ortaya çıkan fizyolojik tamir mekanizmalarına bağlıdır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bal arıları tarafından üretilen ürünler, beslenme ve sağlık dolayısıyla da ekonomik açıdan oldukça önemli bir yere sahip olduğu gibi bitkilerde tozlaşmayı sağladığından ekolojik açıdan büyük önem taşıdığı bilinmektedir. Bu nedenle, bal üreten arıların neslinin devamlılığının önemi büyüktür. Bu durum arıcılık sektöründe büyük kayıplara neden olan petek zararlısı *G. mellonella* ile çalışmamız için bir sebep oluşturmuştur.

Hymenoptera takımının büyük bir kısmını oluşturan parazitoit arılar, zararlı böcek populasyonlarının kontrolünde önemli rol oynarlar. Zararlı böcek türlerinin parazitoitlerle biyolojik mücadelesinde konak-parazitoit ilişkisinin bilinmesi yapılacak mücadelenin başarısı için önemli bir unsurdur (Beckage ve Gelman, 2004). Çalışmamızda konak ve parazitoiti bir arada kullanmamız pestisitlerin bilinçli bir şekilde kullanımı ve BGD'lerin konak-parazitoit ilişkisinde pestisitlerin aktarımının incelenmesi açısından önem taşımaktadır.

Böceklerin zararlı reaktif oksijen türlerinden korunma mekanizmasında görev alan enzimler diğer hayvanlarla benzerlik göstermektedir (Ahmad, 1992; Felton ve Summers, 1995). SOD, KAT, GST, Glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimler daha önce böceklerde belirlenmiştir. Bu antioksidan sistemlerin anlaşılması böcekler ve onların konakları arasındaki ekolojik ilişkiyi daha iyi anlamamızı sağlayabilmektedir (Felton ve Summers, 1995).

Farklı dozlardaki IAA_3 uygulamasına bağlı olarak bazı antioksidan enzim aktivitelerinde değişiklikler tespit edildi. Konak besininde IAA_3 bulunması hücresel immün yanıtta değişikliklere neden olabileceği dolayısıyla *G. mellonella*' nın oksidatif hasar almamak için savunma sistemini harekete geçirdiği söylenebilir. Antioksidan enzim aktivitelerinde ve MDA miktarında doza bağlı olarak gözlemlediğimiz değişimler, besinsel IAA_3'ün yüksek dozlarına yaklaştıkça larval dirençliliği azalttığını ve lipit peroksidasyonunun yükseldiğini yani oksidatif hasarı arttırdığını göstermektedir. Her iki canlıda da belirli dozlarda oksidatif stres meydana geldiğinden, yalnızca bitki gelişim düzenleycisine doğrudan maruz kalan konakta değil, dolaylı yoldan maddeyi alan parazitoitte de bitki gelişim düzenleyicisinin

etkilerinin görülebileceği sonucu çıkarıldı. Bulgularımızın başka canlılar üzerinde yapılan deney sonuçları ile uyum göstermesi sayesinde canlılar arasında bağ kurulması sağlanabilmektedir. Aynı şekilde *G. mellonella'*nın ve parazitoidi *P. turionellae*'nın omurgalılarda olduğu gibi savunma sistemine sahip olduğu ve bu çalışmalar için kullanılabileceği anlaşılmıştır. Model organizma olarak böcek antioksidan savunma sisteminin çalışılması, omurgasız ve omurgalı hayvanlar için ortak olan savunma tepkilerinin evriminin ortaya konması ile ilgili çalışmalara da yarar sağlayacağını düşünmekteyiz. Diğer yandan parazitoid canlının parazitleme yapması sonucu her zaman arının elde edilememesi, dozlu konak pupalarının hemolenfini her an yemesi ihtimali *P. turionellae* ile çalışmanın kolay olmadığını, ciddi bir özen gerektirdiğini göstermiştir.

Bu çalışma çeşitli dozlarda IAA_3'e maruz kalan zararlı *G. mellonella* ve doğal düşmanı *P. turionella* parazitoidi hemolenfinde antioksidan enzimlerin cevabındaki değişiklikleri inceleyen ilk çalışma olması açısından önem taşımaktadır. Elde ettiğimiz verilere göre IAA_3'in artan dozuna bağlı olarak lipit peroksidasyonunun yükselerek oksidatif stresin meydana geldiğini, diğer enzim aktivitelerinde meydana gelen azalma ise toleransın azaldığını göstermektedir. Sonuçlarımız oksidatif stres sonucu antioksidan enzim aktivitesinin artmak zorunda olmadığını, stres altında enzim aktivitelerinde azalma meydana gelebileceği görüşünü daha önceki çalışmalarla (Cheung ve diğ., 2001; Dere ve diğ., 2015) birlikte desteklemektedir. Aynı zamanda IAA_3'in birikmesiyle başa çıkabilmek için önce immün savunmanın artırıldığını ancak, kimyasal stres koşullarının devam etmesine bağlı olarak ya da belirli bir dozdan sonra enzim aktivitesinde değişiklik gözlemlenememesinde, onarım mekanizmalarının etkilenebileceği, bir süre sonra larval savunmanın zayıflayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

IAA_3'ün model organizmamız olan büyük balmumu güvesi *G. mellonella*'nın zararlı evresi yani larva dönemi üzerinde biyokimyasal açıdan etkili olduğu çalışmamızda görülmüştür. Fakat elde edilen sonuçlar, IAA_3 uygulamasının hayata geçirilmesi adına net bir öneride bulunmak için yetersizdir. Enzim aktivitelerindeki değişimler bu canlılarda belirgin bir ölüm oranına neden olmadığından mücadele açısından kullanılabilir şeklinde bir öneri yapılamamaktadır. Gözlemlendiği üzere bitki gelişim düzenleyicisini besin yoluyla almış konak pupaları üzerinde parazitoid organizma herhangi bir tercihte bulunmamıştır. Hatta kullanılan arıların IAA_3 ile beslenmiş larvaların hemolenflerini aynı şekilde yeme durumu zorluklara yol açmıştır. Bu çalışma aynı zamanda konak parazitoit ilişkilerinin bozulmasına neden olabilecek

unsurların ortaya çıkarılmasında önem taşımaktadır. Bu etkilerin bilinmesi, organizma düzeyinde olduğu kadar ekosistemde yer alan bu kimyasalların toksikolojik etkilerinin olup olmadığı hakkındaki sorulara cevap olacaktır. Elde edilen verilerin biyolojik kontrol ve ekolojik denge ile ilgili çalışmalara da faydalı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamızın sonuçları ile böcekler kadar doğrudan ve dolaylı olarak IAA_3'e maruz kalan hayvan ve insan sağlığı üzerinde yapabileceği etkilerin araştırılmasında da öncül olacaktır.

KAYNAKLAR

Agrawal D., Sultana P., Gupta G. S. D., Oxidative Damage and Changes in the Glutathione Redox System in Erythrocytes From Rats Treated With Hexachlorocyclohexane, *Food and Chemical Toxicology*, 1991, **29**(*7*), 459-462.

Ahmad S., Pardini R. S. Mechanisms for Regulating Oxygen Toxicity in Phytophagous Insects, *Free Radical Biology and Medicine*, 1990*,* **8**(4), 401-413.

Ahmad S., Duval D. L., Weinhold, L. C., Pardini, R. S., Cabbage Looper Antioxidant Enzymes: Tissue Specificity, *Insect Biochemistry*, 1991, **21**(5), 563-572.

Ahmad S., Biochemical Defence of Pro-Oxidant Plant Allelochemicals by Herbivorous Insects, *Biochemical Systematics and Ecology,* 1992, **20**(4), 269-296.

Ahmad S., Zaman K., MacGill R. S., Batcabe J. P., Pardini R. S., Dichlone-Induced Oxidative Stress in a Model Insect Species, *Spodoptera eridania*, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1995, **29**(4), 442-448.

Algül B. E., Tekintaş F. E., Günver Dalkılıç, G., Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Kullanımı ve İçsel Hormonların Biyosentezini Arttırıcı Uygulamalar, *Adnan Menderes Üniversitesi Tarım Fakültesi Dergisi*, 2016, **13**(2), 87-95.

Almeida M. G., Fanini F., Davino S. C., Aznar A. E., Koch O. R., Barros S. D. M., Pro-and Anti-Oxidant Parameters in Rat Liver After Short Term Exposure to Hexachlorobenzene, *Human and Experimental Toxicology*, 1997, **16**(5), 257-261.

Altuntaş H., Gibbberellik Asit GA_3'in Konak *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ve Parazitoit *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Hemolenf Kimyası ve Hemositlerine Etkisi, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2011, 287102.

Altuntaş H., Kiliç A. Y., Uçkan F., Ergin E*,* Effects of Gibberellic Acid on Hemocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), *Environmental Entomology*, 2012, **41**(3), 688-696.

Altuntaş H., Determination of Gibberellic Acid (GA_3) Induced Oxidative Stress in a Model Organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), *Environmental Entomology*, 2015, **44**(1), 100-105.

Andow D. A., Ragsdale D. W., Nyvall R. F., *Ecological Interactions,and Biological Control*, 1st edition, Westview Press, Colorado, 334, 1997.

Asgari S., Schmidt O., Passive Protection of Eggs From the Parasitoid, *Cotesia rubecula*, in the Host, *Pieris rapae*, *Journal of Insect Physiology*, 1994, **40**(9), 789-795.

Ashhurst D. E., Richards A. G., Some Histochemical Observations on the Blood Cells of the Wax Moth, *Galleria mellonella* L., *Journal of Morphology*, 1964, **114**(2), 247-253.

Atmaca S., Trifluralinin Sıçan Karaciğer ve Duodenumu Üzerine Etkisinin Biyokimyasal ve Histolojik İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2010, 266996.

Awad T. M., Taha F. A., The Effect of Some Plant Growth Inhibitors on the Developmental Stages of *Spodoptera littoralis* Boisd, *Journal of Applied Entomology*, 1976, **80**(1-4), 306-310.

Banerjee B. D., Seth V., Ahmed R. S., Pesticide-Induced Oxidative Stress: Perspective and Trends, *Reviews on Environmental Health*, 2001, **16**(1), 1-40.

Banerjee B. D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha S. T., Chakraborty A. K., Biochemical Effects of Some Pesticides on Lipid Peroxidation and Free-Radical Scavengers, *Toxicology Letters*, 1999, **107**(1-3), 33-47.

Beckage N. E.,Gelman D. B., Wasp Parasitoid Disruption of Host Development: Implications for New Biologically Based Strategies for Insect Control, *Annual Reviews in Entomology*, 2004, **49**(1), 299-330.

Benov L., Fridovich I., Growth in Iron-Enriched Medium Partially Compensates *Escherichia coli* for the Lack of Manganese and Iron Superoxide Dismutase, *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**(17), 10313-10316.

Berlett B. S., Chock P. B., Yim M. B., Stadtman E. R., Manganese (II) Catalyzes the Bicarbonate-Dependent Oxidation of Amino Acids by Hydrogen Peroxide and the Amino Acid-Facilitated Dismutation of Hydrogen Peroxide, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, **87**(1), 389-393.

Birben E., Şahiner U. M., Saçkesen C., Erzurum S., Kalaycı O., Oxidative Stress and Antioxidant Defense, *World Allergy Organization Journal*, 2012, **5**(1), 9.

Blakesley D., Weston G. D., 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), 1-12.

Bradford M. M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(1-2), 248-254.

Büyükuslu N., Yiğitbaşı T., Reaktif Oksijen Türleri ve Obezitede Oksidatif Stres, *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 2015, **5**(3), 197.

Cadenas E., Biochemistry of Oxygen Toxicity, *Annual Review of Biochemistry*, 1989, **58**(1), 79-110.

Calabrase E. J., Baldwin L. A., Defining Hormesis, *Human Experimental Toxicolology*, 2002, **21**(2), 91-97.

Chaudière J., Ferrari-Iliou R., Intracellular Antioxidants: From Chemical to Biochemical Mechanisms, *Food and Chemical Toxicology*, 1999, **37**(9-10), 949-962.

Cheung C. C. C., Zheng G. J., Li A. M., Richardson B. J., Lam, P. K. S., Relationships Between Tissue Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Antioxidative Responses of Marine Mussels, Perna viridis, *Aquatic toxicology*, 2001, **52**(3-4), 189-203.

Çelik İ., Tülüce Y., Turker M., Antioxidant and Immune Potential Marker Enzymes Assessment in the Various Tissues of Rats Exposed to Indoleacetic Acid and Kinetin: A Drinking Water Study, *Pesticide biochemistry and physiology*, 2006, **86**(3), 180-185.

Çelik İ., Tülüce Y., Özok N., Effects of Indoleacetic Acid and Kinetin on Lipid Peroxidation Levels in Various Rat Tissues, *Turkish Journal of Biology*, 2002, **26**(4), 193-196.

Çelik İ., Özbek H., Tülüce Y., Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Subkronik Uygulamasının Sıçanlarda Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkileri, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 2003, **60**(1), 9-14.

Çetin V., Meyve ve Sebzelerde Kullanılan Bitki Gelişmeyi Düzenleyiciler, *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 2002, Cilt no:2, 40-50.

Dere B., Azadiraktin'in *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Hemolenfinde Bulunan Bazı Antioksidan Enzimlerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2015, 394345.

Downer R. G. H, Lipid Metabolism, Editor: G A Kerkut, L I Gilbert, *Comprehensive Insect Physiology,* 1st edition, Pergamon Press, Oxford, 1985, 78-104.

Doyotte A., Cossu C., Jacquin M. C., Babut M., Vasseur P., Antioxidant Enzymes, Glutathione and Lipid Peroxidation As Relevant Biomarkers of Experimental or Field Exposure in the Gills and the Digestive Gland of the Freshwater Bivalve *Unio tumidus*, *Aquatic Toxicology*, 1997, **39**(2), 93-110.

Er A., Endoparazitoit *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera; Ichneumonıdae) Zehiri ve Parazitlemesinin Konak Hemositlerine Etkileri, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2011, 282932.

Erdem M., Büyükgüzel E., The Effects of Xanthotoxin on the Biology and Biochemistry of *Galleria mellonella* L. (Lepıdoptera: Pyralıdae), *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2015, **89**(4), 193-203.

Farrow M. G., Blaydes D. F., Van Dyke K., The Effect of Plant Growth Substances and Natural Products on RNA and DNA Synthesis in Leukocytes, *Experientia*, 1976, **32**(1), 29-30.

Felton G. W., Summers C. B., Antioxidant Systems in Insects, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1995, **29**(2), 187-197.

Felton G. W., Duffey S. S., Protective Action of Midgut Catalase in Lepidopteran Larvae Against Oxidative Plant Defenses, *Journal of Chemical Ecology*, 1991, **17**(9), 1715-1732.

Fridovich I., Superoxide Dismutases. An Adaptation to a Paramagnetic Gas, *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, **264**(14), 7761-7764.

Gao Y., Cahoon G. A., Arginine in Concord Grape As Affected by High Soil Nitrogen Fertilization and Daminozide, *Journal of Plant Nutrition*, 1990, **13**(12), 1479-1488.

Girotti A. W., Mechanisms of Lipid Peroxidation, *The Journal of Free Radical Biology and Medicine,* 1985, **1**(2), 87–95.

Habig H. W., Pabst J. M., Jakoby W. B., *The Journal of Biological Chemistry,* 1974, **249**(22), 7130-7139.

Halliwell B., Gutteridge J. M., Role of Iron in Oxygen Radical Reactions, Editor: Packer L., *Methods In Enzymology,* 1st edition, Academic Press, USA, 47-56, 1984.

Hsieh C. Y., Allen W. W., Effects of Insecticides on Emergence, Survival, Longevity, and Fecundity of the Parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae) From Mummified *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae), *Journal of Economic Entomology*, 1986, **79**(6), 1599-1602.

Hyršl P., Büyükgüzel E., Büyükgüzel K., The Effects of Boric Acid-Induced Oxidative Stress on Antioxidant Enzymes and Survivorship in *Galleria mellonella*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2007, **66**(1), 23-31.

İçen E., Armutçu F., Büyükgüzel K., Gürel A., Biochemical Stress Indicators of Greater Wax Moth Exposure to Organophosphorus Insecticides, *Journal of Economic Entomology*, 2005, **98**(2), 358-366.

Kansu İ. A., Uğur A., *Pimpla turionellae* (L.) (Hym., Ichneumonidae) ile Konukçusu Bazı Lepidopter Pupaları Arasındaki Biyolojik İlişkiler Üzerinde Araştırmalar, *Doğa Bilim Dergisi*, 1984, **8**(2), 160-173.

Kaur C., Kapoor, H.C., Antioxidants in Fruits and Vegetables, *Food Science and Technology,* 2001, **36**(7), 703-725.

Kaur R., 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*, 2002, **30**(3), 224-230.

Kayış T., İskender E., Coşkun, M., Effects of Diazinon On Antioxidant Enzymes and Adult Emergence of Parasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Turkish Journal of Entomology*, 2012, **36**(4), 463-471.

Kehrer J. P., Free Radicals As Mediators of Tissue Injury and Disease, *Critical Reviews in Toxicology*, 1993, **23**(1), 21-48.

Kılınç K., Oksijen Radikalleri: Üretilmeleri, Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. *Biyokimya Dergisi*, 1985, **10**(2), 59-89.

Koca N., Karadeniz F., Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 2003, Cilt no:16, 32-37.

Koca N., Karadeniz F., Gıdalardaki Doğal Antioksidan Bileşikler, *The Journal Of Food,* 2005, **30**(4), 229-236.

Krishnan N., Kodrík D., Kłudkiewicz B., Sehnal F., Glutathione–Ascorbic Acid Redox Cycle and Thioredoxin Reductase Activity in the Digestive Tract of *Leptinotarsa cemlineata* (Say), *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, **39**(3), 180-188.

Krishnan N., Kodrík D., Antioxidant Enzymes In *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are They Enhanced to Protect Gut Tissues During Oxidative Stress?, *Journal of Insect Physiology*, 2006, **52**(1), 11-20.

Kumlay A. M., Eryiğit T., Bitkilerde Büyüme ve Gelişmeyi Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları, *Iğdır University Journal of the Institute of Science and Technology*, 2011, **1**(2), 47-56.

Kvien C. S., DePalma R. A., Raczynski A. R., Hellmann L. M., Effect of Soil and Foliar Daminozide Applications on Residue Levels in Peanut, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1989, **37**(1), 200-203.

Larson R. A., The Antioxidants of Higher Plants, *Phytochemistry*, 1988, **27**(4), 969-978.

Li Z., Li M., He J., Zhao X., Chaimanee V., Huang W. F., Su S., Differential Physiological Effects of Neonicotinoid Insecticides on Honey Bees: A Comparison Between *Apis mellifera* and *Apis cerana*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2017, Cilt no:140, 1-8.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N., Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health, *Pharmacognosy Reviews*, 2010, **4**(8), 118-126.

Lozinskaya Y. L., Slepneva I. A., Khramtsov V. V., Glupov V. V., Changes of the Antioxidant Status and System of Generation of Free Radicals in Hemolymph of *Galleria mellonella* Larvae at Microsporidiosis, *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2004, **40**(2), 119-125.

Morshed M. H., Hossain M. S., Islam M. A. U., Ali M. U., Ibrahim M., Islam M. S., Islam M. A., Toxicity of Four Synthetic Plant Hormones IAA, NAA, 2, 4-D and GA Against *Artemia salina* (Leach), *International Journal of Agriculture and Biology*, 2005, **7**(2), 240-242.

Orr W. C., Sohal R. S., Extension of Life-Span by Over expression of Superoxide Dismutase and Catalase in *Drosophila melanogaster*, *Science*, 1994, **263**(5150), 1128-1130.

Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., Deemer E. K., Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**(11), 3122-3128.

Özbey E. Radyasyona Dirençli *Deinococcus radiodurans* ile *Escherichia coli*'de Radyasyonun Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2009, 246640.

Özer M., Arı Kovanlarında Önemli Zarar Yapan Balmumu Güvesi (*Galleria mellonella* L.) nin Morfolojisi, Biyolojisi ve Yayılışı Üzerinde Araştırmalar, *Bitki Koruma Bülteni*, 1962, **2**(12), 26-35.

Özmen M., Topçuoğlu S. F., Bozcuk S., Bozcuk N. A., Effects of Abscisic Acid and Gibberellic Acid on Sexual Differentiation and Some Physiological Parameters of Laboratory Mice, *Turkish Journal of Biology*, 1995*,* Cilt no:19*,* 357-364.

Patten C. L., Glick B. R., Bacterial Biosynthesis of Indole-3-acetic Acid, *Canadian Journal of Microbiology*, 1996, **42**(3), 207-220.

Reed D. A., Brown J. J., Host/parasitoid Interactions: Critical Timing of Parasitoid-Derived Products, *Journal of Insect Physiology*, 1998, **44**(9), 721-732.

Sak O., Uçkan F., Ergin E., Effects of Cypermethrin on Total Body Weight, Glycogen, Protein, and Lipid Contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), *The Belgian Journal of Zoology*, 2006, **136**(1), 53-58.

Siliğ Y., Çelik K., Atalay A., Daminozid Uygulamasından Sonra Elde Edilen Civcivlerde Karaciğer Sitoplazmik Glutatyon-S-Transferaz ve Mikrozomal Nitrozodimetilamin Demetilaz Aktivitelerindeki Değişiklikler, *Turkish Journal of Biology*, 2000, Cilt no:24, 119-126.

Slump P., Schreuder H. A. W., Oxidation of Methionine and Cystine in Foods Treated With Hydrogen Peroxide, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1973, **24**(6), 657-661.

Sonntag V., C., Some Aspects of Radiation-Induced Free-Radical Chemistry of Biologically Important Molecules, *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 1992, **39**(6), 477-483.

Strand M. R., Pech L. L., Immunological Basis for Compatibility in Parasitoid-Host Relationships, *Annual Review of Entomology*, 1995, **40**(1), 31-56.

Theopold U., Li D., Fabbri M., Scherfer C., Schmidt O., The coagulation of insect hemolymph, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2002, **59**(2), 363-372.

Tucker D. J.,The Effects of Far-Red Light on the Hormonal Control of Side Shoot Growth in the Tomato, *Annals of Botany*, 1976, **40**(5), 1033-1042.

Tuluce Y., Celik İ., Influence of Subacute and Subchronic Treatment of Abcisic Acid and Gibberellic Acid on Serum Marker Enzymes and Erythrocyte and Tissue Antioxidant Defense Systems and Lipid Peroxidation in Rats, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2006, **86**(2), 85-92.

Turancı H, Radiotrofik Bir Fungus Olan Alternaria Alternata'da Uv-C'nin Biyokimyasal Belirteçler Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2013, 341524.

Uçkan F., Gülel A., Age-related Fecundity and Sex Ratio Variation in *Apanteles galleriae* (Hym., Braconidae) and Host Effect on Fecundity and Sex Ratio of Its Hyperparasitoid *Dibrachys boarmiae* (Hym., Pteromalidae), *Journal of Applied Entomology*, 2002, **126**(10), 534.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J., Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2007, **39**(1), 44-84.

Vontas J. G., Small G. J., Hemingway J., Glutathione-S-Transferases as Antioxidant Defence Agents Confer Pyrethroid Resistance in Nilaparvata Lugens, *Biochemical Journal*, 2001, **357**(1), 65.

Wharton R. A., Bionomics of the Braconidae, *Annual Review of Entomology*, 1993, **38**(1), 121-143.

Yılmaz M., Bazı Pestisitlerin Sıçan Dokularındaki Asetilkolinesteraz ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri ile Malondialdehit Düzeyine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Ensitüsü, Adana, 2010, 270627.

Yorulmaz S., Ay R., Akar ve Böceklerde Pestisitlerin Detoksifikasyonunda Rol Oynayan Enzimler, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2010, **24**(2), 137-148.

Yu S. J., Induction of Detoxification Enzymes by Triazine Herbicides in the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2004, **80**(2), 113-122.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Özbek R., **Özyılmaz D.**, Uçkan F., Altuntaş H., Ekrem E., Indole-3-Acetic Acid Induced Alterations in Antioxidant Enzyme Activity of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae*), International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*, Venice, Italy, 27-29 April 2016.

Özyılmaz D., Özbek R., Uçkan F., Altuntaş H., Indole-3-Aacetic Acid Induced Alterations in Antioxidant Enzyme Activity and Lipid Peroxidation of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), *International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*, Munich, Germany, 3-5 April 2017.

Özyılmaz D., Özbek R., Uçkan F., Altuntaş H., Ergin E., Effects of Indole-3-Acetic Acid on Lipid Peroxidation Level of Model Host *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) *III. International Zoology and Technology Congress*, Afyon, Turkey, 12.-15 July 2017.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İzmit'te doğdu. İlk, orta ve lise öğretimini İzmit'te tamamladı. 2008 yılında girdiği Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2012 yılında mezun oldu. 2012 yılında başlamış olduğu Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Yüksek Lisansına devam etmektedir.