KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

INDOL-3-ASETİK ASİTİN KONAK *Galleria mellonella* L. VE ENDOPARAZİTOİTİ *Pimpla turionellae* L.'NİN HEMOLİTİK VE FENOLOKSİDAZ AKTİVİTESİNE ETKİLERİ

GÜLŞAH BECERİKLİ AKSAN

KOCAELİ 2019

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

INDOL-3-ASETİK ASİTİN KONAK *Galleria mellonella* L. VE ENDOPARAZİTOİTİ *Pimpla turionellae* L.'NİN HEMOLİTİK VE FENOLOKSİDAZ AKTİVİTESİNE ETKİLERİ

GÜLŞAH BECERİKLİ AKSAN

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

Doç. Dr. Halim Aytekin ERGÜL
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi .....

Doç. Dr. Aylin ER
Jüri Üyesi, Balıkesir Üniversitesi .....

Tezin Savunulduğu Tarih: 05.07.2019

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisansüstü çalışmalarım süresince değerli yardım ve katkılarıyla bana olanak sağlayan, sabrını ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen ve destekleriyle her zaman yanımda olan, değerli Danışman Hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Fevzi UÇKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Başta Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Başkanı Prof. Dr. Fazıl Özen olmak üzere, tüm öğretim üyelerine ve elemanlarına teşekkür ederim. Laboratuvardaki rutin işlerin yürütülmesinde yardımlarını gördüğüm Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü lisans öğrencilerine de teşekkürlerimi sunarım.

Varlıklarıyla bana destek olan dostlarım; Ece Köken'e, Burcu Daşer Özgişi'ye, Özge Selin Çevik'e, Erim Teker'e, Atakan Tevlek'e, Funda Tevlek'e, Seçil Taşçıoğlu'ya, Murat Yavuz'a, Serhat Ertuğrul'a, Selma Bahadıroğlu'ya, Aynur Güldiken'e ve Sümeyye Akıncı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerini hiç esirgemeyen ve her zaman hissettiren başta Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüsnü Efendi olmak üzere, Nöroloji Bölümü asistan arkadaşlarıma, Sevgili Klinik Araştırmalar Sorumlusu Emekli Hemşiremiz Banu Türemen'e, Klinik Araştırmalar personelimiz Hasan Şenol'a, Tıp Fakültesi Sekreterleri Feride Kurak ve Serap Altıntaş'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olduklarını bildiğim çok sevgili aile üyelerim canım annem Şükran Becerikli'ye, canım babam Abdulaziz Becerikli'ye can kardeşlerim, Gamze Becerikli, Ülkü Şafak Becerikli ve Mehmet Hüseyin Becerikli'ye destekleri ve fedakarlıkları için minnettarım ve teşekkürü bir borç bilirim. Sevgili halam Sündüz Becerikli'ye de üzerimdeki emekleri için çok teşekkür ederim. Ayrıca hayatıma eşimle birlikte giren sevgili çok değerli aile üyelerim İlhan Aksan'a, Neşe Aksan'a ve Onur Alp Aksan'a destekleri için teşekkürlerimi sunarım.Son olarak tez yazım sürecinde tüm sıkıntılarımda beni rahatlatan ve usanmadan kendi teziymişcesine her aşamasında yardımcı olan sevgili eşim, hayat arkadaşım ve candostum Serdar Aksan'a benimle birlikte hayatın cilvelerine katlandığı için sonsuz teşekkür ederim.

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

Haziran - 2019 Gülşah BECERİKLİ AKSAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
TABLOLAR DİZİNİ v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi
ÖZET viii
ABSTRACT ix
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 4
1.1. Bitki Gelişim Düzenleyicileri 4
1.2. Hemolitik Aktivite 5
1.3. Böceklerde Bağışıklık Sistemi 6
1.4. Fenoloksidaz 8
1.5. *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Büyük Balmumu güvesi) 9
1.6. *Pimpla turionellae* Linnaeus, 1758 10
2. MATERYAL VE YÖNTEM 13
2.1. Konak ve Parazitoit Stok Kültürleri 13
2.1.1. *Galleria mellonella* stok kültürü 13
2.1.2. *Pimpla turionellae* stok kültürü 14
2.2. Konak ve Parazitoit Süksesif Kültürleri 14
2.2.1. *Galleria mellonella* süksesif kültürü 14
2.2.2. *Pimpla turionellae* süksesif kültürü 15
2.3. IAA Dozlarının Belirlenmesi ve Uygulanması 15
2.4. Hemolenf Toplama ve Saklama 15
2.4.1. Hemolenf toplama 15
2.4.2. Hemolenf saklama 16
2.5. Hemolitik Aktivite 16
2.5.1. Sıçan kanı eldesi 16
2.5.2. Hemolitik aktivitenin elisada ölçümü 17
2.6. Fenoloksidaz Aktivitesi 17
2.6.1. Standart eğri ve protein miktarı 17
2.6.2. 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin 18
2.6.3. Fenoloksidaz aktivitesi ölçümü 19
2.7. İstatistik 19
3. BULGULAR 20
3.1. Hemolitik Aktivite 20
3.1.1. IAA'nın *G. mellonella* hemolitik aktivitesine etkisi 20
3.1.2. IAA'nın *P. turionellae* hemolitik aktivitesine etkisi 21
3.2. Fenoloksidaz Aktivite 22
3.2.1. IAA' nın *G. mellonella* fenoloksidaz aktivitesine etkisi 22
3.2.2. IAA'nın *P.turionellae* fenoloksidaz aktivitesine etkisi 23
4. TARTIŞMA 25
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 31

KAYNAKLAR 32
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 41
ÖZGEÇMİŞ 42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İndol-3-asetik asitin molekül yapısı 5
Şekil 1.2. İnsektisitlerin böcek bağışıklığına etkisi. Kesiksiz kutular ve oklar, böcek bağışıklık sisteminin şemasıdır. Kesikli kutular ve oklar, pestisitlerin özel bağışıklık cevabını nerede etkileyeceğini tanımlamaktadır. 6
Şekil 2.1. Standart eğri 18
Şekil 2.2. L-DOPA' nın molekül yapısı 19
Şekil 3.1. Farklı IAA dozlarında *G. mellonella*' nın yüzde hemolitik aktivitesinde görülen değişimler. 21
Şekil 3.2. Farklı IAA dozlarında *P.turionellae*' nin yüzde hemolitik aktivitesinde görülen değişimler 22
Şekil 3.3. Farklı IAA dozlarında *G. mellonella*' nın fenoloksidaz aktivitesinde görülen değişimler 23
Şekil 3.4. Farklı IAA dozlarında *P.turionellae*' nın fenoloksidaz aktivitesinde görülen değişimler 24

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. IAA nın *G. mellonella* yüzde hemolitik aktivitesine etkisi 20
Tablo 3.2. IAA'nın *P. turionellae* yüzde hemolitik aktivitesine etkisi..... 22
Tablo 3.3. IAA nın *G. mellonella* fenoloksidaz aktivitesine etkisi..... 23
Tablo 3.4. IAA nın *P. turionellae* fenoloksidaz aktivitesine etkisi..... 24

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C : Derece Celcius
g : Gram
G : Guage
kg : Kilogram
mg : Miligram
µg : Mikrogram
L : Litre
mL : Mililitre
µL : Mikrolitre
M : Molar
mM : Milimolar
mmol : Milimol
cm : Santimetre
mm : Milimetre
nm : Nanometre
ppm : Parts Per Million, (Milyonda Bir Birim)
U : Ünite
ΔA : Absorbans değişimi
V : Deney karışımının toplam hacmi, (µL)
E : Extinction coefficient, (3,6 $mM^{-1}cm^{-1}$)
D : Işık yolu
Δt : Zaman değişimi, (dk)
V : Örneğin hacmi, (µL)
d.f : Sulandırma faktörü

Kısaltmalar

ANOVA : Analysis of Variance, (Varyans Analizi)
BGD : Bitki Gelişim Düzenleyicisi
BSA : Bovine Serum Albumin
BTU : British Thermal Unit, (İngiliz Sıcaklık Birimi)
$CaCl_2$: Kalsiyum Klorür
EBI : Eikizanoid Biyosentez İnhibitörleri
EPA : Environmental Protection Agency, (Çevre Koruma Ajansı)
GA3 : Giberellik Asit
IAA : İndol-3-Asetik Asit
JH : Juvenil Hormon
JHA : Juvenil Hormon Analogları
L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphenylalanine
NaCl : Sodyum Klorür
Na2EDTA : Disodyum Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
NaOH : Sodyum Hidroksit

PAN	: Pesticide Action Network, (Pestisit Eylem Ağı)
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PO	: Fenoloksidaz
ProPO	: Profenoloksidaz
Rpm	: Rotation Per Minute, (Dakikada Dönüş Sayısı)
SH	: Standart Hata
TBS-Ca	: Tris Buffer Saline – Calcium, (Tris tuz tampon – Kalsiyum)

INDOL-3-ASETİK ASİTİN KONAK *Galleria mellonella* L. VE ENDOPARAZİTOİTİ *Pimpla turionellae* L.'NİN HEMOLİTİK VE FENOLOKSİDAZ AKTİVİTESİNE ETKİLERİ

ÖZET

İndol-3-Asetik asitin (IAA) farklı dozlarının (0-10.000 ppm) konak *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'ya yarı sentetik besin aracılığıyla uygulanması ile hem konakta hem de IAA uygulanarak yetiştirilen konak pupları üzerinden gelişen parazitoit *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) larvalarında hemolitik ve fenoloksidaz aktivitelerine etkileri incelendi. Konak ve parazitoit hemolenfinin sıçan kanında meydana getirdiği hemolitik aktivite miktarı ELISA cihazi kullanılarak tayin edildi. IAA uygulaması sonucu, tüm deney gruplarında, konak ve parazitoit hemolenfinin hemolitik aktivitelerinde kontrol gruplarına karşı artış gözlemlendi. Hem konakta hem de parazitoitteki aktivitedeki en yüksek artış 5.000 ppm'de ölçüldü. Fenoloksidaz aktivitesi belirlenirken L-DOPA substrat olarak kullanıldı ve ölçümler ELISA' da yapıldı. Konak hemolenfindeki fenoloksidaz aktivitesinin tüm deney gruplarında kontrole göre azaldığı görüldü. Aktivitedeki en fazla azalma ise 5.000 ppm' de belirlendi. Parazitoit hemolenfindeki fenoloksidaz aktivitesinin 50 ppm'de kontrole göre arttığı, diğer deney gruplarında ise kontrole göre azaldığı tespit edildi. Aktivitedeki en fazla azalmanın 500 ppm'de olduğu belirlendi. Sonuçlar, konak *G. mellonella'*nın, besin yoluyla IAA'e maruz kalması, hem konak hem parazitoit hem de hedef dışı organizmaların savunma ve bağışıklık sisteminlerini etkilediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Fenoloksidaz Aktivite, *Galleria mellonella*, Hemolitik Aktivite İndol-3-Asetik Asit, *Pimpla turionellae*.

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

ABSTRACT

We investigated the effects of various doses (0-10.000 ppm) of Indole-3-Acetic-Acid that was administered viasemisynthetic nutrients to *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvae effect of the hemolytic and phenoloxidase activity of both host and its endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) larvae grown on IAA-treated host pupae. The hemolytic activity in rat blood which was caused by host and parasitoid hemolymph was detected via ELISA. All doses of IAA increased the hemolytic activity in hemolymph of both host and parasitoid compare to control groups. The highest increase of activity was measured at 5000 ppm in both host and parasitoid. L-DOPA was used as a substrat for detecting of the phenoloxidase activity and measurement was performed via ELISA. All doses of IAA decreased the phenoloxidase activity in host hemolymph. Most decrease of activity was measured at 5000 ppm. On the other hand in parasitoid hemolymph, the phenoloxidase activity increased at 50 ppm but other IAA doses decreased the activity. The highest decrease of activity was detected at 500 ppm. Our results indicated that, exposure of IAA to host *G. mellonella* through nutrients has affected defense and immune systems of host, parasitoid and non-target organisms.

Keywords: Phenoloxidase Activity, *Galleria mellonella*, Hemolytic Activity, Indole-3-Acetic Acid, *Pimpla turionellae*.

GİRİŞ

Giderek artan dünya nüfusu, beslenme problemini de beraberinde getirmektedir. Bu problem, besin kaynaklarının ve bu kaynaklardan elde edilen besin maddelerinin en iyi şekilde kullanılma ve korunmasını zorunlu kılmaktadır (Andow ve diğ., 1997). Beslenme ihtiyacının karşılanması için tarımsal alanların genişletilmesi, başka sorunlar yaratacağından birim alandan elde edilen ürün miktarının artırılması gerekmektedir. Teknolojinin ilerlemesi ile günümüzde tarım, orman ve hayvancılık ürünlerinde verimin artırılması amacı doğrultusunda kimyasal maddelerin kullanımı yaygınlaşmış ve hızla ilerlemektedir.

Tarımsal sistemlerde zararlılarla mücadele etmede pestisit adı verilen zehirli kimyasal maddeler yaygın şekilde kullanılmaktadır. Pestisit uygulamasının sadece %0,015 - %6'sı hedef organizmaya ulaşırken, geri kalan kısmı hedef olmayan organizmalara ve toprağa ulaşarak, kimyasal kirletici olarak yer altı sularına da sızmaktadır (Yıldız ve diğ., 2005). Bu şekilde tüm ekosisteme yayılan pesitisitler, zararlı türlerin zaman içinde, adaptasyon ya da dayanıklılık yolu ile direnç kazanmalarına (Durmuşoğlu ve diğ., 2010), yeniden etkili sonuç elde etmek isteyen uygulayıcının ise pestisit miktarını bilinçsizce artırmasına neden olmaktadır. Bilinçsiz pestisit kullanımı, doğada birikmeleri ve çevreye toksik etkileri nedeniyle hedef organizmalar dışında kalan canlıları da olumsuz yönde etkilemektedir (Graethead ve Waage, 1983, Andow ve diğ.,1997). Böceklerde, sentetik insektisitlere karşı gelişen direncin nesilden nesile aktarılması da bu olumsuz etkiyi arttırmaktadır. Böcekler pestisitlere karşı direnç kazansalar da diğer canlılar özellikle de memeliler gibi gelişmiş canlılarda bu tip bir direnç gözlenememiştir (Cox, 1996). Bu nedenlerle, pestisitlerin zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması veya en aza indirilmesi amacıyla kimyasal kontrol yöntemlerinin yerini alabilecek biyolojik savaş ve doğal organik insektisitlerin kullanımı üzerindeki çalışmalar artmıştır (Erol ve Kılınçer, 1986).

Kimyasal mücadelenin ortaya çıkardığı sorunlar "Biyolojik Kontrol"ün önemini artırmaktadır. Biyolojik kontrolde kullanılan ajanlar içinde belki de en uygunu, en az risk taşıyanı ve en çok etki yapanı parazitoitlerdir (Andow ve diğ., 1997). Ekolojik can simitleri olarak da nitelendirilen (Uçkan ve Gülel, 2002) parazitoitlerin biyolojik kontroldeki önemi çok iyi bilinmektedir. Ancak, kimyasal mücadele esnasında hedef canlı türü olmayan parazitoit karakterdeki bu yararlı böcek türleri de doğrudan veya dolaylı olarak çeşitli kimyasal maddelere maruz kalmaktadırlar. Doğal çevredeki kimyasallar ve onların mümkün olan ekotoksik riskleri hakkındaki endişeler daha çok pestisitler üzerinde yoğunlaşmıştır. Pestisitlerin yanı sıra parazitoitlerin dolaylı ve/veya direkt olarak maruz kaldıkları ve göz ardı edilen diğer kimyasallar "bitki gelişim düzenleyicileri (BGD)"dir. (Uçkan ve diğ. 2008, Uçkan ve diğ., 2011a).

Bitki gelişim düzenleyicilerinin yaygın kullanılması, bu bileşenlerin böceklerin farklı biyolojik dönemlerinin gelişmesi üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığı konusunu gündeme getirmiştir. Bu konuda 60'lı yıllardan itibaren yapılan çalışmalar sonucunda bitki gelişim düzenleyicilerinin böcekler üzerine olan etkileri; toksik etki sonucu ölümler (Honeyborne 1969, Önder ve diğ., 1987), deformasyonlar ve ağırlık azalması (Carlisle ve diğ., 1969, Awad ve Taha, 1976), beslenememe etkisi (antifeedant etki) (Tahori ve diğ., 1965, Mansour ve Dimetry, 1976), morfolojik ve eşeysel gelişmede yavaşlama (Carlisle ve diğ., 1969, Van Emden, 1969), kısırlık ve doğurganlıkta azalma (Honeyborne 1969, Carlisle ve diğ., 1969, Bhalla ve Robinson 1968, El-Ibrashy 1972, Scheurer ve Aschermann 1976, Prasad ve diğ., 1977, Dreyer ve diğ., 1984), diyapoza girmeyi engelleme (Bariola ve diğ., 1976), konukçu bitki dokularında ve besin içeriğinde değişiklikler oluşturarak bitki dayanıklılığının arttırılması (Honeyborne, 1969, Worthing, 1969, Dreyer ve diğ., 1984) ve insektisitlerin bitkiye penetrasyonunu arttırması (Richter ve Caceda, 1984) şeklinde ifade edilmiştir. Hatta, bitki gelişim düzenleyicilerinin böcekleri baskı altına almak amacıyla entegre mücadele programlarında kullanılabileceğini bildirilmiştir (Posnova, 1974). Yakın zamanda, *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) ve *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) ile yapılan bazı çalışmalarda absisik asit (ABA), kinetin, gibberellik asit (GA_3), IAA, kumarin gibi bitki gelişim düzenleyicilerinin zararlı böceklerin üreme ve gelişmesi üzerinde toksik etkileri olduğu saptanmış ve bu kimyasalların insektisit olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Yeşilada ve Bozcuk, 1995, Kaur ve Rup, 2002).

Böceklerde stres tepkilerinin enerji gerektiren olaylar olduğu ve organizmanın zarar gören mekanizmaları onarmak ve/veya patolojik etkenleri bertaraf etmek için daha fazla enerji tüketmesi gerektiği gösterilmiştir (Korsloot ve diğ., 2004)

IAA'nın sıçan lökositlerinde hücre peroksidaz aktivitesini bozarak sitotoksik etkili olduğu gösterilmiştir (Pires de Melo 1996, 1998). IAA aynı zamanda biyolojik süpürücü olarak da adlandırılan insan ve atlardaki detoksifikasyon enzimi butirilkolinesterazın (Çokuğraş ve Bodur 2003, Bodur ve Çokuğraş, 2005) inhibitörüdür. Bu enzim memelilere özgüdür (Casida ve Quistad, 2004), fakat yakın zamanda inaktif formu *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae)'de (Platteborze ve Broomfield, 2000) tespit edilmiştir. Yüksek dozda IAA'nın kolinesteraz inhibisyonuna bağlı olarak stres koşulları altında oluşan serbest radikallerin birikmesi ile parazitoit ergin öncesi gelişimini, verimi, hayat uzunluğunu, boyunu etkileyebileceği öne sürülmüştür (Uçkan ve diğ., 2011a).

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.

Bu çalışmada IAA'nın kullanımının konak ve parazitoit tür üzerindeki olası sonuçları hakkında fikir edinilmesi amaçlandı. Ayrıca, elde edilen verilerin böcek biyokimyası, fizyolojisi, gelişim biyolojisi, biyolojik kontrol ve ekolojik denge ile ilgili çalışmalara da ışık tutacağı düşünülmektedir.

Bununla beraber bir model olarak böcek bağışıklık sisteminin çalışılması, omurgasız ve omurgalı hayvanlar için ortak olan bağışıklık tepkilerinin evriminin ortaya konması açısından da yararlı olacaktır. Diğer yandan, konak fizyolojisinin parazitoit fizyolojisi üzerindeki etkileri hakkında da bilgi sahibi olunmaya çalışılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

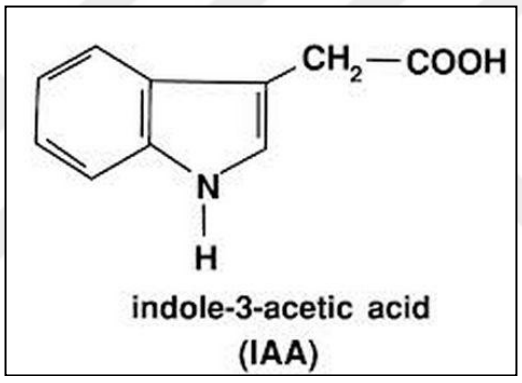
1.1. Bitki Gelişim Düzenleyicileri

Doğal bitki gelişim düzenleyicileri; oksinler, sitokininler ve gibberellinler teşvik ediciler, dorminler ve etilen ise engelleyiciler olarak beş grup altında toplanabilirler (Güleryüz, 1982). Bitkilerde büyüme ve gelişme olaylarını yönlendiren bu hormonlar; çok düşük yoğunluklarda dahi etkili olabilen ve bitkilerde sentezlenerek taşınabilen organik maddelerdir. Bitkilerde doğal olarak bulunan bu hormonların sentetik benzerleri BGD'ler olarak adlandırılmaktadır (Roberts ve Hooley, 1988). Bitki gelişim düzenleyicileri (BGD'ler) olarak kullanılan sentetik bileşiklerin özellikle de ticari bir oksin olan indol-3-asetik asitin (IAA) kullanımı tarımsal çalışmalarda oldukça yaygın hale gelmiştir. Bu bileşikler sadece bitki büyümesini hızlandırmak için kullanılmamakta aynı zamanda zararlı böcekler için kemosterilant olarak da kullanılmaktadır. Bu şekilde kimyasalların bilinçsizce kullanılması sadece zararlı böcekler üzerinde değil, aynı zamanda doğal sistemlerde bu böcekler ile beslenen doğal düşmanlar üzerinde de toksik etkili olabilir. Biyolojik kontrol ve ekolojik dengenin önemli unsurlarından olan hymenopter parazitoitler konakları ile hem biyokimyasal hem de fizyolojik ilişkiler içerisindedirler. Konak-parazitoit arasındaki bu etkileşim herhangi bir şekilde değişime uğrar ise parazitoitin konak üzerindeki baskınlığı da bu etkenlere bağlı olarak değişecektir. Bu etkenlerden birisi de tarımsal sistemlerde değerli bir araç olan ve bitkilerin kendi bünyelerinde de büyüme hormonu olarak belli oranlarda bulunan IAA olabilir.

Oksin ailesinin en önemli bireyi kabul edilen IAA bitki büyüme maddesi olarak bitkilerde embriyogenezden senesense kadar gelişimin her evresinde etkili olmaktadır. IAA'nın keşfinden sonra bu maddenin serbest halde bitkilerde yaygın olduğu birçok araştırmacı tarafından kanıtlanmıştır (Tucker 1976, Blakesley ve diğ., 1991). Günümüzde ise yalnızca yüksek bitkilerin değil, mantar ve bakterilerin de oksin içerdikleri saptanmıştır (Fett ve diğ., 1987, Martinez-Toledo ve diğ., 1998, Topçuoğlu ve Ünyayar, 1995, Ünyayar ve diğ.. 1996). IAA'nın içsel bir oksin

olduğunun saptanmasından sonra, bir aminoasit olan triptofandan sentezlendiği kesinlik kazanmıştır. IAA'nın 4 esas yolla sentezlendiğine ilaveten, bakterilerle enfekte olmuş bitkilerde indol-3-asetamid yoluyla da sentezlendiği ileri sürülmektedir (Roberts ve Hooley 1988, Kawaguchi ve diğ., 1993).

IAA hücre büyüme, bölünme ve farklılaşmasını etkileyen oksin sınıfına ait majör bir bitki büyüme hormonudur (Pilet, 1998). Birçok farklı çeşitte aminoasitlerin, peptitlerin ve non-reaktif konjuge formdaki şekerlerin konjugasyonu ve yeni ortaya çıkan bir kanser terapisinin temeli olarak kullanılabilen bir dizi toksik madde aracılığıyla üretimine öncülük eden peroksidazların oksidasyonudur. (Normanly ve Bartel, 1999, Folkes ve Wardman, 2001) İndol-3-asetik asitin (IAA) kimyasal formülü $C_{10}H_9NO_2$, molekül ağırlığı 175.18 g/mol'dur. (Şekil 1.1.)



Şekil 1.1. İndol-3-asetik asitin molekül yapısı (Patten ve Glick, 1996)

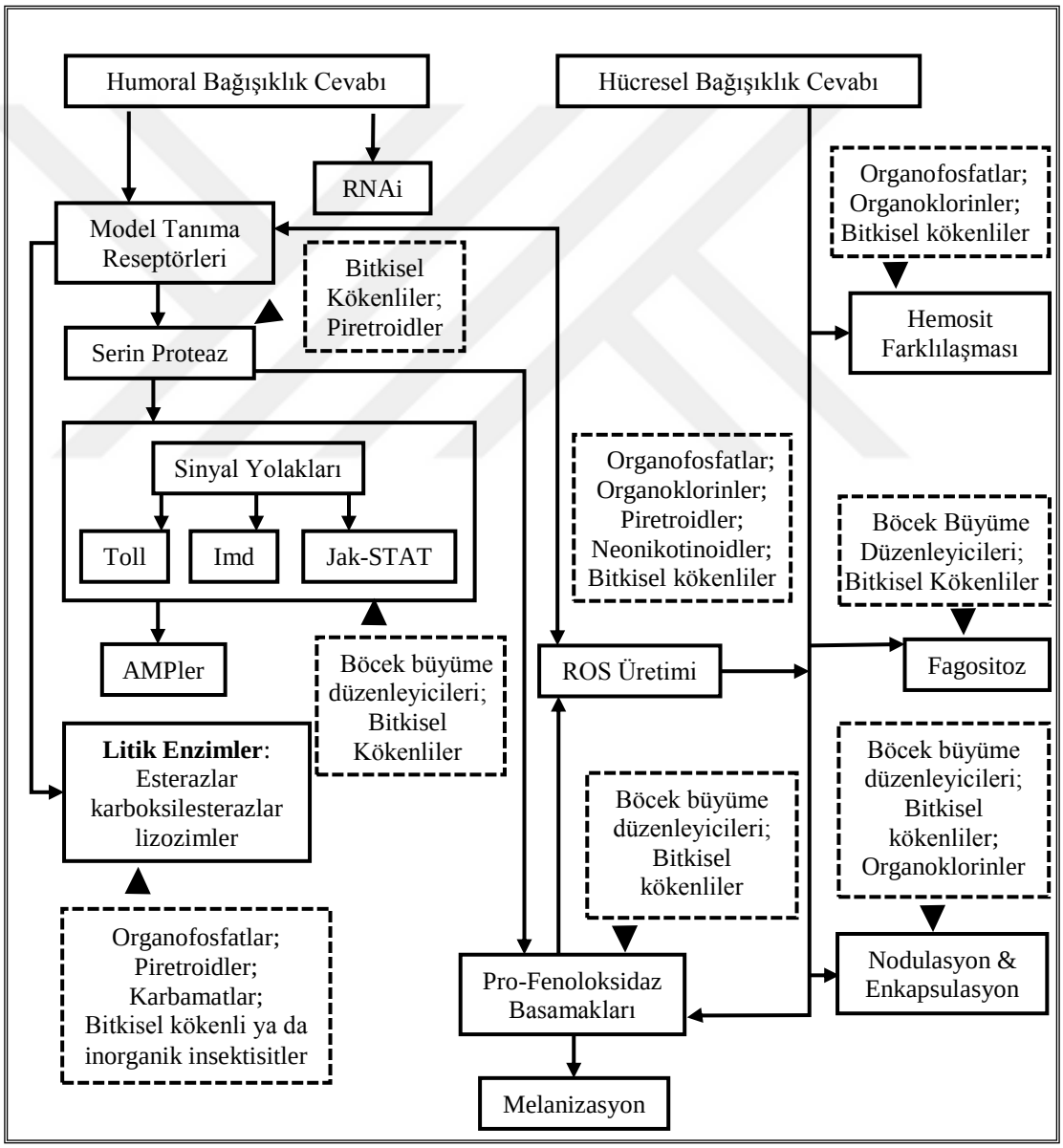
1.2. Hemolitik Aktivite

Arthropoda (Weinheimer ve diğ., 1969), Echinodermata (Canicatti ve Parinello, 1985; Canicatti, 1991; 1988), Mollusca (Bertheussen, 1983; Leippe ve Renwrantz, 1988) ve Annelidae (Roch ve diğ., 1981; Tuckova ve diğ., 1986; Kauschke ve Mohrig, 1987) gibi birçok omurgasız grubunun hemolenfinin hemolitik aktivitesi üzerine çalışmalar mevcuttur. Bu sistemler, etkinlikleri ve biyokimyasal özellikleri bakımından bir hayvandan diğerine göre değişir. Hemolitik aktivite yaranlama ya da eritrosit enjeksiyonu ile indüklenir (Anderson, 1981; Canicatti ve Parrinello, 1985).

G. mellonella L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarının hemolenfinde de hemolitik aktivite tespit edilmiştir (Phipps ve diğ., 1989).

1.3. Böceklerde Bağışıklık Sistemi

Böceklerde bağışıklık sistemi humoral ve hücresel bağışıklık olmak üzere iki şekilde olur (Wiesner ve diğ, 1996; Lavine ve Strand, 2002; Marmaras ve Lampropoulu, 2009)(Şekil 1.2.). Antimikrobiyal peptidleri ve melanizasyonu içeren humoral yanıtlar, profenoloksidaz kaskadının hızlı aktivasyonu ile indüklenerek hazırlanır (Hoffman ve Reichhart, 2002; Cerenius ve Soderhall, 2004). Hemosit aracılı hücresel yanıtlar; fagositoz, enkapsülasyon ve nodülasyonu içermektedir (Gandhe ve diğ., 2007; Marmaras ve Lampropoulu, 2009).



Şekil 1.2. İnsektisitlerin böcek bağışıklığına etkisi. Kesiksiz kutular ve oklar, böcek bağışıklık sisteminin şemasıdır. Kesikli kutular ve oklar, pestisitlerin özel bağışıklık cevabını nerede etkileyeceğini tanımlamaktadır. (James ve Xu, 2012)

Eğer bir patojen, fiziksel bariyerleri aşarsa, böcek işgalci ile baş edebilmek için karmaşık bağışıklık mekanizmalarını devreye sokar (Feldhaar ve Gross, 2008). Humoral bağışıklık sürecinde üç acil reaksiyon tetiklenmektedir. Bunlar melanizasyon, hemolenfin pıhtılaşması ve antimikrobiyal peptidlerin sentezlenmesidir (Vilmos ve Kurucz, 1998).

Melanizasyon, melanin adı verilen siyah pigmentin oluşumu, serin proteaz kaskadı ile aktif formuna çevrilen fenoloksidaz enzimi ile katalizlenmektedir (Vilmos ve Kurucz, 1998). İnaktif pro-enzim, fenoloksidaz hücrelerde sentezlenir ve bu hücrelerin patlamasıyla kütiküle aktif olarak taşınır veya yara çevresi ile enkapsüle olmuş parazitin çevresine biriktirilir (Vilmos ve Kurucz, 1998). *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) profenoloksidazı, diğer arthropod türlerininki ile birlikte α-makroglobülinlerin tiol ester bölgesi ile tamamlayıcı proteinler olan C3 ve C4'ünkine benzer sekanslar içeren kısa düz aminoasit dizisi taşır (Hall ve diğ., 1995).

Hemolenfin pıhtılaşması, bir diğer humoral bağışıklık mekanizmasıdır. Omurgalı ve omurgasız hayvanların dolaşım sistemleri bakımından aralarındaki en önemli fark; omurgalı canlılar kapalı dolaşım sistemine sahipken omurgasız canlılar açık dolaşım sistemine sahiptir. Her iki canlı grubu da dolaşım sıvılarını kaybetmemek için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerse de omurgasız hayvanlar bakımından pıhtılaşma aynı zamanda, patojenlerin canlı vücuduna girişini engellemek için faydalanılan etkili bir mekanizmadır. Omurgalılar ve böcek olmayan eklem bacaklıların aksine, böceklerdeki hemolenf pıhtılaşması hakkında çok az bilgi vardır (Theopold ve diğ., 2002). Eklembacaklıların pıhtılaşma sistemi üzerine çalışmaların çoğu böcek olmayan, Crustacea'ları (kabuklular) ve fosil türleri de olan atnalı yengeçleri *Limulus polyphemus* ve *Tachypleus tridentatus*'da içeren türler üzerinde yapılmıştır (Theopold ve diğ., 2002). Pıhtı oluşumu lepidoptera türlerindeki iki hemosit tipinde, plazmatomosit ve granülositte, yoğun olarak çalışılmıştır (Theopold ve diğ., 2004). Pıhtı oluşumu sırasında dört aşama görülmektedir (Ratcliffe ve Rowley, 1979).

Birinci aşamada, granülosit veya koaguloasit olarak adlandırılan hemositlerin, hücresel artıklar ve ekstraselüler matrix içeren hücreler arası agregatların oluşumuna öncülük edilmesi için degranülasyonu veya dağılması görülür. Bu agregatlar yara bölgesini kapatırlar ki, bu yapı primer veya yumuşak pıhtı olarak adlandırılır. İkinci aşama, pıhtıdaki çapraz bağlanmalara öncülük edecek olan profenoloksidaz

kaskadının (ve muhtemelen transglutiminaz'ın) aktivasyonudur. Üçüncü aşamada plazmatositler, bu bölgeye çekilip kabuk oluşturarak yabancı cismin vücut boşluğundan soyutlanmasını sağlar (kabuk oluşumu). Sonuncu aşama, yara çevresinde epidermisin yeniden oluşturulması ile kabuğun; yerine geçmesidir (Theopold ve diğ., 2004).

Antimikrobiyal peptidler enfeksiyonlara karşı üçüncü humoral bağışıklık tepkisidir (Vilmos ve Kurucz, 1998; Lavine ve Strand, 2002). Temel olarak yağ cisimlerinde sentezlenmelerinin yanı sıra; hemositler (Boman ve diğ. 1991), kutikular epitel hücreleri (Brey ve diğ, 1993), bağırsak (Daffre ve diğ., 1994), salgı bezleri (Kylsten ve diğ., 1992) ve üreme kanallarında (Rosetto ve diğ., 1996) da antimikrobiyal faktörler salgılanabilir. Son yılarda antimikrobiyal proteinler alanında artan araştırmalar sayesinde önemli gelişmeler sağlanmıştır. Günümüzde böceklerde 170'e yakın peptid antibiyotik tanımlanmıştır (Levin, 2007).

Omurgasız canlıların patojenlere karşı kendilerini savunmalarında dolaşım sıvılarının (hemolenf) içerisinde bulunan hücreler (hemositler) çok büyük öneme sahiptir. Hücresel savunma, fagositoz ve enkapsülasyon gibi hemosit aracılı yanıtlar anlamına gelmektedir. Hemositler, yabancı cisimleri istilacı organizmanın molekülleri ile hemositlerin yüzey reseptörlerinin etkileşimi veya dolaylı olarak istilacının yüzeyine bağlanan humoral reseptörlerin tanınması yöntemlerinden birisi ile tanır. Hücre içi ve hücreler arası sinyal olayları, fagositoz veya enkapsülasyon gibi efektör yanıtları koordine eder (Lavine ve Strand, 2002).

1.4. Fenoloksidaz

Fenoloksidazın (PO) böceklerde çok çeşitli parazit ve patojenlere karşı kilit bir bağışıklık rolü oynadığına inanılır. PO bakır içeren bir enzim olup mono-fenollerin o-difenollere, o-difenolerin de o-kinonlara oksitlenmesini katalizler. Bunlar kütikülde bulunan ve yabancı bir maddenin enkapsülasyonu için gerekli olan melanin sentezinde önemli adımlardır. PO sentezlenmeyen mutant *Drosophila'*da melanizasyonun yapılamadığı görülmüştür. Omurgalı komplement sistemi ile omurgasız litik sisteminin analog olduğu ileri sürülmüştür (Bertheussen, 1984). Omurgalı komplement sistemi, omurgasızların profenoloksidaz sistemi (proPO) ile tıpa tıp benzerdir; çünkü proteolitik bölünme ile alakalı enzimatik kaskad reaksiyonları, serin proteaz, opsonin oluşturulması ve Ca^{+2} ihtiyacı her ikisinde de

mevcuttur (Guzmán ve diğ., 1993). Bununla beraber proPO sisteminde litik aktivite tespit edilememiştir (Guzmán ve diğ., 1993). Hemolitik aktivite hayvana eritrosit enjeksiyonu ile (Canicatti and Parrinello, 1985) veya yaralayarak (Anderson, 1981) indüklenir. Parazitoit hemolenfinin hemolitik aktivitesi ile ilgili çalışmalara ise rastlanmamıştır.

Hemolenfteki PO'nun, çok farklı çeşitteki patojen, mantar, nematod ve parazitoite karşı dirençli olduğu görülmüştür (Rowley ve diğ., 1990; Ourth ve Renis, 1993; Hagen ve diğ., 1994; Hung ve Boucias, 1996; Washburn ve diğ., 1996; Bidochka ve Hajek, 1998; Reeson ve diğ., 1998).

1.5. *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Büyük Balmumu güvesi)

Galleria mellonella birçok fizyolojik, immünolojik ve biyokimyasal çalışmalarda kullanılan model bir böcek türüdür. Bu çalışmada model tür olarak kullanılan büyük balmumu güvesi (*G. mellonella*) bal arılarının (*A. mellifera*) ekonomik zararlılarındandır. Yaşamının yalnızca larval döneminde zararlı olan ve arıcılar tarafından petek güvesi olarak da anılan büyük balmumu güvesi, bu dönemde petekler içine girerek mum, bal ve polenle beslenir. Tahribatı yalnızca petekler üzerinde görüldüğünden ve bu dönemde de larva olduğundan mum kurdu olarak da adlandırılır. Arıcılık yapılan, düşük rakımlı ve ılıman iklim bölgelerinde yaygın olarak bulunurlar ve havalandırmanın yetersiz olduğu özellikle siyah petekler üzerinde hızla çoğalarak koloninin zayıflamasına neden olurlar. (Doğaroğlu, 2009) Hem depolanan peteklerde hem de koloni içindeki peteklerde orta taban kısmında büyük galeriler açıp yıkıntı ve döküntü meydana getirerek zararlı olurlar ve bu tahribat peteğin tekrar kullanılma şansını ortadan kaldırmaktadır. Arıcılar, larvaların kolonilere zarar vermelerini önlemek amacıyla fiziksel, kimyasal ve biyolojik mücadele yöntemlerini kullanmaktadırlar. Fakat genellikle bu zararlılara karşı savaşım toksik kimyasallar (pestisitler) aracılığıyla yapılmaktadır. *G. mellonella'* nın sistematikteki yeri aşağıda verilmiştir;

Alem: Animalia
Şube: Arthropoda
Sınıf: Insecta
Takım: Lepidoptera
Üstfamilya: Pyraloidea

Familya: PyralidaeAltfamilya: Galleriinae

Cins: *Galleria* Fabricius, 1798

Tür: *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)

Arıcılar, larvaların kovana zarar vermelerini önlemek için genellikle zehirli ilaçlar (pestisitler) kullanırlar. *G. mellonella* türü in vivo toksikolojik ve patojenite testlerinde oldukça uygun bir model organizma olması nedeniyle son zamanlarda küçük memelilerin yerine sıklıkla kullanılmaktadır. Aynı zamanda, bu tür, böceklerdeki immün sisteme ait hücresel ve humoral cevapların araştırılmasında ve genetik çalışmalarda da oldukça iyi bir fizyolojik model oluşturmakta ve laboratuvar şartlarında kolayca kültürü yapılabilmektedir. *G. mellonella'*nın tipik birçok fizyolojik ve anatomik özellik göstermesi, çoğalma yeteneğinin fazla olması; ekolojik ve fizyolojik araştırmalara ve farklı gelişim evrelerinde bazı metabolik olayların moleküler düzeyde araştırılmasına olanak sağlamaktadır. Bu nedenle bu tür çalışmalarda deney hayvanı olarak tercih edilmektedir.

1.6. *Pimpla turionellae* Linnaeus, 1758

Çalışmamızda parazitoit tür olarak kullanılan *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) birçok lepidopter türünün prepup ve pupunda soliter, idiobiont ve endoparazitoit olarak gelişen bir türdür (Uçkan ve Gülel 1990; Kansu ve Uğur 1984). *P. turionellae* yüksek derecede bir pup parazitoiti olup, çok sayıdaki Lepidoptera takımına ait türlerin pupal dönemini parazitlemektedir (Uçkan ve Gülel 1990; Kansu ve Uğur 1984). Parazitoitin yumurtalarından çıkan larvalar konakları olan pupların dokularından ve vücut sıvılarından beslenerek larval gelişimlerini devam ettiriler. Kış dönemini olgun larvalar olarak pupların içinde geçirirler. Ergin dişilerin yumurta bırakacak döneme ulaşmaları yaklaşık 3-6 gün sürerken, dişiler yaklaşık 50 gün süreyle yumurta koyabilirler. Ergin dişiler çoğunlukla konak büyüklüğüne göre yumurtalarını bırakırlar ve konaktan çıkan erginin cinsiyetide konak büyüklüğü ile ilişkilidir. Yumurta ve ergin dönem arasındaki gelişim süresi de 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 hemde dişiler konaklarına yumurta bıraktıktan sonra ovipozitörle deldikleri bölgeden dışarı sızan hemolenften beslenirler. Yumurtadan çıkan larvalar yaklaşık 10 gün içinde pupal döneme ulaşırlar

ve bu dönemin sonuna doğru ergine ait antenler ve gözler belirginleşir. Konaklarının ölümüyle sonuçlanan bu ilişkide konaklarını ergin olarak terk ederler (Kansu ve Uğur 1984; Uçkan ve Gülel 1990). *P.turionellae'* nın 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)
Sinonimi	*Coccygomimus turionellae*'dır.

Parazitoitler ve konakları; bitkilere uygulanan IAA'ı temas ve beslenme yoluyla direkt olarak kendi bünyelerine alabilirler. Ayrıca, parazitoitlerin hayat devrelerinin bir bölümünde besin kaynağı olarak bir böceği konak olarak kullanması, fitofaj konak bünyesine alınan IAA'nın dolaylı olarak parazitoite geçmesini sağlar. Bu kimyasallar parazitoitin biyolojik özelliklerinde ve parazitoit gelişimini kontrol altında tutan hormon dengesinde değişimlere neden olarak konak-parazitoit arasındaki uyuma zarar verebilir.

Parazitoitlerin biyolojik kontroldeki etkinliğinin arttırılabilmesi için doğal yaşam alanlarındaki kimyasal uygulamaların biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerine etkilerinin belirlenmesi önemlidir. *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) değişik konak türlerine ait pupları parazitleyen yüksek derecede polifaj bir türdür (Kansu ve Uğur, 1984) Yapılan toksikolojik çalışmalarda değişik ağır metallerin (Ortel ve Vogel 1989, Ortel 1995) ve çeşitli insektisitlerin (Erol ve Kılınçer 1986, Sak ve diğ., 2006) *P. turionellae* üzerindeki etkileri ele alınmıştır. Ancak, bitki gelişim düzenleyicilerinin konak parazitoit ilişkisi içinde olası hemolitik ve fenoloksidaz aktiviteleri üzerine bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada Entegre Zararlı Mücadelesi ve IAA'in kullanımının konak ve parazitoit tür üzerindeki olası sonuçları hakkında fikir edinilmesi amaçlandı. Ayrıca, elde

edilen verilerin böcek biyokimyası, fizyolojisi, gelişim biyolojisi, biyolojik kontrol ve ekolojik denge ile ilgili çalışmalara da ışık tutacağı düşünülmektedir. Bununla beraber bir model olarak böcek bağışıklık sisteminin çalışılması, omurgasız ve omurgalı hayvanlar için ortak olan bağışıklık tepkilerinin evriminin ortaya konması açısından da yararlı olacaktır. Diğer yandan, konak fizyolojisinin parazitoit fizyolojisi üzerindeki etkileri hakkında da bilgi sahibi olunmaya çalışılmıştır.

PAN, Pesticide Database, Extension Toxicology Network, EPA ve Toxnet (Hazardous Substances Data Bank) toksikolojik bilgilere göre IAA'nın insanlarda kanserojen ve mutajenik etki gösterdiğine dair bir veri henüz bulunamamıştır. IAA'nın diğer canlılar için toksikolojik ve ekotoksikolojik özelliklerini belirleyen çalışmaların yetersiz olması çalışmamızın önemini ortaya koymaktadır. Bu çalışmadan elde edilecek veriler yalnızca literatüre katkı sağlamayacak aynı zamanda IAA'nın ruhsatlandırılmasında var olan "ekotoksikolojik risk değerlendirilmesi ve onaylanması" bölümünde ihtiyaç olunan bilgileri de ortaya koyacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Konak ve Parazitoit Stok Kültürleri

Konak ve parazitoit kültürleri Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarında bulunan *G. melonella* ve *P. turionellae* erginleri ile kurldu ve devamlılığı sağlandı. Konak ve parazitoit kültürlerinin yetiştirilmesinde laboratuvarda bir oda böcekhane olarak kullanıldı. Kültürlerin yetiştirilmesi ve tüm deneyler süresince, böcekhanede 25±2 ◦C sıcaklık, %60±5 bağıl nem ve 12: 12 saat (Aydınlık: Karanlık) fotoperiyot şartları devam ettirildi. Sıcaklık konrolu, 9000 BTU klima ve termostatlı radyatör kullanılarak, nispi nem ise radyatörün her iki yanına asılan içi su dolu plastik kaplarla ve gerektiğinde laboratuar zeminine su serpilerek sağlandı. Sıcaklık ve nem değerleri maksimum-minimum termometre ve higrometre ile devamlı olarak takip edildi. Aydınlık ve karanlık süresi fotoperiyot cihazları ile ayarlandı.

2.1.1. *Galleria mellonella* stok kültürü

İndol-3-asetik asitin farklı konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın hemolitik ve fenoloksidaz aktiviteleri üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmada büyük balmumu güvesi konak olarak kullanıldı. Konak türün stok kültürleri laboratuarımızda üretimi sürdürülen kültürden alınan *G. mellonella* erginleri ile oluşturuldu. Konak stok kültürünün sürdürülebilmesi için, doğal koyulaşmış siyah petek bulunan çeşitli hacimlerdeki cam kavanozlara 4 dişi ve 4 erkek *G. mellonella* erginleri bırakıldı. Kavanozların ağzı hava sirkülasyonunu önlemeyecek şekilde bez ve üstüne delikler açılmış kapaklar (larvaların bezi delip kaçmalarını önlemek için) ile kapatıldı. Kavanozlar 25±2°C sıcaklık, %60±5 bağıl nem ve günlük 12:12 (K:A) fotoperiyot uygulanan laboratuvar koşullarında bekletildi. Larvaların beslenebilmesi amacıyla populasyon yoğunluğuna bağlı olarak, kavanozlara zaman zaman yeterli miktarda siyahlaşmış petek veya yarı sentetik besin (Bronskill, 1961) ilave edildi. Bu şekilde elde edilen konak larva ve pupları, parazitoit ve konak kültürlerinin

devamında, erginler ise IAA dozlarının uygulamalarının yapılacağı süksesif kültürü kurulmasında kullanıldı. Ayrıca, konak kültürlerinin hızlı bir şekilde üretilmesi ve pup elde etmek için gerektiğinde 30-35°C'ye ayarlanmış etüvler kullanıldı.

2.1.2. *Pimpla turionellae* stok kültürü

P. turionellae L. stok kültürünün laboratuvarımızda devam ettirilebilmesi için ise; besin olarak doğal petek kullanılarak yetiştirilen konak larvaları son larva evrelerine doğru kültürden alınıp içerisinde sadece katlanmış kağıt bulunan kavanozlara bırakıldı. Kavanozlar üzeri delinmiş kapak ile kapatılarak konak stok kültürlerinin yetiştirildiği böcekhaneye (25±2°C sıcaklık, %60±5 bağıl nem ve günlük 12:12 (K:A) fotoperiyot) koyuldu**.** Larvalardan elde edilen bu puplar, *P. turionellae* stok kültürünün hazırlanmasında kullanıldı. Parazitoit üretimi için konak pupları *P. turionellae* ergin dişileri tarafından parazitlendirildi. Elde edilen ergin bireyler parazitoit kültürünün devamında kullanıldı. Parazitoit kültürleri, konak kültürleri ile aynı laboratuvar koşullarında tutuldu. *P. turionellae* erginleri günaşırı %30 bal çözeltisi ve 2-4 günde bir konak pup hemolenfi ile beslendi. Ergin bireyler 20x20x20 cm boyutlarındaki tel kafeslerde tutuldu.

2.2. Konak ve Parazitoit Süksesif Kültürleri

2.2.1. *Galleria mellonella* süksesif kültürü

Konak süksesif kültürlerini oluşturmak için, belli aralıklarla stok kültürden alınan 2'şer tane en çok iki gün yaşlı dişi ve erkek *G. mellonella* ergin bireyleri, içerisinde 2,0 g siyahlaşmış petek bulunan 1 L'lik cam kavanozlara bırakıldı. Kavanozların üzeri bez ile kapatılarak konak stok kültürlerinin yetiştirildiği laboratuvara (25±2°C sıcaklık, %60±5 bağıl nem ve günlük 12:12 (K:A) fotoperiyot) konuldu. Populasyon yoğunluğuna bağlı olarak, azalan konak besinini karşılamak için kavanozlara zaman zaman yeterli miktarda yarı sentetik besin ilave edildi. Bu şekilde elde edilen konak larva ve pupları, parazitoit ve konak süksesif kültürlerinin sürdürülmesinde ve IAA çalışmalarında kullanıldı. IAA deney grupları için kullanılan besinde sadece saf su yerine değişik oranlarda hazırlanan IAA çözeltileri kullanıldı.

2.2.2. *Pimpla turionellae* süksesif kültürü

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

2.3. IAA Dozlarının Belirlenmesi ve Uygulanması

Saf IAA (Merck 1.00353.0010) Sak ve diğ. (2006) tarafından modifiye edilmiş yarı sentetik konak besinine katılacak olan suyun (besindeki su oranında değişiklik yapılmadan) yerine IAA'nın 50, 500, 1.000, 5.000 ve 10.000 ppm dozları bulunan sıvı eklendi. Her bir doz için *G. mellonella*'nın iki dişi ve iki erkek ergin bireyi, içerisinde 2,0 g doğal kararmış petek bulunan bir litrelik kavanozlara bırakıldı. Larva çıkışı gözlemlendiğinde içerisinde ilgili doz bulunan sentetik besin her kavanoza 10,0 g olacak şekilde kavanozlara eklendi, örnekler uygun ağırlığa gelene kadar bu işlem tekrarlandı. Bu şekilde yumurtadan çıktıkları andan itibaren IAA'nın 50-10.000 ppm dozlarına maruz bırakılan konak larvaları, hemolitik akivite ve fenoloksidaz aktivitesi ayrıca konak pupları da parazitoitin hemolitik akivite ve fenoloksidaz aktivitesi etkilerinin belirlenmesi için parazitleme çalışmalarında kullanıldı.

2.4. Hemolenf Toplama ve Saklama

2.4.1. Hemolenf toplama

2.4.1.1. *G. mellonella'* dan Hemolenf Eldesi

50-10 000 ppm doz aralığında IAA uygulanan 0,18± 0,02 g ağırlığındaki konak son evre larvalardan hemolenf alındı. Deney için her IAA dozu ve kontrol grubundan 10'ar larva kullanılarak 3 tekrar yapıldı. Farklı deney ve kontrol gruplarında larva birinci abdominal prolegin ön segmentinden birey başına 10 µL hemolenf

mikrokapiler tüp (Sigma) yardımıyla alındı. 10 bireyden toplanan hemolenfler 1,5 mL'lik eppendorf tüp içerisinde ortak havuzda biriktirildi.

2.4.1.2. *P. turionellae'* den Hemolenf Eldesi

IAA'nın *P. turionellae* larvaları üzerine etkisinin belirlenebilmesi için daha önce anlatıldığı gibi çeşitli IAA dozlarının uygulanması ile yetiştirilen *G. mellonella* larvalarının pupları parazitletildi. Bu şekilde parazitoit larvaları IAA'e maruz bırakıldı. Parazitletmenin ardından 8. günde uygun boyuta gelen son evre *P. turionellae* larvaları, *G. mellonella* pupaları açılarak toplandı. Deney için her IAA dozu ve kontrol grubundan 5'er larva kullanılarak 3 tekrar yapıldı. Toplanan larvalar stereo mikroskop altında böcek iğnesi ile delindi. Dışarı sızan hemolenf mikrokapiller tüp (Sigma) aracılığıyla birey başına 10 µl hemolenf olacak şekilde toplandı.

2.4.2. Hemolenf saklama

Konaktan toplanan hemolenfler içinde 0,001 mg N-phenlythiourea (Sigma) olan buzda soğutulmuş 1,5 µL ependorf tüplerine alındı. Bir deney serisinin tekrarında 10 birey olacak şekilde deneyler farklı zamanlarda 3 kez tekrar edildi. IAA uygulamalarında kullanılan *G. mellonella* son evre larvalarının farklı zaman ve farklı süksesif kültürlerden alınmasına özen gösterildi.

Konak hemolenfinde olduğu gibi içinde 0,001 mg N-phenlythiourea (Sigma) olan buzda soğutulmuş 0,5 µL ependorf tüplerine parazitoit hemolenfi alındı. Bir deney serisinde 5 birey olacak şekilde değişik zamanlarda 3 kez tekrar edildi. Toplanan konak ve parazitoit hemolenfleri, hemolitik aktivite deneyleri yapılıncaya kadar -80 ºC'de saklandı. Fenoloksidaz aktivitesi için ise hem konak hem de parazitoitin hemolenfleri toplanır toplanmaz deneye tabii tutuldu.

2.5. Hemolitik Aktivite

2.5.1. Sıçan kanı eldesi

Eritrositleri kullanılacak olan sıçan femur başından ksilol ile sedatize edildi. Hayvanın kardiyak çevresi alkol ile steril edildikten sonra 21G'lik kanül kullanılarak intrakardiyak ponksiyon yöntemi ile kalbinden 3 mL kan alındı. Daha sonra steril

Alsever solüsyonu ile 1:5 oranında karıştırılıp 30 mL'lik falcon tüpüne koyuldu ve +4 ^{o}C'de muhafaza edildi. (Etik kurul karar no: KOÜ HADYEK 8/2-2013)

2.5.2. Hemolitik aktivitenin elisada ölçümü

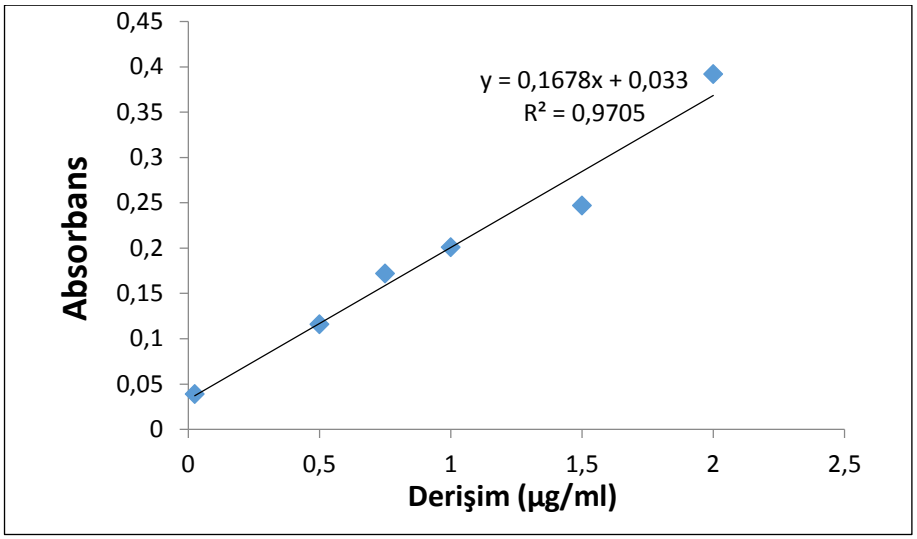
Kullanmadan önce hücreler 2 defa tuz solüsyonu (NaCl 0,15 M) ile ve 2 defa da TBS-Ca (Tris buffered saline: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5, plus 10 mM $CaCl_2$) ile santrifüj edilerek (800g, 10°C, 10 dk) yıkandı. Son olarak eritrositler %8 (v/v) oranında TBS-Ca içinde tekrar süspansiyon haline getirildi. Hemolitik aktivite 850 µL TBS-Ca, 100 µl %8' lik sıçan eritrositlerinden ve 50 µL hemolenf örneğinden alınarak ölçüldü. Bu karışım 25°C de 30 dk inkübe edilerek, eppendorf içinde 30 saniye boyunca mikrofüj edildi. Ortaya çıkan hemoglobin 540 nm dalga boyunda Elisa cihazında end point olarak ölçüldü. Kontrolde hemolenf yerine TBS-Ca buffer kullanıldı. % 100 hemoliz 900 µL NH_4Cl (amonyum klorür) (0,15M) ile 100 µL sıçan eritrositinin (%8) karıştırılması ile elde edildi. Ortaya çıkan sonuç hemoliz yüzdesini verdi (Guzman ve diğ., 1993).

2.6. Fenoloksidaz Aktivitesi

2.6.1. Standart eğri ve protein miktarı

2.6.1.1. Standart eğri

Konak ve parazitoit hemolenflerindeki toplam protein miktarının belirlenebilmesi için Bradford (1976) yöntemi uygulandı. Bovine Serum Albumin (BSA) standart proteini 4 mg olacak şekilde hassas terazide tartılıp 2 mL Phosphate Buffer Saline (PBS) ile tamamlandı ve homojenize etmek için vortekslendi (2 mg/mL). Hazırlanmış olan ana stok karışımı 2 mg/mL , 1,5, 1,0, 0.75, 0,50, 0,25, 0,125 ve 0,025 mg/mL olacak şekilde seyreltilerek içerisinden mikropipet aracılığı ile 5'er µL çekilerek well-plate'e aktarıldı. Kontrol için distile su kullanıldı. Üzerine 200 µL Bradford reagent, multipipet yardımı ile eş zamanlı olacak şekilde eklendi ve 25 ^{o}C, 100 rpm koşullarında 595 nm'de ELISA cihazında endpoint olarak ölçüldü. Ölçümler 30. saniye, 2. ve 5. dakikada yapıldı. (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Standart eğri

2.6.1.2. Protein Miktarı

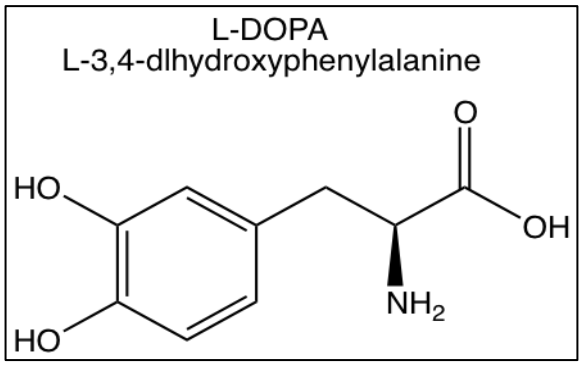
Konak larvalarından 0,18±0,02 g ağırlığındaki bireylerden 10'ar larva seçilerek hepsinden 10'ar µL hemolenf toplandı ve ortak bir havuzda toplandı. Aynı şekilde parazitoit larvalarının 8 günlük olan bireylerinden 5'er larva seçilerek hepsinden 5'er µL hemolenf toplandı ve ortak bir havuzda toplandı. Her iki havuzdan ayrı ayrı 8 µL alınıp 800 µL PBS tamponu ile tamamlandı. Elde edilen hemolenf PBS tamponu karışımından 10 µL alınarak üzerine 200 µL Bradford reagent eklendi ve 25 ^{o}C 100 rpm koşullarında 595 nm'de ELISA cihazında spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen veriler standart eğriye yerleştirilerek Standart Eğri Denklemine (2.1) göre µg/µL olacak şekilde hesabı yapıldı. (y=mx+b; y=Bağımlı değişken, m=Eğim, x=Bağımsız değişken, b=Sabit hata, R^2=Korelasyon katsayısı)

$y=0,1678x+0,033 \quad R^2=0,9705$

(2.1)

2.6.2. 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin

Fenoloksidaz enzim aktivite deneylerinde 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA) substrat olarak kullanıldı. Bunun için 20 mM L-DOPA PBS tamponu kullanılarak hazırlandı. L-DOPA kimyasal formülü $C_9H_{11}NO_4$, molekül ağırlığı 197,19 g/mol dur.(Şekil 2.2)



Şekil 2.2. L-DOPA' nın molekül yapısı

2.6.3. Fenoloksidaz aktivitesi ölçümü

Kontrol ve deney gruplarının hemolenfleri kullanılarak hazırlanan hemolenf PBS karışımından 100 µL alınarak well-plate'e aktarıldı. Üzerine ise hazırlanmış olan 20 mM L-DOPA' dan 100 µL eklendi ve 25^{o}C' ye hazırlanmış etüvde 30 dakika inkübe edildi. Kontrol için hemolenf yerine PBS tamponu koyuldu. İnkübasyon sonucunda örnekler 25 ^{o}C 100 rpm koşullarında 490 nm'de 1'er dakikalık ölçümler olacak şekilde 30 dakika boyunca ELISA cihazında ölçüldü. Elde edilen sonuçlar ile aşağıdaki Formüle (2.2) göre fenoloksidaz enzim aktivitesi unit olarak hesaplandı. (Fenoloksidaz-PO- uniti 490 nm/dk' da Δ0,001 A' a eşittir.)

$$b=\frac{\Delta A \times V}{E \times d \times v \times \Delta t} \times d.f \qquad (2.2)$$

2.7. İstatistik

Bütün deney sonuçlarından elde edilen ortalamalar SPSS 20.0 istatistik programında tek yönlü varyans analizleri (ANOVA) ile karşılaştırıldı. Ortalamalar arası farklar Tukey gerçekten anlamlı farklılık (Tukey HSD) testleri ile belirlendi. Yüzde olarak verilen tüm değerler analizlerden önce arcsinüs karekökleri alınarak normalleştirildi ve istatiksel analizlere tabi tutuldu. Fakat, sonuçlar yüzde olarak sunuldu. Sonuçlar $P<0,05$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı bulundu.

3. BULGULAR

3.1. Hemolitik Aktivite

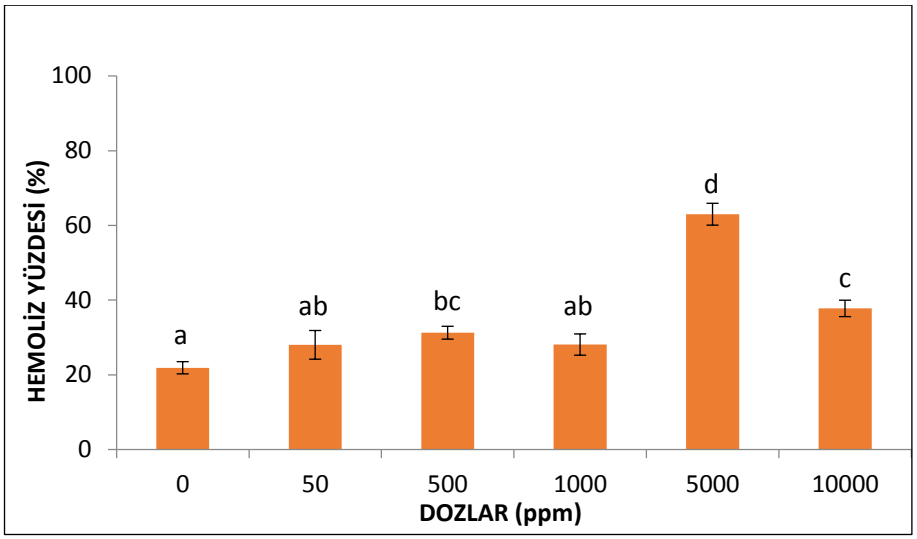
3.1.1. IAA'nın *G. mellonella* hemolitik aktivitesine etkisi

G. mellonella' da farklı konsantrasyonlarda indol-3-asetik asit uygulamasının hemolitik aktivite yüzdesine etkisi Tablo 3.1' de verilmektedir. IAA dozlarının uygulandığı gruplarda (50, 500, 1.000, 5.000, 10.000 ppm) ortalama hemolitik aktivite yüzdesi sırasıyla 28,03, 31,28, 28,10, 62,99, 37,78 olarak hesaplandı. Hemolitik aktivitede kontrol gruplarına göre madde uygulanan gruplardan hepsinde artma gözlemlendi (F=92,041; df=5; p=0,00). Ayrıca deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında 50, 500, 1.000 ve 10.000 ppm'e göre 5.000 ppm'de görülen artma da istatistiksel olarak anlamlıydı. (Şekil 3.1)

Tablo 3.1. IAA nın *G. mellonella* yüzde hemolitik aktivitesine etkisi

IAA dozu (ppm)	**Hemoliz yüzdesi (%)**
	ORTALAMA±SH*
Kontrol	21,90±1,65a
50	28,04±3,84ab
500	31,29±1,73bc
1.000	28,11±2,85ab
5.000	62,99±2,92d
10.000	37,78±2,21c

***Ortalama hemoliz yüzdesi üç deney tekrarında kullanılan 30 bireyden elde edilen sonuç
**Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler (a-d) arasındaki fark istatiksel olarak önemsizdir (P>0,05).
IAA; İndol-3-asetik asit konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata



Şekil 3.1. Farklı IAA dozlarında *G. mellonella*' nın yüzde hemolitik aktivitesinde görülen değişimler.

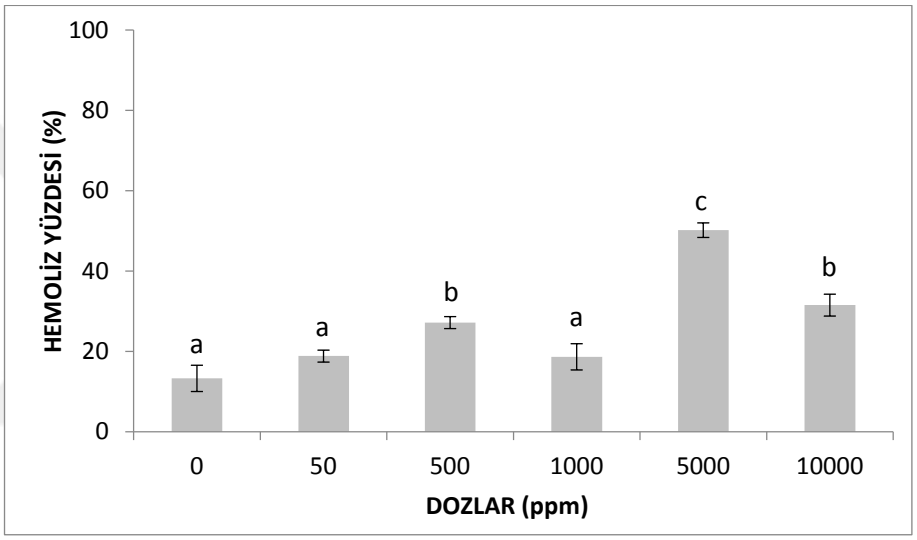
3.1.2. IAA'nın *P. turionellae* hemolitik aktivitesine etkisi

P. turionellae' de farklı konsantrasyonlarda IAA uygulamasının hemolitik aktivite yüzdesine etkisi Tablo 3.2' de verilmektedir. IAA dozlarının uygulandığı gruplarda (50, 500, 1.000, 5.000, 10.000 ppm) ortalama hemolitik aktivite yüzdesi sırasıyla % 18,84, 27,18, 18,65, 50,19, 31,54 olarak hesaplandı. Hemolitik aktivitede kontrol gruplarına göre madde uygulanan gruplardan hepsinde artma gözlemlendi. Bu artmalardan kontrol grubuna göre 50 ve 1.000 ppm dozlarının istatistiksel olarak anlamsız olduğu fakat 500, 5.000 ve 10.000 ppm dozlarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu analizlerle belirlendi (F=86,450; df=5; p=0,00). Ayrıca deney gruplarından 500 ve 10.000 ppm dozları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamsız olduğu fakat 5.000 ppm dozu ile karşılaştırıldığında görülen artmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. (Şekil 3.2)

Tablo 3.2. IAA'nın *P. turionellae* yüzde hemolitik aktivitesine etkisi

IAA dozu (ppm)	Hemoliz Yüzdesi (%)
	ORTALAMA±SH*
Kontrol	13,29±3,28a
50	18,85±1,50a
500	27,18±1,49b
1.000	18,65±3,28a
5.000	50,20±1,82c
10.000	31,54±2,73b

*Ortalama hemoliz yüzdesi üç deney tekrarında kullanılan 15 bireyden elde edilen sonuç
**Aynı sütunda, aynı harfi taşıyan değerler (a-c) arasındaki fark istatiksel olarak önemsizdir (P>0,05).
IAA; İndol-3-asetik asit konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata



Şekil 3.2. Farklı IAA dozlarında *P.turionellae*' nin yüzde hemolitik aktivitesinde görülen değişimler

3.2. Fenoloksidaz Aktivite

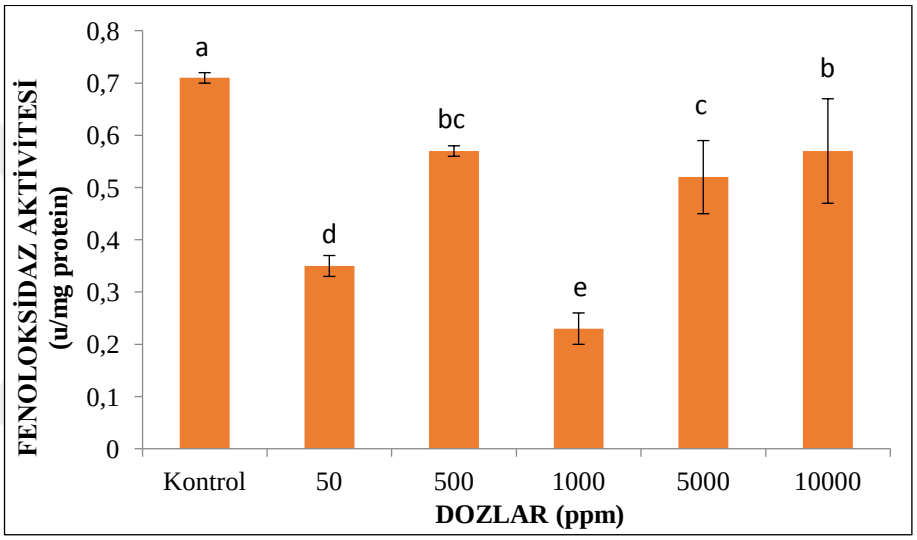
3.2.1. IAA' nın *G. mellonella* fenoloksidaz aktivitesine etkisi

G. mellonella'da farklı konsantrasyonlarda indol-3-asetik asit uygulamasının fenoloksidaz enzim aktivitesine etkisi Tablo 3.3'de verilmektedir. Deney grupları arasında kontrol gruplarına göre madde uygulanan grupların hepsinde fenoloksidaz aktivitesinin azaldığı belirlendi ve bu azalmalar istatiksel olarak anlamlıydı. Deney grupları arasında ise en düşük fenoloksidaz aktivitesinin 1.000 ppm dozunda 0,223 u/mg protein olarak hesaplandığı görüldü. (Şekil 3.3) (F=224,473; df=5; p= 0,000)

Tablo 3.3. IAA nın *G. mellonella* fenoloksidaz aktivitesine etkisi

IAA dozu (ppm)	Fenoloksidaz aktivite (u/mg protein)
	*ORTALAMA±SH**
Kontrol	0,72±0,01a
50	0,35±0,02d
500	0,57±0,01bc
1.000	0,23±0,03e
5.000	0,52±0,07c
10.000	0,57±0,17b

*Ortalama fenoloksidaz aktivitesi üç deney tekrarında kullanılan 30 bireyden elde edilen sonuç
**Aynı sütunda, aynı harfi taşıyan değerler (a-e) arasındaki fark istatiksel olarak önemsizdir (P>0,05). IAA; İndol-3-asetik asit konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata



Şekil 3.3. Farklı IAA dozlarında *G. mellonella*' nın fenoloksidaz aktivitesinde görülen değişimler

3.2.2. IAA'nın *P.turionellae* fenoloksidaz aktivitesine etkisi

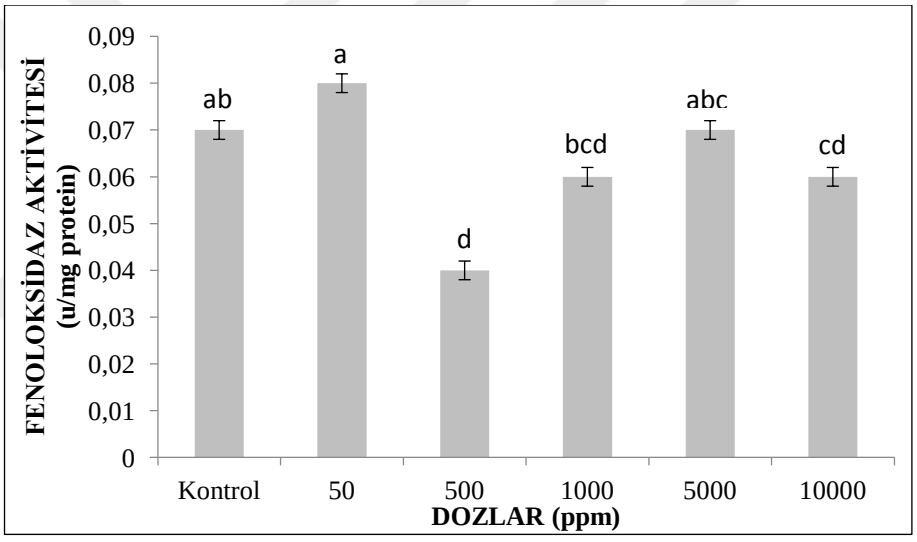
Farklı indol-3-asetik asit konsantrasyonlarının parazitoit *P. turionellae'* da fenoloksidaz aktivitesi üzerine etkileri

Tablo 3.4' de verilmektedir. Deney grupları arasında kontrol gruplarına göre madde uygulanan gruplardan 500, 1.000, 5.000 ve 10.000 ppm dozlarında azalma olduğu belirlendi. Bu azalmalar istatiksel olarak anlamlıydı ve fenoloksidaz aktivitesinin en fazla azaldığı doz 500 ppm konsantrasyonunda 0,04 u/mg protein olarak hesaplandı. Kontrole göre artma gösteren deney grubu ise 50 ppm konsantrasyonunda 0,086 u/mg protein olarak hesaplandı fakat bu artma istatiksel olarak önemli değildi. (Şekil 3.4) (F=24,99; df=5; p=0,000)

Tablo 3.4. IAA nın *P. turionellae* fenoloksidaz aktivitesine etkisi

IAA dozu (ppm)	Fenoloksidaz aktivite (u/mg protein)
	ORTALAMA±SH*
Kontrol	0,07±0,01ab
50	0,09±0,05a
500	0,04±0,01d
1.000	0,06±0,01bcd
5.000	0,07±0,01abc
10.000	0,06±0,01cd

*Ortalama fenoloksidaz aktivitesi üç deney tekrarında kullanılan 15 bireyden elde edilen sonuç
**Aynı sütunda, aynı harfi taşıyan değerler (a-c) arasındaki fark istatiksel olarak önemsizdir (P>0,05). IAA; İndol-3-asetik asit konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata



Şekil 3.4. Farklı IAA dozlarında *P.turionellae*' nın fenoloksidaz aktivitesinde görülen değişimler

4. TARTIŞMA

Son zamanlarda tarımsal sistemlerde zararlılarla mücadelede pestisitlerin kullanılmasının çevre ve insan sağlığı açısından tehdit oluşturduğu görüşünün kayda değer bir biçimde arttığından beri, bu kimyasal maddelere alternatif olabilecek bitkisel kaynaklı bileşiklerin kullanımı önem arz eden bir konu haline gelmiştir. Bu alternatif arayışında ise hedef olmayan organizmalara zarar vermeyen ve doğada kolay çözünüp birikmeye neden olmayan bileşikler aranmaktadır. Dolayısıyla çevre üzerinde olumsuz etki oluşturmasını engelleyen maddeler önerilmektedir. Bunlardan en önemlileri bitkilerdeki büyüme ve gelişmeyi sağlayan BGD ve bu maddeler arasından IAA da ihtiva eden oksinlerdir. IAA'ın doğal bir hormon olarak canlılarda sentezlenebiliyor olması ve kemosterilant olarak BGD'lerin kullanılması nedeniyle konak ve parazitoitin hemolitik, fenoloksidaz ve antioksidan enzimleri üzerine etkilerinin incelenmesi oldukça önemlidir. Son dönemlerde yapılan çalışmalardan da oldukça umut vaad eden sonuçlar elde edilmiştir.

Zehirli maddelerin hayvanlarda sistemik ve hücresel işlev bozukluklarına neden olduğu ve birçok biyokimyasal değişiklikleri uyardığı bilinmektedir (Orr ve Downer, 1982; Bhosale ve Kallapur, 1985). IAA'nın 500 mg/kg dozunda fare ve sıçanlarda teratojenik etkisi olduğunu, bu dozun altında bu yönde bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. (John ve diğ., 1979) IAA'nın kültür ortamlarında nötrofillerde şekil bozuklukları ve teratojenik etkilerinin olduğu, bunun yanında sıçan ve insanlarda da hipoglisemiye neden olduğu bulunmuştur (Bertuzzi ve diğ., 1997). Bu çalışmaların yanında IAA'nın ve metabolitlerinin insanda böbrek yetmezliği ve fenilketonüriye neden olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (Melo ve diğ., 1998). 25 gün boyunca 75 ppm IAA uygulanmasınının sıçan karaciğerinde ve böbreğinde malondialdehit seviyesini artırdığını, diğer dozlarda ise böyle bir etkisinin bulunmadığını ve bu sonuçların yanısıra subkronik dozlarda IAA'nın toksik etkiye sahip olduğu görülmüştür (Çelik ve diğ., 2002). Hamile sıçanlara 300 mg/kg IAA dozunu 1/40 oranında sulandırarak üç günde bir deri altına direkt enjekte ederek ve bu yolla

yapılan bir inceleme sonucunda 3. nesil sıçan kemik iliğinde IAA'nın mitotik indeksi arttırdığı gözlemlenmiştir (Yılmaz ve Yüksel, 2005).

IAA'nın *Apantales galleriae* (Hymenoptera: Braconidae) gelişim biyolojisine etkileri incelenmiş ve yapılan çalışmada IAA'nın özellikle yüksek dozlarda (200 ppm ve üzeri) ergin gelişim süresini uzattığı sonucuna ulaşılmıştır ve ayrıca çalışmada farklı dozlarda uygulanan IAA'nın yaşam uzunluklarını %50'den fazla azalttığı görülmüştür (Uçkan ve diğ., 2011a). IAA uygulamalarının kontrol grubuna göre erkek ve dişi ergin birey sayısında yarıdan fazla azalma gösterdiğini de bulmuşlardır. Çalışma sonucunda IAA dozlarına maruz kalan parazitoitin gelişim biyolojisinin özellikle yüksek dozlarda olumsuz etkilendiği sonucuna ulaşmıştır (Uçkan ve diğ., 2011b).

IAA'nın *Achoria grisella* (Lepidoptera: Pyralidae) hemolenfinin ve *A. galleriae* larvasının biyokimyasal parametrelerine etkisi incelenmiş ve çalışmada *A. grisella*'da IAA uygulanmasının 10 ppm hariç protein seviyesinin doza bağlı olarak arttığını, şeker seviyesinin 100 ve 200 ppm dozlarında arttığını, lipid seviyesinin ise 5, 10, 200 ve 1000 ppm dozlarında azaldığı bulunmuştur (Uçkan ve diğ., 2014). Parazitoit için yapılan denemelerde ise 50 ppm'in en etkili doz olduğunu bulmuşlardır; bu dozda glikojen ve lipid seviyesinde azalma tespit etmişlerdir. IAA'nın 1000 ppm dozunda *A. galleriae* protein ve şeker seviyesinde azalma tespit etmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda IAA uygulanmasının biyokimyasal özellikleri farklı şekilde etkilediğini ifade etmişlerdir (Uçkan ve diğ., 2014).

Daha önce IAA' nın etkilerinin belirlendiği çalışmalarda maddenin besin yoluyla tatbik edilmesiyle doza bağlı olarak IAA'nın *G. mellonella* ve *P. turionellae* biyolojik özelliklerine etkileri incelenmiştir. Farklı IAA dozlarının (50, 500, 1.000, 5.000, 10.000 ppm) uygulanması ile birinci nesil konak larvalarının puplaşma sürecinin hızlandığı görülmüştür (Uçkan ve diğ., 2015). Konak türün verimi açısından ise sadece 5000 ppm'de %33'den fazla azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada yumurta gelişim süreçlerinde 1.000 ve 10.000 ppm dozlarındaki artışın kontrol grubuna kıyasla önemli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. İkinci neslin larval gelişim süresinin 500 ve 5.000 ppm'de arttığını belirlemişlerdir. İkinci nesil pupa gelişim süresinde ise 1.000 ve 10.000 ppm dozlarında %47'den fazla azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmada parazitoit yaşam süresinin yüksek

dozlarda %27'den fazla azalma gösterdiği sonucuna da ulaşılmıştır (Uçkan ve diğ., 2015).

"Konağa Verilen İndol-3-Asetik Asitin Konak *Achoria grisella* Fabricus, 1794 (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae) Hemositlerine Etkisi" başlıklı çalışma ile IAA'nın konak *A. grisella* hemositlerine etkisini incelenmiştir (Çelik, 2014) Yapılan bu çalışmada IAA, nın tüm dozlarında kontrol grubuna göre toplam hemosit sayısının istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmanın mitotik indeks sonuçlarında IAA'nın herhangi bir anlamlı değişikliğe yol açmadığı tespit edilmiştir. Benzer bir şekilde hemosit tiplerinin de IAA dozlarından etkilenmeyerek kontrol grubu ile anlamlı bir fark olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmasının apoptotik indeks sonuçlarında bazı farklılıklar olmakla beraber IAA'nın apoptotik indekste anlamlı bir farklılık yaratmadığı sonucu bulunmuştur.

Bu çalışmada IAA'nın besin aracılı aplikasyon yöntemiyle halk arasında büyük petek güvesi olarak bilinen *G. mellonella* zararlısının ve onun doğal endoparazitoiti *P. turionellae*'nın son evre larvalarına uygulanarak maddenin hemolitik ve fenoloksidaz aktivitelerine etkileri ilk kez ortaya konulmuştur. Çalışmamızda ilk olarak IAA'nın *G. mellonella* larval hemolenfi aracılığıyla sıçan eritrositleri üzerinde hemolitik aktivitesini belirlemek amacıyla hemoliz yüzde değerlerini tespit edildi. Besin aracılı aplikasyon yöntemiyle IAA uygulanan son evre larvalarında hemoliz yüzdeleri kontrole göre artmaya neden oldu ve bu artmalar istatiksel olarak anlamlıdır. Deney sonuçlarımız IAA'nın *G.mellonella* hemolenfi aracılığıyla doza bağlı olarak hemolitik etkide artışa sebep olduğunu gösterdi. *G. mellonella* hemolenfinde hemolitik aktiviteye bakılmış ve indüklenebilir cell-free hemolitik aktivite tanımlanmış olup *G. mellonella*'nın hemolizin proteininin 56 °C'de 0,04 M EDTA varlığında stabil olduğunu ve genellikle diğer omurgasızların hemolizinlerine kıyasla daha büyük oldukları tespit edilmiştir (Phipps, 1989). 3 farklı deney hayvanı (tavşan, kobay ve koyun) ve gönüllülerden alınan 0 rH + kan gruplu eritrositler üzerinde yapılan çalışmada, konak hemolenfi eğer bir bakteri türü olan *Pseudomonas aeruginosa* (Pseudomonadale: Pseudomonadaceae) ile enfekte edilirse hemolitik aktivitenin arttığını belirlemişler ve bu türler arasında hassasiyet sıralamasını tavşan> kobay≥ insan ve koyun olarak tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise bir midye türü olan *Mytilus edulis* (Mytiloida; Mytilidae) hemositlerinin potansiyel bir

sitotoksin saldığı ve memeli eritrositlerini lizize ettiği gösterilmiştir (Leippe ve Renwrants, 1988).

Denemelerde farklı IAA konsantrasyonlarına (50, 500, 1000, 5000, 10000 ppm) besin yoluyla maruz bırakılan, *G. mellonella* pupları üzerinden yetiştirilen, *P. turionellae* son evre larvalarının hemolenfi aracılığıyla sıçan eritrositleri üzerinde hemolitik aktivitede kontrole göre artmaya neden olduğu görüldü ve bazı konsantrasyonlardaki bu artmalar istatiksel olarak anlamlı bulundu. Bir karides türü olan *Penaeus californiensis* (Decapoda; Penaeidae) hemolenfindeki hemolitik aktiviteyi birkaç parametre yönünden araştırarak açıklamaya çalışılan bir çalışmada en dikkat çeken sonuçlardan bir tanesi hemolenf miktarı arttıkça hemoliz miktarının da artmış olmasıdır (Guzman ve diğ., 1993). Üç farklı lokalizasyondan toplanan bir toprak solucanı türü olan *Dendrobaena veneta* (Haplotaxida; Lumbricidae) sölomik sıvısının hemolitik aktivitesi tavşan, insan ve koyun eritrositleri kullanılarak incelenmiş ve canlının toplandığı lokalite ile farklı türlerin eritrositlerine göre çeşitli hemolitik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Aydoğdu ve Çotuk, 2008). Aynı çalışma ile omurgalı eritrositlerinin sölomik sıvılara karşı farklı hassasiyetlerinn olduğu ve konsantrasyon miktarına göre de hemolitik aktivitenin türler arasında değiştiği sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda konak ve konak üzerinden yetiştirilen parazitoite IAA uygulanmasının, doza bağlı olarak hemolitik aktiviteyi arttırdığı görülmüştür. Hem konak hem de parazitoitteki hemolitik aktivite artışı, yabancı maddelere karşı savunma mekanizması ile ilişkilidir.

Farklı IAA konsantrasyonlarının (50, 500, 1.000, 5.000, 10.000 ppm) *G. mellonella* son evre larvalarına uygulanması sonucu bireylerden elde edilen hemolenfte fenoloksidaz aktivitesinin kontrole göre azaldığı belirlendi ve bu azalmalar istatiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 3.3). BGD uygulanması sonucunda hemosit sayısının artmasının nedeninin ilgili stres koşulları ile başa çıkabilmek için önce hücre sayısının arttırılması ile immün savunmanın arttırıldığı, ancak stres koşullarının devam etmesine bağlı olarak mekanizmanın da etkilenmesinden dolayı, bir süre sonra larval savunmanın zayıflayabileceği ortaya konulmuştur (Altuntaş, 2011). Benzeri bir durum IAA için de geçerli olabilir. Antimikrobiyal peptidleri ve melanizasyonu içeren humoral cevaplar, profenoloksidaz kaskadının hızlı aktivasyonu ile indüklenerek hazırlanır (Hoffmann ve Reichhart, 2002; Cerenius ve Soderhall, 2004). Vilmos ve Kurucz (1998) Melanin adı verilen siyah pigmentin

oluşumunu, serin proteaz kaskadı ile aktif formuna çevrilen fenoloksidaz enzimi ile katalizlendiğini vurgulamıştır. İnaktif pro enzim, fenoloksidaz hücrelerde sentezlenir ve bu hücrelerin patlamasıyla kutikulaya aktif olarak taşınır ya da yara çevresi ile enkapsüle olmuş parazitin çevresine biriktirilir. Hem humoral hem de hücresel cevaplar böceklerde detoksifikasyon mekanizmasını içerirler ve sekonder bitki bileşikleri ile fungal toksinler gibi çevresel toksinlerden gelecek zararları önleyerek pestisitler ve bağışıklık sistemi arasında başka bir yol sağlarlar. (James ve Xu, 2012) Pestisitlerin potansiyel birer serin proteaz inhibitörü olduğu ve dolayısıyla da bir ağaç baklagili olan ve Arap zamkı olarak da bilinen *Agacia senegal* (Fabales;Fabaceae) tohumlarından elde edilen özütten de anlaşıldığı gibi melanizasyonla ilişkilendirilebileceği bilinmektedir. (Babu ve Subrahmanyam, 2010) Fakat, sivrisineklerde *Culex pipiens* (Diptera; Culicidae) insektisit dirençli ırkların yüksek serin proteaz aktivitesi gösterdiği ve insektisit dirençli olmayan ırklarda ise normal aktivite seviyesinin 3 kata kadar arttığı görülmüştür. (Gong ve diğ., 2005; Yang ve diğ., 2008) Bir çalışmada *Lymantria dispar* (Lepidoptera:Lymantriidae) ve *G. mellonella*' nın fenoloksidaz aktivitesine bakılmış ve sırasıyla normal bireylerde 0,08±0,02 U/mg ve 0,76±0,07 U/mg olarak bulunmuştur (Dunphy, 1991). Bu bulgu bizim çalışmamızla da uyum içindedir. Yine aynı çalışmada EDTA' nın her iki türde de fenoloksidaz aktivitesini azalttığını fakat Ca^{+2} iyonu eklenmesinin ise aktiviteyi anlamlı olarak arttırdığı sonucunu bulmuştur. İnsektisit kökenli ve böcek gelişim düzenleyicisi olarak kullanılan buprofezin ve pyriproksifen maddelerinin, Afrika pamuk kurdu olarak da bilinen *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) üzerinde fenoloksidaz aktivitesini azalttığı belirlenmiştir (Nasr ve diğ., 2010). Bitkisel kökenli bir insektisit olan Terpinen-4-ol maddesinin de *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) 'nın 5. larval evresinde fenoloksidazı inhibe ettiği görülmüştür (Ma ve diğ., 2008). Bitkisel bir flavonoid türevi olan Quercetin maddesinin ise fenoloksidaz bağlantılı olan mono-fenolaz ve o-difenolaz enzim aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Luo ve diğ., 2005). Fakat bunların yanı sıra bitkisel kökenli bir başka insektisit olan Azadirachtin'in fenoloksidaz kaskadıyla bağlantısı olmadığı da anlaşılmıştır (Azambuja ve diğ., 1991). Bir çalışmada tütün kurdu olarak da bilinen ve sporadik bir zararlı olan *Spodoptera litura*' ya (Lepidoptera: Noctuidae) entomopatojenik bir fungus olan *Beauveria bassina* (Ascomycota: Hyphocreales) enfekte ederek immün cevapları araştırılmış ve sonuç olarak tüm instarlarda enfeksiyonun ardından bir artış olduğu fakat hemen ardından

azaldığı gözlemlenmiştir (Gurmeet ve Sanehdeep, 2013). Aynı çalışmada uygulamadan sonra fenoloksidaz seviyesinin hızlı bir şekilde azalmasını takiben 3. günden itibaren larvaların ölümlerinin başladığını kaydetmişlerdir. Bu da immün cevabın baskılandığını göstermiştir. BGD'lerin ve insektisitlerin kullanıldığı tüm bu çalışmalarda fenoloksidaz aktivitesinin azaldığı veya inhibe edildiği dolayısıyla da immün sistemin etkilendiği ve baskılandığı bulguları bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerle de uyum içindedir.

> Çalışmalarımız sonucunda, çeşitli IAA dozları (50, 500, 1.000, 5.000, 10.000) uygulanan *P. turionellae* larval hemolenfinde fenoloksidaz aktivitenin kontrole göre azalmalara neden olduğu sadece 50 ppm konsantrasyonunda bir artış olduğu gözlemlendi. Bu değişimlerde azalmalar istatiksel olarak anlamlıyken artışın anlamlı olmadığı görüldü. (

Tablo 3.4) Juvenil hormonlar (JH) ve bunların analoglarının (JHA) karasinek olarak da bilinen *Musca domestica* (Diptera; Muscidae) larval kutikulasında fenoloksidaz aktiviteyi arttırdığı bilinmektedir. (Ishaaya ve Casida, 1974) Fakat un kurdu olarak anılan erkek *Tenebrio molitor* (Coleoptera; Tenebrionidae)'e enjekte edilen JH ve JHA'ların fenoloksidaz aktivitesini baskıladığı görülmüştür. (Rantala ve diğ., 2003) İmmun cevaplarındaki bu farklılık kutikular fenoloksidazın epidermiste, hemolitik profenoloksidazın ise yağdokusu ve hemositlerde üretilip farklı hedef ve aktivitelerinin olmasından kaynaklı olabilir. Eikozanoid Biyosentez İnhibitörleri (EBI) olan indometazin, esculetin ve deksametazon maddelerininin sentetik besine karıştırılıp *P. turionella* yumurtalarının 5. larval evresine kadar bu besinlerin üzerinde yetiştirilmesi sonucunda, indometazin ve deksametazon üzerinde yetiştirilenlerde fenoloksidaz aktivitenin azaldığı gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada esculetin üzerinde yetiştirilmeyen larvalarda yetiştirilenlere göre fenoloksidaz aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Çeşitli dozlardaki IAA'nın konak besinine karıştırılması ve bunlar üzerinden yetiştirilen parazitoitlere konak hemolenfi aracılığıyla etkilerinin aktarılmasıyla, parazitoit larvalarındaki fenoloksidaz aktivitesindeki azalmalar gerçekleşmiş olabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Elde ettiğimiz sonuçlar ve yapılan diğer benzer çalışmalar göz önüne alındığında, zararlılarla mücadelede insektisitlerin yaygın olarak kullanıldığını görmekteyiz. Çeşitli konsantrasyonlarda kullanılan IAA'nın, *G. mellonella* ve *P. turionellae*'nın immün sitemlerini tetiklediğini düşünmekteyiz. Çalışmamızdan elde edilen veriler, konak ve parazitoitin bağışıklık tepkilerinin hangi yollarla baskılandığını ortaya koymak adına önem taşır.

IAA'nın model organizma olan büyük balmumu güvesi *G. mellonella*'nın larval dönemi üzerinde biyokimyasal açıdan etkili olduğu çalışmamızda görülmüştür. Hemolitik ve fenoloksidaz aktivitesindeki değişimlerin bu canlılarda belirgin bir ölüm oranına neden olmadığı gözlemlenmiştir. BGD'yi besin yoluyla almış konak pupaları üzerinde parazitoit organizma herhangi bir tercihte bulunmamıştır. Hatta parazitlemede kullanılan arıların IAA ile beslenmiş larvaların hemolenflerini yeme durumu da zorluklara yol açmıştır. Bu çalışma aynı zamanda konak parazitoit ilişkilerinin bozulmasına neden olabilecek faktörlerin de 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'ya maruz kalan hayvan ve insan sağlığı üzerinde yapabileceği etkilerin araştırılmasında da öncül olacaktır. Bütün bunların yanında IAA, entegre zararlı programlarında alternatif bir mücadele yöntemi olarak kullanılmaya adaydır. Fakat belli dozların hedef dışı organizmalar üzerinde de etkili olabileceğinden doz ayarlaması çok dikkatlice yapılmalı ve bilinçli kullanımı teşvik edilmelidir.

KAYNAKLAR

Altuntaş H., Gibberellik Asit (GA3)'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.

Anderson R. S., Inducible Hemolytic Activity in *Mercenaria mercenaria* Hemolymph, *Devl. Camp. Immunol*, 1981, **5**, 575-585.

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

Awad T. M., Taha F. A., The Effect of Some Plant Growth Inhibitors on the Developmental Stages of *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep.: Noctuidae), *Z. Ang. Ent.*,1976, **80**(3), 306-310.

Aydoğdu E. Ö., Çotuk A., Antibacterial and Hemolytic Activity of the Coelomic Fluid of *Dendrobaena veneta* (Oligochaeta, Lumbricidae) Living in Different Localities, *IUFS Journal of Biology*, 2008, **67**(1), 23–32.

Azambuja P., Garcia E. S., Ratcliffe N. A., Warthen Jr., J. D., Immune-depression in *Rhodnius prolixus* Induced by the Growth Inhibitor, Azadirachtin, *Journal of Insect Physiology*,1991, **37**(10), 771–777.

Babu S. R., Subrahmanyam B., Bio-Potency of Serine Proteinase Inhibitors from *Acacia senegal* Seeds on Digestive Proteinases, Larval Growth and Development of *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2010, **98**(3), 349–358.

Bariola L. A., Kittock D. L., Arle H. F., Vail P. V., Hennebery T. J., Controlling Pink Bollworms: Effects of Chemical Termination of Cotton Fruiting on Populations of Diapausing Larvae, *J. Econ. Entomol.*, 1976, **69**(5), 633-639.

Bertheussen K., Complement-Like Activity in Sea Urchin Coelomic Fluid, *Devl. Camp. Immunol.*, 1983, **7**, 21-31.

Bertheussen K., Complement and Ivsins in Invertebrates *Devl. Camp. Immunol. Suppl.*, 1984, **3**, 173-181.

Bertuzzi A., Mingrone G., Gandolfi A., Greco A. V., Ringoir S., Vanholder R., Binding Of İndole-3-Acetic Acid to Human Serum Albumin and Competition with L-Tryptophan, *Clin. Chim. Acta.*, 1997, **265**, 183-192.

Bhalla O. P., Robinson A. G., Effect of Chemosterilants and Growth Regulators on the Pea Aphid and Artificial Diet, *J. Econ. Entomol*., 1968, **61**(2), 552-555.

Bhosale S. H. Kallapur V. L.,Changes in the Metabolic Fuel Reserves of the 5th Instar, *Bombyx mori*, Following Endosulfan Treatment, *Entomon*., 1985, **10**, 281.

Bidochka M. J., Hajek A. E., A Nonpermissive Entomophthoralean Fungal Infection İncreases Activation of Insect Prophenoloxidase, *J Invert Pathol*, 1998, **72**, 231–238.

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 Regul.*, 1991, **10**, 1-12.

Bodur E., Çokuğraş A. N. C., The Effects of İndole-3-Acetic Acid on Human and Horse Butyrylcholinesterases, *Chem. Biol. Interact.*, 2005, **158**, 375-378.

Boman H. G., Faye I., Gudmundsson G. H., Lee J. Y., Lidholm D. A., Cell Free Immunity in Cecropia. Amodel System for Antibacterial Proteins, *Eur J Biochem*, 1991, **201**, 23-31.

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.

Brey P. T., Lee W. J., Yamakawa M., Koizumi Y., Perrot S., Role of the Integument in Insect Immunity: Epicuticular Abrasions and Induction of Cecropin Synthesis in Cuticular Epithelial Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*,1993, **90**, 6275-6279.

Canicatti C., Binding Properties of *Paracentrotus lividus* (Echinoidea) Hemolysin, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1991, **98A**, 463-468.

Canicatti C., The Lytic System of *Holothuria polii* (Echinodermata) a Review, *Bollettino di zoologia,* 1988, **55**, 139-144.

Canicatti C., Parrinello, N., Hemaglutinin and Hemolysin Levels in the Coelomic Fluid from *Holothuria polii* (echindodermata) Following Sheep Erythrocyte İnjection, *Biol. Bulletin*, 1985,**168**, 175-182.

Carlisle D. B., Ellis P. E., Osborne D. J., Effects of Plant Growth Regulators on Locusts and Cotton Stainer Bugs *J. Sci. Food Agr.*, 1969, **20**, 391-393.

Casida J. E., Quistad G. B., Why Insecticides are More Toxic to Insects Than People: The Unique Toxicology of Insects, *J. Pestic. Sci.,* 2004, **29**, 81-86.

Cerenius L., Söderhall K., The Prophenoloxidase-Activating System in Invertebrates, *Immunological reviews*, 2004, **198**(1), 116–126.

Cox C., Insecticide Factsheet Cypermethrin, *Journal of Pesticide Reform*, 1996, **16**(2), 15-20.

Çelik D., Konağa Verilen İndol-3-Asetik Asitin Konak *Achoria grisella* Fabricus, 1794 (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae) Hemositlerine Etksi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2014, 360880.

Çelik İ., Tüllüce Y., Özok N., Effects of Indoleacetic Acid and Kinetin on Lipid Peroxidation Levels in Various Rat Tissues, *T. J. Biology*, 2002, **26**, 193-196.

Çokuğraş A. N., Bodur, E., Comparative Effects of Two Plant Growth Regulators; Indol-3-Acetic Acid and Chlorogenic Acid on Human and Horse Serum Butyrylcholinesterase, *Pestic. Biochem. Physiol*., 2003, **77**, 24-33.

Daffre S., Kylsten P., Samakovlis C., Hultmark D., The Lysozyme Locus in *Drosophila melanogaster*: an Expanded Gene Family Adapted for Expression in the Digestive Tract, *Molecular & General Genetics*, 1994, **242**, 152–162.

Doğaroğlu M., Arı Hastalık Ve Zararlıları, *Modern Arıcılık Teknikleri,* 4. Basım, Türkmenler Matbaacılık, Tekirdağ, 256, 2009.

Dreyer D. L., Campbell, B. C., Jones, K. C., Effect of Bioregulator - Treated Sorghum on Greenbug Fecundity and Feeding Behavior: Implication for Host-Plant Resistance, *Phytochemistry*, 1984, **23**(8), 1593-1596.

Dunphy G.B., Phenoloxidase Activity in the Serum of Two Species of Insects, the Gypsy Moth, *Lymantria dispar* (Lymantriidae) and the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (pyralidae), *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1991, **98**(4), 535–538.

Durmuşoğlu E., Tiryaki O., Canhilal R. Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları, *VII. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi*, Ankara, Türkiye, 11-15 Ocak 2010.

El-Ibrashy M. T., The Sterilant Activity of Certain Biologically Active Compounds Against *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lepid., Noctuidae), *Z. Ang. Ent*., 1972, **71**(3), 326-332.

Erol T., Kılınçer N., Bazı Insektisitlerin Pupa Asalağı *Pimpla turionellae* (L.) (Hym., Ichneumonidae)'ye Etkileri Üzerine Araştırmalar, *Türkiye I. Biyolojik Mücadele Kongresi*, Adana, 12-14 Şubat 1986.

Feldhaar H., Gross R., Immune Reactions of Insects on Bacterial Pathogens and Mutualists, *Microbes and infection*, 2008. **10**, 1082-1088.

Fett W. F., Osman S. F., Dunn M. F., Auxin Production by Plant-Pathogenic Pseudomonads and Xanthomonads, *Appl. Environ. Microbiol*, 1987, **53**(8), 1838-1845.

Folkes L. K., Wardman P., Oxidative Activation of Indole-3-Acetic Acids to Cytotoxicspecies-A Potential New Role for Plant Auxins in Cancer Teraphy, *Biochem. Pharmacol*, 2001, **61**, 129.

Gandhe A. S., Janardhan G., Nagaraju J., Immune Upregulation of Novel Antibacterial Proteins from Silkmoths (Lepidoptera) That Resemble Lysozymes But Lack Muramidase Activity, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, **37**, 655–666.

Gong M., Shen B., Gu Y., Tian., Ma L., Li X., Serine Proteinase Over-Expression in

Relation to Deltamethrin Resistance in *Culex pipiens pallens*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2005, **438**(1), 53–62.

Graethead D. J., Waage J. K., Opportunities for Biological Control of Agricultural Pests in Developing Countries, *The World Bank*, 11, 1983.

Gurmeet K. B., Sanehdeep K., Phenoloxidase Activity in Haemolymph of *Spodoptera litura* (Fabricius) Mediating Immune Responses Challenge With Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillmin, *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2013, **1**(6), 118–123.

Guzmán M. A., Ochoa, J., Vargas-Albores F., Haemolytic Activity in the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis holmes*) Haemolymph, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1993, **106**(2), 271–275.

Güleryüz M., *Bahçe Ziraatında Büyütücü ve Engelleyici Maddelerin Kullanılması ve Önemi*, Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, 1982.

Hagen H. E., Grunewald J., Ham P. J., Induction of the Prophenoloxidase Activating System of *Simulium* (Diptera, Simuliidae) Following *Onchocerca* (Nematoda, Filarioidea) Infection, *Parasitology*, 1994, **109**, 649–655.

Hall M., Scottn T., Sugumaran M., Soderhallt K., Law J.H., Proenzyme of *Manduca sexta* Phenol Oxidase: Purification, Activation, Substrate Specificity of the Active Enzyme, and Molecular Cloning, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, **92**, 7764-7768.

Hoffmann J. A., Reichhart, J. M., Drosophila Innate Immunity: an Evolutionary Perspective, *Nature Immunology*, 2002, **3**(2), 121–126.

Honeyborne C. H. B., Performance of *Brevicoryne brassicae* on Plants Treated With Growth Regulators, *J. Sci. Food. Agr.*, 1969, **20**(7), 388-390.

Hung S. Y., Boucias D. G., Phenoloxidase Activity in the Hemolymph of Naive and *Beauvaria bassiana*-Infected *Spodoptera exigua* Larvae, *J Invert Pathol*, 1996, **67**, 35–40.

Ishaaya I., Casida J. E., Dietary TH 6040 Alters Composition and Enzyme Activity of Housefly Larval Cuticle, *Pesticide Biochemistry and Physiology*,1974, **4**(4), 484–490.

James, R. R., Xu, J., Mechanisms by Which Pesticides Affect İnsect İmmunity, *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, **109**(2), 175–182.

John J. A., Blogg C. D., Murray F. J., Schwetz B. A., Gehrıng P. J., Teratogenic Effects of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid in Mice and Rats, *Teratology*, 1979, **19,** 321- 326.

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

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**, 224-230.

Kauschke E., Mohrig W., Comparative Analysis of Hemolytic and Hemaglutinating Activities in Coelomic Fluid of *Eisenia foefida* and *Lumbricus terrestris* (Annelida, Lumbricidae), *Devl. camp. Immunol*, 1987, **11**, 331-341.

Kawaguchi M., Fujioka S., Sakurai A., Yamaki Y. T., Syona K., Presence of a Pathway for the Biosynthesis of Auxin via Indol-3-Acetamide in *Trifoliata orange*, *Plant Cell Physiol*., 1993, **34**(1), 121-128.

Korsloot A., Van Gestel C. A. M., Van Straalen N. M., *Environmental Stress and Cellular Response in Arthropods*, CRC Press, A.B.D., 2004.

Kylsten P., Kimbrell D. A., Daffre S., Samakovlis C., Hulmark D., The Lysozyme Locus in *Drosophila melanogaster*: Different Genes are Expressed in Midgut and Salivary Glands, *Mol. Gen.*, 1992, **232**(3) 335-343.

Lavine M. D., Strand M. R., Insect Hemocytes and Their Role in Immunity, *Insect Biochem. Mol. Biol*., 2002, **32,** 1295–1309.

Leippe M., Renwrantz L., Release of Cytotoxic and Agglutinating Molecules by *Mvtilus* Hemocytes, *Devl. camp.-Immunol.*, 1988, **12**, 297-308.

Levin D. M., An Integrin Required for the Encapsulation İmmune Response in the Tobacco Hornworm *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae), Doktora Tezi, Kansas State University, College of Agriculture 2007.

Luo W. C., Gao X. X., YU, T. C., Wang S. D., Inhibitory Effect of Quercetin on the Activity of Phenoloxidase in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Acta Entomologica Sinica*, 2005. **48**, 36–41.

Ma Z., Han X., Feng J., Li G., Zhang X., Effects of Terpinen-4-ol on Four Metabolic Enzymes and Polyphenol Oxidase (PPO) in *Mythimna separta* Walker, *Agricultural Sciences in China*, 2008, **7**(6), 726–730.

Mansour M. H., Dimetry N. Z., Effect of Three Plant Growth Regulators on the Immature Stages of the Cotton Leaf Worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep.: Noctuidae), *Z. Ang. Ent.*, 1976, **80**(1), 88-93.

Marmaras J. V., Lampropoulou M., Regulators and Signalling in Insect Haemocyte immunity, *Cell. Sig.*, 2009, **21**, 186-195.

Martinez-Toledo M. V., Moreno T. R. J., Gonzales-Lopez J., Root Exudates of *Zea mays* and Production of Auxin, Gibberellins and Cytokinins by *Azotobacter chroococcum*, *Plant Soil*., 1998, **110**, 149-152.

Melo M. R., Curi T. C. P., Miyasaka C. K., Palanch A. C., Curi C. P., Effect of Indole Acetic Acid on Oxygen Metabolism in Cultured Rat Neutrophil, *Gen Pharmac*., 1998, **4,** 573- 578.

Nasr H. M., Badawy M. E. I., Rabea E. I., Toxicity and Biochemical Study of Two

İnsect Growth Regulators, Buprofezin and Pyriproxyfen, on Cotton Leafworm *Spodoptera littoralis, Pesticide Biochemistry and Physiology,* 2010, **98**(2), 198–205.

Normanly J., Bartel B., Redundancy as a Way of Life-IAA Metabolism, *Curr. Opin. Plant Biol.*,1999,. **2**, 207.

Orr G. L., Downer R. G. H., Effect of Lindane (R-Hexachlorocyclohexane) on Carbonhydrate and Lipid Reserves in the American Cockroach, *Periplaneta americana,. Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1982, **17**, 89-95.

Ortel J., Accumulation of Cd and Pb in Successive Stages of *Galleria mellonella* and Metal Transfer to the Pupal Parasitoid *Pimpla turionellae, Entomol. Exper. Appl*., 1995, **77**, 89-97.

Ortel J., Vogel W. R., Effects of Lead and Cadmium on Oxygen Consumption and Life Expectancy of the Pupal Parasitoid, *Pimpla turionellae, Entomol. Exp. Appl*., 1989, **52**, 83-88.

Ourth D. D., Renis H. E., Antiviral Melanisation Reaction of *Heliothis virescens* Haemolymph Against DNA and RNA Viruses in Vitro, *Comp Biochem Physiol*, 1993, **105**(B), 719–723.

Önder F., Karsavuran Y., Hakerlerler H., Tezcan S. Bitki Büyüme Regülatörlerinden MLC'nin Laboratuar Koşullarında *Dolycoris baccarum* (L) (Het.: Pentatomidae) Üzerinde Etkileri, *Türkiye 1. Entomoloji Kongresi,* İzmir, 1987.

Phipps D. J., Chadwick J. S., Leeder R.G., Aston W.P., The Hemolytic Activity of *Galleria mellonella* Hemolymph, *Developmental & Comparative Immunology*, 1989 **13**(2), 103–111.

Pilet P. E., Applied Indole-3-Acetic Acid on the Cap and Auxin Movements in Gravireacting Maize Roots, *J. Plant Physiol.*, 1998, **152**, 135.

Pires De Melo, M., Pithon Curi T. C., Miyasaka C. K., Palanch A. C., Curi R., Effect of Indole Acetic Acid on Oxygen Metabolism in Cultured Rat Neutrophil, *Gen. Pharmacol.*, 1998, **31**, 573-578.

Pires De Melo M., Pithon Curi T. C., Palanch A. C., Miyasaka C. K., Curi, R., Indole Acetic Acid Increases H2O2, O2 Production and Phagocytosis Capacity of Rat Neutrophils, *Bienn. Meet. Int. Soc. Free Radical Res.*, 1996, **8**, 314.

Platteborze P. L., Broomfield C. A., Expression of Biologically Active Human Butyrylcholinesterase in the Cabbage Looper (*Trichoplusia ni*), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2000, **31**, 225-229.

Posnova A. N., Plant Growth Regulators and Their Use in Applied Entomology, *Trudy Vsesoyuznogo Nauchno-issledovatel'skogo Institua Zashchity Rastenii*, 1974, **40**, 135-145.

Prasad R., Behera H. N., Das C. C., MLC Induced Meiotic Instability in Grasshopper Spermatocytes, *Curr. Sci*., 1977, **46**(6), 191-192.

Rantala M. J., Vainikka A., Kortet R., The Role of Juvenile Hormone in Immune

Function and Pheromone Production Trade-Offs: A Test Of The Immunocompetence Handicap Principle, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, **270**(1530), 2257–2261.

Ratcliffe N. A., Rowley A. F., Role of Insect Hemocytes Against Biological Agents, Editörler: Gupta E.D., *Insect hemocytes: development, forms, functions, and techniques,* Cambridge Univesity Press, İngiltere, 31-414, 1979.

Reeson A. F., Wilson K., Gunn A., Hails R. S., Goulson D., Baculovirus Resistance in the Noctuid *Spodoptera exempta* is Phenotypically Plastic and Responds to Population Density, *Proc Roy Soc Lond B-Biolog Sci*., 1998, **265(**1407), 1787–1791.

Richter S., Caceda F., Untersuchungen zur Verbesserung der Wirksamkeit von Phosphororganischen Insektiziden Durch Mittel zur Steuerung Biologischer Prozesse, *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 1984, **20**, 409-418.

Roberts A. J., Hooley R., *Plant Growth Regulators*, Springer, Boston, A.B.D., 1988.

Roch, P., Valembois, P., Davant, N., Lassegues M., Protein Analysis of Earthworm Coelomic Fluid. II. Isolation and Biochemical Characterization of the *Eiseniu foetida* Andrei Factor (EFAF), *Comp. Biochem. Physiol*., 1981, **69**(B), 829-836.

Rosetto M., Manetti A. G., Giordano P. C., Marri L., Amons R., Baldari C. T., Marchini D., Dallai R., Molecular Characterization of Ceratotoxin C, A Novel Antibacterial Female-Specific Peptide of the Ceratotoxin Family From the Medfly *Ceratitis capitata*, *Eur. J. Biochem.*, 1996, **241**, 330.

Rowley A. F, Brookman J. L., Ratcliffe N. A., Possible Involvement of the Prophenoloxidase System of the Locust, *Locusta migratoria*, in Antimicrobial Activity, *J Invert Pathol*, 1990, **56**, 31–38.

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

Scheurer S., Aschermann S., The Influence of Natural and Some Synthetic Plant Growth Regulators on the Reproductive Activity of *Aphis fabae* Sucking Plant Parts, *Abstract in Rev. Appi. Entomol*, 1976, **64**(5), 262.

Tahori A. S., Zeidler G., Halevy A. H., Effect of Some Plant Growth Retardants on the Feeding of the Cotton Leaf Worm, *J. Sci. Food Agr.*, 1965, **16**, 570-572.

Theopold U., Li D., Fabbri M., Scherfer C., Schmidt O., The Coagulation of Insect Hemolymph, *Cell Mol. Life Sci*., 2002, **59**, 363-672.

Theopold U., Schmidt O., Söderhall K., Dushay M. S., Coagulation in Arthropods: Defense, Wound Closer and Healing, *Trends Immunol*., 2004, **25**, 289-294.

Topçuoğlu S. F., Ünyayar S., Beyaz Çürükçül Fungus *Phanerochaete chrysosporium* ME446' da Bitki Büyüme Maddelerinin (Oksin, Gibberellin, Absisik Asit ve Sitokinin) Üretimi ve Biyolojik Aktivitelerinin Tayini, *İnönü Üniversitesi Araştırma Fonu*, 1995.

Tucker D. J., The Effects of Far-Red Light on the Hormonal Control of Side Shoot Growth in the Tomato, *Ann. Bot*., 1976, **40**, 1033-1042.

Tuckova L., Rejnek J., Sima P., Onderjova R., Lytic Activities in Coelomic Fluid of *Eisenia foetidu* and *Lumbricus terrestris*, *Devl. camp. Immunol*., 1986, **10**, 181-189.

Uçkan F., Gülel A., Endoparazitoit *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae) Dişilerinde Zehir Aparatının Yapısı ve Zehirinin Başlıca Kimyasal Grubunun Tayini, *X. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Erzurum, Türkiye, 73-83, 1990.

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), *J. Appl. Entomol.*, 2002, **126**, 534-537.

Uçkan F., Haftacı İ., Ergin E., Effects of Indol-3-Acetic Acid on Biological Parameters of the Larval Endoparasitoid *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae), *Annals of the Entomological Society of America*, 2011a, **104**, 77-82.

Uçkan F., Özbek R., Ergin E., Effects of Indol-3-Acetic Acid on the Biology of *Galleria mellonella* and its Endoparasitoid *Pimpla turionellae*, *Belg. J. Zool*., 2015, **145**(1), 49-58.

Uçkan F., Öztürk Z., Altuntaş H., Ergin E., Effects of Gibberellic Acid (GA_3) on Biological Parameters and Hemolymph Metabolites of the Pupal Endoparasitoid *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and its Host *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), *JERS*, 2011b, **13**(3), 1-14.

Uçkan F., Soydabaş H. K., Özbek R., Effect Of Indol-3 Acetic Acid on the Biochemical Parameters Of *Achoria grisella* Hemolymph and *Apanteles galleriae* Larva, *Pak. J. Biotechnol*., 2014, **11**(2), 163-171

Uçkan F., Tüven A., Er A., Ergin E., Effects of Gibberellic Acid on Biological Parameters of the Larval Endoparasitoid *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae) *Annals of the Entomological Society of America.*, 2008, **101**(3), 593-597.

Ünyayar S., Topçuoğlu S. F., Ünyayar A., A Modified Method for Exraction and Identification of Indol-3-Acetic Acid (IAA), Gibberellic Acid (GA3), Abscisic Acid (ABA) and Zeatin Produced by Phanerochaete chrysosporium ME4461996, *Bulgarian Journal Plant Physiology*, 1996, **22**(3-4), 105-110.

Van Emden H. F., Plant Resistance to Aphids Induced by Chemicals, *J. Sci. Food Agr.*, 1969, **20**, 385-387.

Vilmos P., Kurucz É., Insect Immunity: Evolutionary Roots of the Mammalian Innate Immune System, *Immunology Letters*, 1998, **62**(2), 59–66.

Washburn J. O., Kirkpatrick B. A., Volkman L. E., Insect Protection Against Viruses, *Nature*, 1996, **383,** 767.

Weinheimer P. F., Evans E. E., Stroud R. M., Acton R. T., Comparative Immunology: Natural Hemolytic System of the Spind Lobster, *Panulirus argus* Painter B., *Proc. Sot. exp.Biol. Med*., 1969, **130**, 322-326.

Wiesner A., Wittwer D., Götz P., A Small Phagocytosis Stimulating Factor is Released by and Acts on Phagocytosing *Galleria mellonella* Haemocytes In Vitro, *J. Ins. Phys.*, 1996, **42**, 829-835.

Worthing C. R., Use of Growth Retardants on Chrysanthemums: Effect on Pest Populations, *J. Sci. Food Agr*., 1969, **20**, 394-397.

Yang Q., Zhou D., Sun L., Zhang D., Qian J., Xiong C., Sun Y., Ma L., Zhu C., Expression and Characterization of Two Pesticide Resistance-Associated Serine Protease Genes (NYD-tr and NYD-ch) from *Culex pipiens pallens* for Metabolism of Deltamethrin, *Parasitology Research*, 2008, **103**(3), 507–516.

Yeşilada E., Bozcuk,A. N., *Drosophila melanogaster*'in Yumurta Verimi Üzerine ABA ve Kinetinin Etkisi, *Tr. J. Biol*., 1995, **19**, 37-44.

Yıldız M., Gürkan O., Turgut C., Kaya Ü., Ünal G., Tarımsal Savaşımda Kullanılan Pestisitlerin Yol Açtığı Çevre Sorunları, *VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi*, Ankara, Türkiye, 3–7 Ocak 2005.

Yılmaz H. R., Yüksel E., İndol-3-Asetik Asit'in Üçüncü Nesil Sıçanların Kemik İliği Hücrelerinde Mitotik İndeks Üzerine Etkileri, *Süleyman Demirel Üniversitesi. Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005., **12**, 46-49.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Aksan B. G., Uçkan F., Ekrem E., Effects of Indole-3-Acetic Acid on the Hemolytic Activity of the Host *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera : Pyralidae) and Parasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae), *International Conference on Biological Sciences Biology*, Konya, Turkey, 21-23 October 2016.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Kandıra' da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kandıra' da tamamladı. 2006 yılında girdiği Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2012 yılında mezun oldu. 2013 yılında başlamış olduğu Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Yüksek Lisansına devam etmektedir.