

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**DOKTORA TEZİ**

**KONAĞA VERİLEN İNDOL-3-ASETİK ASİTİN VE KALİKS  
SIVISININ KONAK *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA:  
PYRALIDAE) VE PARAZİTOİD *Pimpla turionellae* L.  
(HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE) HEMOSİTLERİNE  
ETKİSİ**

**Serhat KAYA**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

Tezin Sunulduğu Tarih: **04.09.2015**

**Tez Danışmanı**

**Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN**

**ÇANAKKALE**

Serhat KAYA tarafından Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN yönetiminde hazırlanan ve 04/09/2015 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Konağa Verilen İndol-3-Asetik Asitin ve Kaliks Sıvısının Konak *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) be Parazitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Hemositlerine Etkisi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

## **JÜRİ**

Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN

.....

**Başkan**

Prof. Dr. Cahit AKGÜL

.....

**Üye**

Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ

.....

**Üye**

Prof. Dr. Z. Ulya NURULLAHOĞLU

.....

**Üye**

Doç. Dr. Olga SAK

.....

**Üye**

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu tez çalışması , Kocaeli Üniversitesi BAP birimi tarafından 2012/25 numaralı projeden desteklenmiştir.

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Serhat KAYA

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarımı yapmamı mümkün kılan ve bu alanda ihtiyacım olan tüm temel becerileri kazanmama olanak sağlayan değerli danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde yer alan ve tez çalışmam boyunca toplantılarda sabırla çalışmamı değerlendiren saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ ve Prof. Dr. Z. Ulya NURULLAHOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın deneysel aşamalarında yardımlarını gördüğüm Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerine ve öğretim elemanlarına sonsuz teşekkür ederim. Özellikle çalışmam sırasında değerli yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Serdar AKSAN ve Arş. Gör. Rabia ÖZBEK'e şükranlarımı sunarım. Laboratuvardaki rutin işlerin yürütülmesinde yardımlarını gördüğüm Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü lisans öğrencilerine de teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen ve yanımda olan aileme, geçirdiğim zorlu süreçlerde destek ve yardımlarını esirgemeyen, doktora eğitimimi devam ettirebilmeme yardımcı olan sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Necmi AKYALÇIN ve Yrd. Doç. Dr. Hanife AKYALÇIN'a ayrıca teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamı özenle ve sabırla kontrol ederek önerileri ile düzeltilmesinde emeği geçen sayın hocalarım Prof. Dr. Cahit AKGÜL ve Doç. Dr. Olga SAK'a emekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Tezin düzeltilmesinde ve kontrolünde emeği geçen ve bu süreçte yakın desteğini gördüğüm Burcu KUZZEY'e teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sürecinde bana hukuki destek vererek ve değerli dostluğunu sunarak her koşulda yanımda olan Kamil ÇALIŞAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Serhat KAYA

Çanakkale, Eylül 2015

## SİMGELER VE KISALTMALAR

g:	Gram
$\mu$ l :	Mikrolitre
ml :	Mililitre
ppm :	Milyonda bir
AO :	Acridine Orange (Akridin Turuncu Boyası)
BGD :	Bitki Gelişim Düzenleyicisi
DEK:	Dişi Eşdeğeri Kaliks
EB :	Etidium Bromide (Etidyum Bromür)
FBS:	Fetal Bovine Serum
GA <sub>3</sub> :	Giberellik Asit
IAA :	İndol-3-Asetik Asit
NaCl :	Sodyum Klorür
Na <sub>2</sub> EDTA:	Disodyum Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
NaOH :	Sodyum Hidroksit
PBS :	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
SH :	Standart Hata

## ÖZET

### KONAĞA VERİLEN İNDOL-3-ASETİK ASİTİN VE KALİKS SIVISININ KONAK *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) VE PARAZİTOİD *Pimpla turionellae* L. (HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE) HEMOSİTLERİNE ETKİSİ

Serhat KAYA

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN

04.09.2015, 98

İndol-3-asetik asit sentetik besin aracılığıyla ve kaliks sıvısı enjeksiyon yoluyla *Galleria mellonella* larvalarına verilerek hemosit sayısı, canlılığı, mitotik indeksi ve enkapsülasyon-melanizasyon tepkilerini nasıl etkiledikleri *in vivo* ve *in vitro* deneylerle incelendi. IAA ile yetiştirilmiş *G. mellonella* pupalarından elde edilen *Pimpla turionellae* larvalarında ise IAA'nın hemosit sayısında, hücre canlılığında ve mitotik indeksde neden olduğu değişimler *in vivo* ve *in vitro* deneylerle belirlendi.

IAA *G. mellonella* larvalarında kontrole göre hemosit sayısını tüm dozlarda artırırken enkapsülasyonda herhangi bir değişikliğe yol açmadı. Melanizasyonda ise kontrole göre 4. saatte melanize olmamışlarda 5000 ppm'de artma; güçlü melanizasyonda 50 ppm'de azalma, 24. saatte melanize olmamış boncuk sayısında 50 ve 1000 ppm'de artma olduğu tespit edildi. Apoptotik indeksde *in vitro*'da geç apoptotik hücre sayısının 1000 ve 5000 ppm'de azaldığı görüldü. IAA'nın bütün dozları *P. turionellae* larvalarında hemosit sayısını istatistiksel olarak önemsiz olsa da arttırdı. Ayrıca erken apoptotik hücre sayısı 1000 ppm dozunda artarken geç apoptotik hücre sayısının 50, 500 ve 10 000 ppm dozlarında arttığı görüldü. IAA'nın mitotik indeksde 50, 1000 ve 10 000 ppm dozlarında artışa yol açtığı belirlendi.

Kaliks sıvısı *G. mellonella* larvalarında hemosit sayısı ve enkapsülasyon tepkilerini kontrole göre tüm dozlarda düşürdü, enkapsüle olmamış boncuk sayısını arttırdı ve melanizasyonu azalttı. Ayrıca kaliks sıvısı canlı hücre sayısını azaltırken, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre sayısını da arttırdı. Kaliks sıvısının yüksek dozları ise mitotik indekste azalmaya yol açarken mikroçekirdek oluşumunda artmaya neden oldu.

**Anahtar Kelimeler:** *Galleria mellonella*, *Pimpla turionellae*, Hemosit, Apoptosis, Enkapsülasyon, *in vivo*, *in vitro*.

## ABSTRACT

### EFFECTS OF INDOLE-3-ACETIC ACID AND CALYX FLUID ON THE HEMOCYTE OF HOST *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) AND PARASITOID *Pimpla turionellae* L. (HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE)

Serhat KAYA

Canakkale Onsekiz Mart University

Graduate School

Chair for Biology Thesis of PhD

Advisor: Assist. Prof. Dr. Fevzi UÇKAN

04.09.2015, 98

Indole-3-acetic acid given through synthetic nutrients and injected calyx fluid of *Galleria mellonella* individuals, the number of hemocytes, viability, mitotic index and its impact on encapsulation reaction were investigated with *in vivo* and *in vitro* experiments. Effects of IAA in the number of hemocytatic changes, cell viability and mitotic index were examined *in vivo* and *in vitro* experiments of *Pimpla turionellae* larvae obtained from *G. mellonella* pupae.

All doses of IAA increased of hemocyte count at *G. mellonella* larvae compared to control, but have no effects on encapsulation response. There was an increase at 5000 ppm dose at 4th hour in non-melanised by compared to control; there is a strong decrease in melanization at 50 ppm, and an increase at 50 and 1000 ppm doses in non-melanised beat count in 24 hour. It was found in apoptotic index a decrease in the number of late apoptotic cells at 1000 and 5000 ppm in *in vitro* experiments. All doses of IAA increased the number of hemocyte in *P. turionellae* larvae but this increase was statistically unimportant. In addition, the dose of 1000 ppm, while increasing the number of early apoptotic cells; 50, 500 and 10 000 ppm doses increased the number of late apoptotic cells. IAA causes an increase in mitotic index at 50, 1000 and 10 000 ppm doses.

Calyx fluid in *G. mellonella* larvae decreased hemocyte count and encapsulation response compared to control, but increased non-encapsulated bead count and decreased melanisation. Furthermore, calyx fluid reduce viable cell count, but enhance number of early apoptotic, late apoptotic and necrotic cell. The calyx of the high doses caused a reduction in mitotic and micronuclei indexes.



**Keywords:** *Galleria mellonella*, *Pimpla turionellae*, Hemocyte, Apoptosis, Encapsulation, *in vivo*, *in vitro*.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ SINAV SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
BÖLÜM 1 – GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	13
2.1. Apoptoz.....	13
2.2. Kaliks .....	14
2.3. Hücre Kültürü.....	17
2.4. Indol-3-Asetik Asit .....	18
2.5. <i>Galleria mellonella</i> .....	20
2.6. <i>Pimpla turionellae</i> .....	22
BÖLÜM 3 – MATERYAL VE YÖNTEM .....	25
3.1. Konak.....	25
3.2. Parazitoid.....	25
3.3. Uygulanma.....	26
3.4. Kaliks Sıvısı.....	26
3.5. Hemosit.....	28
3.5.1. IAA'nın hemosit sayısına etkisi.....	28
3.5.2. IAA'nın <i>P. turionellae</i> hemosit sayısına etkisi.....	30
3.5.3. Kaliks sıvısının hemositlere etkisi.....	30
3.6. Enkapsülasyon ve Melanizasyon.....	31
3.7. Apoptotik İndeks, Mitotik İndeks ve Mikroçekirdek.....	34
3.8. İstatistik.....	35
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	36
4.1. Hemosit Sayısı.....	36
4.1.1. IAA'nın toplam hemosit sayısına etkisi.....	36
4.1.2. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> toplam hemosit sayısına etkisi.....	39

4.1.3. IAA'nın <i>P. turionellae</i> toplam hemosit sayısına etkisi .....	43
4.2. <i>G. mellonella</i> Hemositlerinin Enkapsülasyon ve Melanizasyonu.....	44
4.2.1. IAA'nın enkapsülasyona etkisi .....	44
4.2.2. IAA'nın melanizasyona etkisi .....	47
4.2.3. Kaliks sıvısının enkapsülasyona etkisi .....	50
4.2.4. Kaliks sıvısının melanizasyona etkisi .....	55
4.3. Apoptotik İndeks, Mitotik İndeks ve Mikroçekirdek.....	57
4.3.1. IAA'nın <i>G. mellonella</i> hemositlerinde apoptotik indekse etkisi.....	57
4.3.2. Kaliks Sıvısının <i>G. mellonella</i> hemositlerinde apoptotik indekse etkisi.....	61
4.3.3. IAA'nın <i>P. turionellae</i> hemositlerinde apoptotik indekse etkisi.....	66
4.3.4. IAA'nın <i>G. mellonella</i> mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi..	68
4.3.5. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi.....	70
4.3.6. IAA'nın <i>P. turionellae</i> mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi..	72
BÖLÜM 5 – SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	74
KAYNAKLAR.....	79
ÖZGEÇMİŞ.....	I

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 3.1. <i>Pimpla turionellae</i> ovaryumu .....	27
Şekil 3.2. Neubauer hemositometre lamı .....	28
Şekil 3.3. Neubauer hemositometresi sayım alanı .....	29
Şekil 3.4. Enkapsülasyon durumları .....	33
Şekil 4.1. IAA'nın <i>G. mellonella</i> toplam hemosit sayısına etkisi ( <i>in vivo</i> ) .....	37
Şekil 4.2. IAA'nın <i>G. mellonella</i> toplam hemosit sayısına etkisi ( <i>in vitro</i> ) .....	38
Şekil 4.3. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> toplam hemosit sayısına etkisi ( <i>in vivo</i> ) .....	41
Şekil 4.4. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> toplam hemosit sayısına etkisi ( <i>in vitro</i> ).....	43
Şekil 4.5. IAA'nın <i>P. turionellae</i> toplam hemosit sayısına etkisi .....	44
Şekil 4.6. IAA'nın <i>G. mellonella</i> enkapsülasyona etkilerinin 4. saat sonuçları .....	46
Şekil 4.7. IAA'nın <i>G. mellonella</i> enkapsülasyona etkilerinin 24. saat sonuçları .....	46
Şekil 4.8. IAA'nın <i>G. mellonella</i> 4. saat melanizasyonuna etkisi .....	49
Şekil 4.9. IAA'nın <i>G. mellonella</i> 24. saat melanizasyonuna etkisi .....	49
Şekil 4.10. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> 'nın 4. saat enkapsülasyonuna etkisi .....	53
Şekil 4.11. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> 'nın 24. saat enkapsülasyona etkisi .....	53
Şekil 4.12. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> 4. saat melanizasyonuna etkisi .....	56
Şekil 4.13. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> 24. saat melanizasyonuna etkisi .....	56
Şekil 4.14. IAA'nın <i>G. mellonella</i> apoptotik indeksine etkisi ( <i>in vivo</i> ) .....	59
Şekil 4.15. IAA'nın <i>G. mellonella</i> apoptotik indeksine etkisi ( <i>in vitro</i> ) .....	61
Şekil 4.16. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> apoptotik indeksine etkisi ( <i>in vivo</i> ) .....	63
Şekil 4.17. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> apoptotik indeksine ( <i>in vitro</i> ) .....	65
Şekil 4.18. IAA'nın <i>P. turionellae</i> apoptotik indeksine etkisi .....	67

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 4.1. IAA'nın <i>G. mellonella</i> toplam hemosit sayısına etkisi ( <i>in vivo</i> )....	37
Çizelge 4.2. IAA'nın <i>G. mellonella</i> toplam hemosit sayısına etkisi ( <i>in vitro</i> )....	38
Çizelge 4.3. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> toplam hemosit sayısına etkisi ( <i>in vivo</i> ).....	41
Çizelge 4.4. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> toplam hemosit sayısına etkisi ( <i>in vitro</i> ).....	42
Çizelge 4.5. IAA'nın <i>P. turionellae</i> toplam hemosit sayısına etkisi.....	44
Çizelge 4.6. IAA'nın <i>G. mellonella</i> Enkapsülasyonuna etkisinin 4. ve 24. saat sonuçları.....	47
Çizelge 4.7. IAA'nın <i>G. mellonella</i> melanizasyonuna etkisinin 4. ve 24. saat sonuçları.....	50
Çizelge 4.8. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> 'nın Enkapsülasyonuna etkisinin 4. ve 24. saat sonuçları.....	54
Çizelge 4.9. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> 'nın Melanizasyonuna etkisinin 4. ve 24. saat sonuçları.....	57
Çizelge 4.10. IAA'nın <i>G. mellonella</i> apoptotik indeksine etkisi ( <i>in vivo</i> ).....	59
Çizelge 4.11. IAA'nın <i>G. mellonella</i> apoptotik indeksine etkisi ( <i>in vitro</i> ).....	61
Çizelge 4.12. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> apoptotik indeksine etkisi ( <i>in vivo</i> ).	64
Çizelge 4.13. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> apoptotik indeksine etkisi ( <i>in vitro</i> )	66
Çizelge 4.14. IAA'nın <i>P. turionellae</i> apoptotik indeksine etkisi.....	67
Çizelge 4.15. IAA'nın <i>G. mellonella</i> mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi ( <i>in vivo</i> ).....	68
Çizelge 4.16. IAA'nın <i>G. mellonella</i> mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi ( <i>in vitro</i> ).....	70
Çizelge 4.17. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi ( <i>in vivo</i> ).....	71
Çizelge 4.18. Kaliks sıvısının <i>G. mellonella</i> mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi ( <i>in vitro</i> ).....	72
Çizelge 4.19. IAA'nın <i>P. turionellae</i> mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi.....	73

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Dünya nüfusundaki artış, mevcut doğal kaynakların etkin kullanılmaması, değişen yaşam şekilleri ve standartları gibi pek çok etken dünyanın doğal kaynaklar bakımından taşıma kapasitesinin aşılmasına neden olmuştur (Gürlük ve Turan, 2008). T. Robert MALTHUS (1766-1834) demografi için çok önemli kuralları ortaya koyan "Nüfus Artışı Hakkındaki Araştırma"sı ile nüfusun geometrik, üretimin ise aritmetik artacağı ve bu sebeplerle yirminci yüzyılda insanlığın açlık tehlikesi ile karşı karşıya kalacağını savunmuştur (Malthus, 1798). Bu durum yirminci yüzyılda gerçekleşmemiş olsa da günümüzde çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde yaşayan 800 milyon insanın yetersiz beslendiği çeşitli kuruluşların çalışmaları ile tespit edilmiştir. Beslenme ve açlık sorununun asgari seviyeye çekilmesi sadece gıda üretimi ile değil, aynı zamanda nitelikli ürün ile mümkün olabilecektir. Artan nüfusun ihtiyaç duyacağı besinlerin üretimi için, günümüzde var olan üretim kapasitesinin yakın bir gelecekte iki veya üç katına çıkması gerekecektir. Tarımsal üretime uygun alanların son sınırına ulaşılmış olması nedeni ile nüfus artışı ile birlikte kişi başına düşen tarımsal alan hızla azalmaktadır. Nitelikli gıda üretimi; var olan tarımsal alanların büyütülmesi (ekolojik ve sosyal nedenlerle) mümkün olamayacağından, mevcut alanların üretim kapasitesinin artırılması ve bu alanlarda nitelikli ürün eldesi ile sağlanabilir. Geçtiğimiz yüzyılda genetik biliminde sağlanan ilerlemenin bitki ve hayvan ıslahında kullanılması ile yüksek verimli gıda ürünlerinin temin edilmesi olası hale gelmiştir. Ayrıca tarımda daha çok mekanik aletlerin kullanılması, yaygın gübre kullanımı, yeni sulama tekniklerinin geliştirilmesi ve zararlı mücadelesi gıda üretiminde %100'e varan artışların sağlanmasına yol açmıştır (Ağaoğlu ve ark. 2003). Tüm bu gelişmelere karşın insanlığın içerisinde bulunduğu sağlıklı ve taze gıdaya ulaşma sıkıntısı devam etmektedir.

Günümüzde üretilen besinler, zararlılara karşı uygulanan mücadele yöntemlerinde kullanılan pestisitler ve biosidal ürünlerin kullanımına bağlı olarak, gittikçe besin değerini yitirmekte ve sağlıklı bir yaşam için gerekli olan ihtiyaçları karşılayamamaktadır. Pestisit ve biyosidallar zararlı veya istenmeyen hayvan, bitki, mantar, zararlılara yol açan virüs veya bakteri gibi zararlıların kontrolünde kullanılan kimyasallar veya organizmalardır (Pellizzato, 2014). Zararlı mücadelesinde büyük oranda kullanılan pestisitler ve biyosidallar kullanım amaçlarına göre sınıflandırılmaktadır. Pestisitler kullanım alanlarına göre dokuz sınıfa ayrılabilir ve daha çok tarımsal ürünleri korumaya yöneliktirler. Bu sınıflar; İnsektisit,

Herbisit, Fungusit, Akarisit, Rodentisit, Nematisit, Molluskisit, Bakterisit ve Virisit'dirler (Tiryaki ve ark. 2010). Pestisitlere benzer şekilde biyosidallar da kullanım alanlarına göre sınıflandırılırlar ve bitki dışı kullanımla alakalıdır. Biyosidallar; dezenfektanlar, ahşap koruyucular, rodentisitler, insektisitler ve çürüme önleyiciler gibi grupları içerirler. Hem pestisitlerin hem de biyosidalların olası hedef organizma aralığı çok geniştir. Pestisitler genellikle püskürtme yöntemiyle uygulansa da biyosidalların; püskürtme, granül halde, burğu halde, fumigasyon ve yapışkan şeritler gibi farklı uygulama yöntemleri vardır (Pellizzato, 2014).

Pestisit ve biyosidallar uygun şekilde kullanılmadıklarında veya kaza eseri ortama yayıldıklarında belirgin su ve toprak kirliliğine neden olabilmektedirler. Herhangi bir şekilde yeraltı veya yüzey sularına çok küçük dozda dahi bulaşırlarsa, yıkıcı etkileri olur. Bu nedenle yeni bir pestisit veya biyolojik ürün piyasaya sürülmeden önce hedefleri olmayan organizmalara olası etkileri incelenmelidir. Kullanımda olan ürünlerin ise periyodik olarak güvenlik standartlarına uymaya devam edip etmediği takip edilmelidir. Doğal yaşamda ve çevreye olası etkilerinin risk değerlendirmeleri hassasiyetle yapılmalıdır (Pellizzato, 2014).

Avrupa Birliği düzenlemelerine göre biosidal ürünlerin; “insan ve hayvan sağlığını tehdit eden organizmaların kontrolü; doğal ve üretilmiş ürünlerde zarar oluşturan organizmaların kontrol altında tutulmasında önemlidir. Ancak, biosidal ürünler onların içsel özellikleri ve kullanım özellikleri ile ilişkili olarak insanlar, hayvanlar ve çevre için riskler oluşturabilir” olduğu anlaşılmaktadır (Michalak ve Chojnacka, 2014).

Biyosidal aktivitesi birkaç faktörden etkilenmektedir. Bunlar; konstrasyon, temas süresi, pH, ısı ve karışan veya arttırılan materyal veya bileşiğin içeriği, yanında mikroorganizmaların (maya, bakteri, spor veya protozoa) sayısı, doğası, lokasyonu ve kondisyonu ile ilgilidir (Michalak ve Chojnacka, 2014).

Biyosidallar dört ana grup altında toplanan birçok alt gruba ayrılmışlardır. İlk grup dezenfektanlar, insan ve veteriner hijyeni için kullanılan ve özel alanların, halk sağlığı alanlarının beslenme ve besleme alanları ile içme suyunun dezenfeksiyonu için kullanılan genel biyosidal ürünleri içermektedir. İkinci grup biyosidallar koruyucularla alakalıdır. Bu altgrup in-can koruyucu; film koruyucular (biofilmler); ahşap koruyucu; deri, fiber, lastik ve polimer materyal koruyucu gibi koruyucu ürünlerin bulunduğu gruptur. Üçüncü grup biyosidallar, zararlıları kontrol edebilme yeteneğinde olanlardır. Silimisidler, rodentisidler, avisidler, mollussisidler, pissisidler, insektisitler, akarisidler ve diğer omurgasızlar,

algisidler ve benzeri grupları kontrol altında tutan ürünler bu grupta yer almaktadır. Dördüncü ve son grupta yer alan biyosidallar ise besin ve yem stoklarını koruyan koruyucular, çürüme önleyiciler, tahnit ve hayvan doldurma da kullanılan sıvılardır. Bunlar genel olarak bioaktif moleküllerin salınımını kontrol altında tutarak çürümeyi önleyen biyosidallar olarak bilinirler (Michalak ve Chojnacka, 2014).

Bu kimyasalların kullanımı sonucunda çok bilinen DDT örneğinde olduğu gibi, bu kimyasallara karşı zararlılar direnç geliştirmekte ve yararlı böcek türleri de bu kimyasal mücadeleden olumsuz etkilenmektedir (Çakır ve Yamanel, 2005). Direnç gelişimi, kullanılan doz miktarının sürekli arttırımını veya başka bir kimyasal kullanımını gerektirecektir (Greathead ve Waage, 1983; Cox, 1996; Lee ve ark., 1996; Andow ve ark., 1997; Ahmad ve ark., 1997; Montagna ve ark., 1999; Soderlund ve Knipple, 1999; Ribeiro ve ark. 2003; Vural, 2005). Kullanılan biositlerin (pestisit ve biyosidal) kalıntıları alınan besinler yolu ile insanlara ulaşır ve çeşitli dokularda birikir. Biositler teratojen, kanserojen ve mutajen etkileri yanında bazı ölümcül hastalıklara veya kalıcı hasarlara yol açabilmektedir (Greathead ve Waage, 1983; Fenemore, 1984; Ecevit, 1988; Cox, 1996). Bu nedenle kimyasal mücadelenin yerini alabilecek yeni yöntemlere gereksinim vardır (Erol ve Kılınçer, 1986). Bu gereksinimi karşılamak için, 1980 yılı sonrasında gelişmiş ülkelerde “Entegre Zararlı Yönetimi” (IPM) adıyla bir sistem oluşturulmaya başlanmıştır (Elad ve Shtienberg, 1995; Hillocks, 1995; Sierpińska, 1998; Öncüer, 2000; Edge ve ark., 2001; Takada ve ark., 2001; Xu ve ark., 2001b). Entegre Zararlı Yönetimi denildiğinde kastedilen, tarım zararlılarına karşı mücadelede kullanılan yöntemlerden yararlanırken bunlar arasında insan ve çevreye en az etkisi olacak olan yöntemlerin kullanılması anlaşılmaktadır (Delen ve ark., 2005; Delen ve ark., 2010). IPM programının temel unsurları, zararlılara dayanıklı bitkilerin üretilmesi ve zararlıların doğal düşman popülasyonlarının arttırılmasıdır (Rosen, 1985).

Zararlı kontrolünde kemosterilant olarak Bitki Gelişim Düzenleyici’lerinin (BGD) kullanılması giderek artmaktadır (Mickel, 1978; McDonald ve ark.,1988; Silva ve ark., 2003; Paulson ve ark., 2005). Ancak BGD’lerin kullanımı biositlere benzer tarzda hedeflenen zararlılar dışında yararlı canlıları da etkileyecektir. Özel bir hedefe yönelik olarak üretilmeyen pestisit ve biositler, kullanıldıkları ortamda yaşayan tüm canlıları nasıl etkiliyorsa, BGD’ler de kullanıldıkları ortamda özel bir hedefe yönelik çalışmadığı için benzer bir etkiye yol açacaktır. *Drosophila melanogaster* Meig. (Diptera: Drosophilidae) ve *Bactrocera cucurbitae* Coquillet (Diptera: Tephritidae) ile yapılan çalışmalarda İndol-3-



asetik asit (IAA), absisik asit (ABA), kinetin, gibberellik asit, kumarin gibi BGD'lerin böcek üreme ve gelişmesi üzerinde toksik etkileri olduğu saptanmış ve bu kimyasalların IPM programlarında insektisit olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (Harris, 1983; Özmen ve ark., 1995; Yeşilada ve Bozcuk, 1995; Kaur ve Rup, 2000). BGD'lerin ekotoksik etkilerinin yanında canlılar üzerine metabolik ve fizyolojik etkilerinin de araştırılması en az biositlerin araştırılması kadar önem taşımaktadır.

Tarım zararlılarına karşı kullanılan BGD'ler sadece hedef türleri değil, onların doğal düşmanlarını (parazitoidler ve predatörler) ve ekosistemlerin diğer biyolojik elemanlarını da etkilemektedirler (Cox, 1996; Ribeiro ve ark., 2001; Xu ve ark., 2001a; Xu ve ark., 2001b). Çevresel kirleticilere (özellikle pestisitlere) karşı parazitoid türler genellikle konak türlere oranla daha hassastırlar (Büyükgüzel, 2006; Uçkan ve ark., 2007). Çünkü; parazitoidler erginleşmeden önceki yaşam evrelerini tamamlayabilmek için farklı böcek takımlarına ait türlerin yumurta (Doutt, 1959; Hamerski ve Hall, 1988), larva (Obrycki ve ark., 1985; Peter ve David, 1990; Şengonca ve Peters, 1993; Ramadan ve ark. 1995), prepupa (Gülel, 1982; Wharton 1993), pupa ya da erginlerini (Kansu ve Uğur, 1984) konak olarak kullanmaktadırlar. Parazitoidler, ergin evrelerinde besinlerini çiçek özlerinden ve nektarlardan sağlamaktadırlar. Bu çok çeşitli konak kullanımı ve beslenme şekilleri parazitoidlerin çevresel kirleticilere daha çok ve farklı noktalardan maruz kalmalarına neden olmaktadır (Büyükgüzel, 2006).

Tarım zararlılarının kontrolünde çevreye verilen zararı en aza indirmenin en etkili yollarından birisi de biyolojik mücadeledir, böylelikle de tarım ürünleri üzerinde mümkün olduğunca az kimyasal kalıntı kalması sağlanabilir; bu da çevre ve insan sağlığının daha az tehlike altında olması açısından son derece önemlidir (Greathead ve Waage, 1983; Harris, 1983; Erol ve Kılınçer, 1986; Takada ve ark. 2001; Wells ve ark. 2001; Xu ve ark. 2001b; Simmonds ve ark. 2002). Biyolojik mücadele ile kast edilen; doğada var olan zararlılara karşı, onların doğal düşmanlarının kullanılması ile zararlının kontrol altına alınmasıdır. Biyolojik kontrolde, baskılama aracı olarak kullanılan türler, "biyolojik ajan" olarak tarif edilmektedir (Hajek, 2004).

Biyolojik mücadelede, zararlı tür ile onun doğal düşmanlarının biyolojik ve ekolojik özelliklerinin bilinmesi son derecede önemlidir ve ancak bu yolla başarı kazanılabilir. Bu bağlamda en sık kullanılan biyolojik ajanlar parazitoid türlerdir; çünkü spesifik etkileri vardır ve çevreye olan etkileri minimum düzeydedir (Andow ve ark., 1997; Xu ve ark.,

2001a). Bu nedenle de konak ve parazitoid türün ekolojik, davranışsal, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin birbirleriyle ilişkilerinin ortaya çıkartılması gerekmektedir. Bu fizyolojik ilişkilerin en önemlisi, parazitoid yumurtalarının konak bağışıklık sistemi ile olan ilişkileridir. Çünkü parazitoid yumurtasını konağının vücuduna bıraktığında yumurta, konak bağışıklık sistemine maruz kalmaktadır. Parazitoid türlerin dahil olduğu Ichneumonoidea süperfilyasında yaklaşık 41.000 tür bulunmaktadır (Quickle, 2015).

BGD'ler arasında oksinler, bitkilerdeki büyüme ve gelişmeyi sağlayan en önemli gruptur. Oksinler arasında da IAA en önemli hormondur ve yapısal olarak  $C_{10}H_9NO_2$  formülündedir. İndol-3-asetik asit çoğunlukla bitkilerde verimin artırılmasında kullanılan önemli bir bitki gelişim hormonudur. Bu hormon bitkilerde, mikroorganizmalarda ve memeliler de dahil olmak üzere hayvanlarda sentezlenmektedir (Lins ve ark., 2006). Son yıllarda zararlı mücadelesinde çok yaygın olmamakla birlikte kemosterilant olarak da kullanılmaktadır. Ancak kullanılıp-kullanılmaması henüz tartışılmaktadır. Bu kadar sık kullanılan maddenin zararlı tür ve bu türün doğal düşmanı üzerine etkilerinin anlaşılması, zararlılarla mücadelede ve ekolojik dengenin korunmasında büyük önem taşımaktadır. İndol-3-Asetik Asit'in doğal bir hormon olarak canlılarda sentezlenebiliyor olması ve kemosterilenat olarak BGD'lerin kullanılması nedeniyle konak ve parazitoidin hemositleri üzerine etkilerinin incelenmesi oldukça önemlidir.

Kaliks sıvısının parazitoid türlerde zehrin etkisini arttırmak ve bağışıklık sistemini baskılamak gibi bir göreve sahip olduğu düşünülmektedir. Ovaryumun hemen altında bulunan bezlerden salgılanan kaliks sıvısının içeriği genel olarak proteinden oluşmaktadır (Strand and Dover 1991) . Bazı Bracionid ve Ichneumonoid türlerinde kaliks sıvısı VLP, PDV etmenlerini içerebilir (Kitano ve Nakatsuji, 1978; Edson ve ark., 1981; Stoltz ve Vinson, 1987). PDV'ler Polydnviridae familyasında Bracovirus ve Ichnovirus genusları altında sınıflandırılmaktadırlar (Fauquet ve ark, 2015). Kaliks sıvısına ait çalışmalar son yıllarda artmaktadır.

Parazitik yaban arılarının parazitizimlerinin başarısı konaklarının bağışıklık sistemlerinin başarılı bir şekilde baskılamalarına bağlıdır (Rivers ve ark, 2002). Böceklerde bağışıklık sistemi humoral ve hücrel bağışıklık olmak üzere iki tiptir (Wiesner ve ark, 1996; Lavine ve Strand, 2002; Marmaras ve Lampropoulu, 2009). Hemosit aracılı hücrel yanıtlar; fagositoz, enkapsülasyon ve nodülasyonu içermektedir (Gandhe ve ark, 2007; Marmaras ve Lampropoulu, 2009). Antimikrobiyal peptidleri ve melanizasyonu içeren

humoral yanıtlar, profenoloksidaz kaskadının hızlı aktivasyonu ile indüklenerek hazırlanır (Hoffman ve Reichhart, 2002; Cerenius ve Soderhall, 2004).

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 kutikulaya aktif olarak taşınır veya yara çevresi ile enkapsüle olmuş parazitin çevresine biriktirilir (Vilmos ve Kurucz, 1998). *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) profenoloksidazı, diğer arthropod türlerinininki ile birlikte  $\alpha$ -makroglobülinlerin tiol ester bölgesi ile tamamlayıcı proteinler olan C3 ve C4'üne benzer sekanslar içeren kısa düz aminoasit dizisi taşır (Hall ve ark., 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 ark., 2002). Eklem bacaklıların 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 ark., 2002). Pıhtı oluşumu lepidoptera türlerindeki iki hemosit tipinde, plazmatomosit ve granülositte, yoğun olarak çalışılmıştır (Theopold ve ark., 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 ark., 2004).

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

**Fagositoz** süreci, böceklerin gelişimi ve hayatta kalmaları için temel öneme sahiptir (Rosales, 2011). Fagositoz, birçok protozoa ve bütün metazoa filumlarında görülen, büyük oranda korunmuş hücresel yanıttır (Lavine ve Strand, 2002). Fagositoz böceklerde, çeşitli patojenlere (bakteri, mantar, protozoalar ve hatta virüsler) karşı hemositlerin verdiği temel tepkilerden birisidir (Lavine ve Strand, 2002; Ribeiro ve Brehelin, 2006). Fagositoz süreci, cognate reseptörleri ile hedef cismin bağlanması ile başlar. Bu bağlanma, fagozom oluşumunu düzenleyen kaskadaz sinyalini aktive eder ve hedef aktin polimerizasyonuna bağlı mekanizma ile hedef yutulur. Fagozom; efektör moleküllerin vesikül ile birleşme olayı sonucunda tanıtıldığında fagolizom içinde olgunlaşır. Ardından bu efektör moleküller hedefi bozar ve/veya öldürür. Böcek hemositlerinde fagositoz mekanizması henüz tam olarak çalışılmamıştır.

**Nodülasyon**, çok sayıda bakterinin yol açtığı enfeksiyonlara karşı baskın bir hücresel yanıttır (Rosales, 2011). Nodülasyon çok sayıda bakteriyi yakalayan, çok hücreli hemositik agregat anlamına gelmektedir (Rosales, 2011). Nodülasyon, yabancı cisim ile hemosit yüzey tanıma proteinlerinin birbirlerine bağlanmalarını gerektirir (Lavine and Strand, 2002). Nodül oluşumu, birçok böcek türünde eikosanoidler, profenoloksidaz ya da dopa dekarboksilaz ile ilgili gözükmemektedir (Lavine and Strand, 2002; Stanley ve ark., 2009). Hemositlerin küçük agregatlar halinde bakterileri yakalamalarının üzerine, yeni hemositler eklenerek nodül büyür (Rosales, 2011).

**Enkapsülasyon** parazit, protozoa ve nematod gibi büyük hedeflere hemositlerin bağlanması anlamına gelmektedir (Rosales, 2011). Hedeflerine bağlandıktan sonra hemositler yabancı cismin etrafında, sonucunda melanizasyonun eşlik ettiği çok katmanlı kapsül oluşturur. Kapsül oluşumu ile yabancı cisim ROS ve RNS gibi lokal sitotoksik serbest radikaller tarafından öldürülür veya boğulur (Nappi ve ark., 2009). Enkapsülasyon hedefi biyotik faktörler (metazoa parazitleri, nematodlar ve parazitoid larvaları) olabildiği gibi (Pech ve Strand; 1996) deneysel amaçla enjekte edilen abiyotik faktörler (kromatografi boncukları vb) de olabilir (Wiesner, 1992; Jiravanichpaisal ve ark., 2006). Kapsül morfolojisi taksonlar arasında benzerlik göstermektedir. Ancak türler arasında kapsülün oluşum hızı, kapsül oluşumuna katılan hücreler ve kapsül oluşumu sonrası melanizasyonun olup olmaması gibi durumlara göre farklılıklar ortaya çıkmaktadır (Schmidt ve ark., 2001). Yapılan çalışmalar, granülosit ve plazmatositlerin enkapsülasyon tepkisi için gerekli olduğunu ve yabancı cisime ilk bağlananın granülositler olduğunu göstermektedir (Pech ve Strand, 1996; Lavine ve Strand, 2002). Levin (2007), *M. sexta* ile yaptığı çalışmada enkapsülasyonun oluşum sürecini;

- a. Hemositler, tesadüf eseri veya kemotaksi ile hedefle temas geçer,
- b. Granülositler yabancı cisime tutunarak hücre içeriklerini dış ortama verir (degranülasyon),
- c. Granülosit içeriği hedef cisimin yüzeyine tutunur,
- d. Granülositlerden salınan içerik diğer granülositler ve plazmatositleri yabancı cisimin etrafına toplar,
- e. Plazmatositler, yabancı cisimin etrafında yassılaşılarak çok hücreli katman oluşturmaya başlar,
- f. Yapışan immünositler arasındaki hücreler arası boşluk, elektron yoğunluğunda madde ile dolar,

- g. Hedefe yapışan ilk granüositler parçalanır,
- h. İkinci ince granüositlerden oluşan hücre tabakası, kapsülün etrafını sarar,
- i. Kapsül melanize olur, şeklinde tarif etmektedir.

Hücrel enkapsülasyonun ilk olayları, yabancı cisimin vücuda girmesinin hemen ardından dakikalar içerisinde gerçekleşir. Granüler hücreler ilk dakikada yabancı cisime yapışır ve ardından ilk beş dakika içerisinde ilk hücre tabakası yabancı cisimin etrafında oluşur (Levin, 2007). Parazitoidler, bu tip hücrel bağışıklık tepkilerinden kaçınmak için, iki tip strateji geliştirmişlerdir. Bunlar:

- 1- Enkapsülasyondan aktif kaçınma. Bu stratejide parazitoid ya konak hemositlerinde apoptozis olayını tetikler ya da hemositlerin fonksiyonunun bozulmasına yol açar.
- 2- Enkapsülasyondan pasif kaçınma. Enkapsülasyondan kaçınmak için parazitoidler konaklarının aktif bağışıklık sisteminin zayıf olduğu (pupa evresi gibi) bir gelişme döneminde yumurtalarını bırakır ve gelişmelerini sağlar. Bunun olmadığı durumlarda konak bağışıklık hücrelerinin erişemediği bir yere (beyine yakın bir yer) yumurtalarını bırakır veya yumurtalarının yabancı olarak tanımlanmasını engelleyen yüzey proteinleri vardır.

Hemositler omurgasız hayvanlarda dolaşım sıvısında yer alan hücrelerin genel adıdır. Hemositler böcek ve diğer omurgasızları vücutlarına giren parazit ve patojenlerden korumada temel bir rol oynamaktadır (Pech ve Strand, 1996). Ribeiro ve Brehelin (2006)'e göre şu ana kadar çalışılan Lepidoptera türlerinin hemolenfinde dolaşımda olan dört temel tip hücre bulunmaktadır. Bunlar; plazmatositler, granüositler (granüler hemositler), önositoidler ve sferüositlerdir. Diğer bazı araştırmacılar (Gupta, 1985; Vilmos ve Kurucz, 1998; Schmidt ve ark., 2001; Yamashita ve Iwabuchi, 2001; Lavine ve Strand, 2002; Turnbull ve ark., 2004), bu hücreler arasına prohemositleri de eklemektedirler. Lavine ve Strand (2002)'a göre prohemositler diğer söz konusu hemositlerin bir veya birkaçına dönüşebilen kök hücreler olduğu hipotezi vardır. Hoffmann ve ark. (1979), Ratcliff ve ark. (1985) ve Tepass ve ark. (1994) gibi araştırmacılar hemositlerin böceklerde ilk olarak embriyogenez boyunca başın dorsal mezoderminden geliştiğini belirtmişlerdir. Böcekler ayrıca larval veya nimf aşamaları boyunca da mezodermal kökenli hematopoietik organlarda yer alan kök hücrelerin bölünmesi ve/veya dolaşımdaki hemositlerin bölünmesi ile hemosit üretmeye devam etmektedirler (Ratcliff ve ark., 1985). *G. mellonella* da hematopoietik organ bulunmamaktadır (Jones ve Liv, 1968).

**Prohemositler** sitolojik özelliklerine göre isimlendirilmiş olup, bazı araştırmacılar tarafından diğer hemositlerin kaynağı olarak görülmektedir. Bu düşüncenin doğruluğunun belirlenebilmesi için daha fazla çalışma yapılmalıdır. Tipik olarak yuvarlak şekilli küçük hücrelerdir ve nükleusları hücreye oranla çok büyüktür (Ribeiro ve Brehelin, 2006). Endoplazmik retikulum (granüllü ve granülsüz), mitokondri ve golgi aygıtı gibi organellerinin sayısı azdır (Levin, 2007). Prohemositlerde, mikrotübüller ve sentiroller gözlemlendiği için, mitotik hücreler oldukları öne sürülmektedir (Levin, 2007).

**Plazmatositler** büyüklükleri değişken olan polimorfik hücrelerdir. Çoğunlukla sferik, bazen de iğ gibi bir yapı gösterip boyları 20 µm'den fazla olabilir (Ribeiro ve Brehelin, 2006). Ribeiro ve Brehelin (2006)'e göre transmisyon elektron mikroskobunda birkaç yalancı ayak (pseudopod), pinositik vezikül ve polizom (poliribozom) sayısı kadar boş veziküller gözlemlenmiştir. Birçok lepidopter türünde sitoplazmasında granül bulunmazken (Ribeiro ve ark, 1996), *G. mellonella*'da bulunabilir (Schmidt ve Ratclif, 1977). Ribeiro ve Brehelin (2006) çalışmalarında bu alanda çalışan tüm araştırmacıların plazmatositlerin enkapsülasyon ve nodül oluşumunda işlevsel olduğu konusunda hemfikir olduklarını belirtmiştir.

**Granülositler** sitoplazmaları granül içeren, hücre boyuna oranla küçük nükleuslu, genellikle oval bazen de siferik yapıda olan 4-45 µm boyutta olabilen hücrelerdir. Transmisyon elektron mikroskobu ile yapılan incelemede tiftikli materyalle dolu genişlemiş sisternalarda gelişmiş granüler endoplazmik retikulum, çok sayıda pinositik vezikül ve çoğunlukla ince ve uzun pseudopodlara sahip oldukları görülmüştür (Ribeiro ve Brehelin, 2006). Bu hücrelerde üç farklı tip membran bağlantılı inkülüzyon tanımlanmıştır (Brehelin ve Zachary, 1986). Granülositlerin, fagositoz ile alakalı olduklarına dair çalışmalar bulunmaktadır (Ribeiro ve ark, 1996; Costa ve ark. 2005; Ribeiro ve Brehelin, 2006). Brehelin ve Zachary (1986), granülositleri ultrastrüktürel yapılarına göre dört alt gruba ayırmıştır. Bu ayırımında özellikle granüllerin doğası, görünüşü ve kökenini dikkate almışlardır. Enkapsülasyon ve nodülasyonda hedef (yabancı) cisim ile ilk teması kuran da granülositlerdir. Granül içeriklerini bu cisim etrafına bırakarak plazmatositlerin buraya çekilmesinde rol aldıklarına ilişkin kuvvetli bir kanı vardır (Ribeiro ve Brehelin, 2006). Böcek türleri arasında, değişmekle beraber dolaşımdaki hemositlerin %30 -%60 kadarı granülosittir (Rowley ve Ratcliffle, 1981; Chapman, 1998).

**Önositoitler** fiksasyonun ardından büyük (25 µm'den büyük) ve düzenli hücreler olarak görülürler. Faz kontrast mikroskobu incelemelerinde çeşitli ışık kırınımları gösterirler ve nükleuslarının sitoplazmaya oranı düşüktür. Önositoidlerin nükleusları eksantirik konumdadır. Transmisyon elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde sitoplazmalarının çok sayıda serbest ribozom içerdiği, diğer tipik sitoplazmik organellerin de biraz geliştiği görülmüştür. Özellikle golgi aygıtı ve granüllü endoplazmik retikulumun sisternaları; çok nadir, çok kısa fakat çoğunlukla genişlemiş yapıdadır (Ribeiro ve Brehelin, 2006). *In vitro*'da tek tabakalı preparatları hazırlandığında birçok lepidopter türünde, çok kırılmalı ve çabucak lizise uğrasalar da (Strand ve Noda, 1991); *G. mellonella* gibi bazı türlerde daha stabildirler (Rowley ve Ratcliffe, 1981). Lepidopter türlerinde, önositoidlerde hemolenfin kararmasından (melanin sentezinden) sorumlu olan fenoloksidaz bulunmaktadır (Ribeiro ve ark, 1996). Ashida ve arkadaşları (1988) fenoloksidazın *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae)'de önositoitlerde sentezlendiğini, ve bu hücreler lizis'e uğradığında plazmaya bırakıldığını göstermişlerdir. *Drosophila sp.*'de önositoid bulunmamaktadır. Rizki (1957) tarafından kristal hücreler olarak tanımlanan hücreler, yapı ve işlev bakımından önositoidlere yüksek oranda benzerlikler göstermektedir (Ribeiro ve Brehelin, 2006).

**Sferülositler** yuvarlaklıklar ve düzensiz şekil almalarına neden olan az sayıda sferül adı verilen büyük inkülüzyonlar taşırlar. Bu hücreler, fagositik materyalle dolu granülositlerden oldukça farklıdır. Sferülositlerin görevleri henüz bilinmemektedir (Ribeiro ve Brehelin, 2006).

Büyük balmumu güvesi "*Galleria mellonella*", arıcılar tarafından çok iyi bilinen petek zararlısı bir türdür. Birçok çalışmada model organizma olarak *G. mellonella* kullanılmaktadır (Eguchi ve Iwabuchi, 2006; Mukherjee ve ark, 2010; Cook ve McArthur, 2013). Ülkemizde, genellikle deniz kenarından 600 metre yüksekliğe kadar olan sahil şeridinde, sıklıkla bu türe rastlanmaktadır (Tutkun ve Boşgelmez, 2003). Dişileri, yumurtalarını özellikle kolonisi zayıf olan kovanlardaki peteklere, arıların ulaşamayacağı yarık ve deliklere bırakırlar (Demir ve Eseceli, 2013). Yumurtadan çıkan larvalar, bal mumu içerisinde beslenmek için tüneller açarak ilerler ve bu süreçte peteklere büyük oranda zarar verirler (Demir ve Eseceli, 2013). Büyük balmumu güvesi mücadelesinde; fiziksel, kimyasal ve biyolojik metotlar uygulanmaktadır (Tutkun ve Boşgelmez, 2003). Fiziksel mücadelede genel olarak kullanılan yöntemler sıcaklık artırma veya düşük sıcaklık uygulamalarıdır. Kimyasal mücadele için başta naftalin olmak üzere çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır. Söz konusu maddelerin bilinçsiz ve kontrolsüz şekilde kullanılması; hem ekolojik dengenin



bozulmasını hem de çevre kirliliğini hızlandırmaktadır (Beroza, 1970; Andow ve ark. 1997). Bu durum en zararsız koruma yöntemi olan biyolojik mücadele yöntemlerinin önemini iyice arttırmaktadır. Zararlı tür *G. mellonella* ile biyolojik mücadele yaygınlaşmakta ve kullanılan ajanlar çeşitlilik göstermektedir. Bunlar arasında bakteriler, funguslar, predatörler sayılabilir (Tutkun ve Boşgelmez, 2003).

*Pimpla turionellae*, literatürde soliter idiobiont bir pupal parazitoid türü olarak tanımlanmaktadır (Uçkan ve Gülel, 1990; Kansu ve Uğur, 1984). *P. turionellae*, *G. mellonella*'nın doğal düşmanı olarak biyolojik mücadelede kullanılmaktadır. Parazitoid yumurtalarından çıkan larvalar, konak pupa sıvıları ve dokularını tüketerek gelişimlerini tamamlarlar. Erginleşen parazitoid larvaları, pupanın kitin ve koza tabakasından delik açarak dışarı çıkarlar. Dişiler, 3-6 günlük preovipozisyon süresinin ardından pupaları parazitleyecek durumdadırlar. Ortalama hayat uzunlukları iki ay dolayındadır. Bükgüzel (2001a)'ya göre *P. turionellae* biyolojik kontrolde kullanılan önemli bir parazitoiddir.

*P. turionellae* anal salgı adı verilen 8µl/s hiyalin sıvısı salgılamaktadır (Willers ve ark., 1982). Bu anal salgı DOPA-tirozinaz reaksiyonu inhibitörü gibi çalışmaktadır, bunun yanısıra antimikrobakteriyal ve antifungal etkiside vardır (Führer ve Willers, 1986). Parazitoid tür *P. turionellae* konak pupasının yerini ve pupada yumurtasını bırakacağı bölgeyi vibrasyonlu ses yöntemiyle bulmaktadır (Wäckers ve ark., 1998; Otten ve ark., 2001; Xiaoyi ve Zhongqi, 2008).

Çalışmada Entegre Zararlı Mücadelesi ve İndol-3-asetik asitin kullanımının konak ve parazitoid 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 parazitoid fizyolojisi üzerindeki etkileri hakkında da bilgi sahibi olunmaya çalışılmıştır.

## BÖLÜM 2

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. Apoptoz

Apoptosis terimi ilk kez Kerr ve arkadaşları (1972) tarafından kullanılmıştır (Chiara ve Rasola 2007). Ancak programlanmış hücre ölümü ilk kez on dokuzuncu yüzyıl ortasında C. Voght tarafından (1842) metamorfoz geçiren amfibilerin ölen hücrelerinin morfolojileri üzerine yapılan çalışmada tanımlanmıştır (Brown ve ark., 2014). Tüm çok hücreli canlılar, kendi hücrelerini öldürecek mekanizmalara sahiptirler. Fizyolojik hücre ölümünü savunma, gelişim, homeostas ve yaşlanma için kullanırlar (Vaux ve Strasser, 1996). Hücre ölümlerinin planlanmış apoptosis ve nekrosis olmak üzere iki ana şekli mevcuttur. Apoptosis oldukça düzenli, genetik kontrol altında ve kendini yönetebilen bir süreç olarak ortaya çıkartıldığından beri, programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Buna karşın, nekrosis plansız ve ansızın ortaya çıkmasından dolayı plansız hücre ölümü terimi ile tanımlanır. Günümüzde apocrosis veya aponecrosis olarak adlandırılan üçüncü bir hücre ölüm tipi olduğu önerilmektedir (Brown ve ark., 2014).

Apoptosis ilk kez Clem ve ark (1991) tarafından *Spodoptera frugiperda* tırtıllarından elde edilen hücrelerde apoptoza neden olan bakulovirusun bir mutant formu üzerinde yapılan çalışmalarla böcekler için antiviral bir savunma mekanizması olarak önerilmiştir. Böcekler adaptif bağışıklık sistemlerinin olmaması nedeni ile viral enfeksiyonlarda apoptosisin etkilerinin incelenmesi için benzersiz bir hayvan modelidirler (Clarke ve Clem, 2003). Liu ve ark. (2012)'na göre böceklerde sitokrom c ile apoptoz arasındaki ilişki henüz tam olarak çözülememiştir ve *Drosophila* ile yapılan çalışmalarda apoptoz için bazı hücreler sitokrom c'ye ihtiyaç duyarken bazıları duymamaktadır. Lepidoptera üyelerinde apoptoz için sitokrom c gerekli olabileceği düşünülmektedir (Liu ve ark., 2012).

Clarke (1990) apoptoz için yapılan ilk çalışmaların üç temel soruya yanıt aramaya yoğunlaştığını ifade etmiştir. Bu sorular şunlardır;

- 1- Apoptozun normal gelişimde rolü veya faydası nedir?
- 2- Apoptozu düzenleyen veya tetikleyen sinyal nedir?
- 3- Hücreleri yok eden mekanizma nedir?

Hassain ve ark. (1999)'a göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanması ile oluşan oksidatif stres böcek hücrelerinde apoptoza neden olmaktadır.

Strand ve Pech (1995b) çalışmasında *Microplitis demolitor* PDV'lerinin (McPDV) *Pseudoplusia includens*'in spesifik hemosit morfortipinde apoptozu indüklemesini incelemiştirler. *M. demolitor* PDV'lerinin konak türün granüler hücrelerinde apoptozu arttırdığını bulmuşlardır. *M. demolitor* PDV'leri tarafından inüklenen apoptotik hücrede kromatin kondensasyonu ve hücre yüzeyinde kabarcıklanma olduğunu, bunların yanında DNA'nın 200 bp'lik parçalara ayrıldığını bulmuşlardır.

Suzuki ve Tanaka (2006) da çalışmalarında parazitoid *Meteorus pulchricornis*'in VLP'lerinin *Pseudaletia separata*'ya enjekte edilmesi ile özellikle granüositlerde apoptozu indüklediğini bulmuşlardır. Özellikle enjeksiyondan sonraki 48. saatte en yüksek apoptoz seviyesine ulaşıldığını çalışmaları ile göstermişlerdir. Granüositler büyük oranda zarar görürken plazmatositlerin minimum düzeyde etkilendiğini belirtmişlerdir. Suzuki ve Tanaka (2006)'ya göre granüositlerin zarar görmesi ile konağın enkapsülasyon yeteneği büyük oranda azalmıştır.

Rivers ve ark. (2007) çalışmasında apoptoz konak-parazitoid ilişkisinin önemli bir parçasıdır. Endosimbiyotik virüs (VLP) kaynaklı ve zehir aracılı apoptoz için birçok örnek bulunduğunu, parazitoidlerin apoptozu tetikleyerek konaklarının hücrel bağışıklığını baskıladığını belirtmişlerdir.

## 2.2. Kaliks

Parazitoid yumurtalarının, konak vücudunda bağışıklık sisteminden etkilenmeden yetişebilmeleri için, konak bağışıklık sisteminin baskılanması gerekmektedir. Bu baskılanma için, ovipozisyon esnasında parazitoid tarafından yumurta ile birlikte enjekte edilen kaliks ve zehir önemli bir etkidir. Konağa enjekte edilen bu sıvılardan kaliks ve zehir bazı parazitoid türlerinde VLP (Virüs Benzeri Partikül) ve PDV (Polidna Virüsleri) içerebilir (Asgari ve ark, 1996; Luckhart ve Webb, 1996; Shelby ve Webb, 1999; Asgari ve ark., 2003; Asgari, 2006). Farklı böcek türleri ile yapılan çalışmalarda bazen; sadece kaliks sıvısının bağışıklık sistemini baskıladığı, bazen de zehirin tek başına bağışıklık sistemini baskıladığı sonuçlarına ulaşılmıştır. Gupta ve Ferkovich (1998) *Microplitis croceipes* (Braconidae) türünün zehir sıvısının tek başına larval gelişimi etkilemediğini, fakat enjeksiyonunun ardından kısa ve uzun periyotta larvanın gelişimini yavaşlatan kaliks sıvısı ile sinerjistik bir etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Kaliks sıvısı ile yapılan çalışmaların büyük bir kısmı zehir ile birlikte etkilerini karşılaştırmak üzerine olmuştur, çok az çalışmada ise tek tek etkileri ele alınmıştır (Wago ve Tanaka, 1989; Strand ve Dower, 1991; Webb ve

Luckhart, 1994; Gupta ve Ferkovich, 1998). Birçok çalışma ise PDV'lerin bağışıklık sistemine etkilerini incelemiştir (Davies ve ark., 1987; Asgari ve ark., 1996; Asgari ve ark., 1997; Beckage, 1998; Asgari ve Schmidt, 2003; Glatz ve ark, 2004). İdiobiont parazitoid türü olan *P. turionellae*'nin simbiyotik PDV ve VLP'lerden yoksun olup olmadığı hakkında literatürde bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Kitano ve Nakatsuji (1978) yaptıkları çalışmada kaliks sıvısında gözlemlenen partiküllerin etkisini göstermeye çalışmışlardır. Çalışmalarının sonucunda kaliks sıvısında görülen partiküllerin enkapsülasyonun baskılanmasında bir etkisinin olmadığı; konak bağışıklık sisteminin baskılanmasında yumurtadan salgılanan materyal veya materyallerin sorumlu olabileceği kanısına ulaşmışlardır.

1981 yılında Edson ve arkadaşları kaliksde görülen VLP'lerin immüno-supressör olarak iş gördüklerini ve bu kaliks bileşenlerinin parasitoid embriyosunun konak vücudunda enkapsülasyona uğramadan gelişmesi için gerekli olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Aynı çalışmada kaliks sıvısının santrifüjünden sonra süpernatant kısmının enkapsülasyonu baskılamada yetersiz olduğunu belirtmişlerdir. Öteyandan Kitano (1986) çalışması sonucunda kaliks sıvısının değil zehirin enkapsülasyonun baskılanmasında önemli bir faktör olduğu sonucuna ulaşmıştır.

Tanaka (1987a) kaliks sıvısının tek başına konak bağışıklığının baskılanmasında bir etkisinin olmadığı sonucunu bulmuştur. Aynı yıl yaptığı bir başka çalışmada ise (Tanaka, 1987c) Braconidae ve Ichneumonidae kaliks sıvılarındaki virüs benzeri partiküllerin morfolojisini incelemiş ve şekillerinin partikül veya çubuk şekilde oldukları belirlemiştir. Bu virüs benzeri partiküllerin hiçbirisinin yumurta yüzeyine tutunmadıkları ancak parazitoid yumurtalarının enkapsülasyonunu inhibe etme yeteneğinde olduğunu vurgulamıştır. Çalışmasında feulgen ve methyl-green hitokimyasal boyamaları sonucunda kaliks sıvısının DNA içerdiğini ve bu DNA'nın kaliks sıvısındaki filamentlerde yer aldığını bulmuştur. Bu filamentlerin çoğunlukla proksimal bölgede yer aldığını, distal bölgede ise bulunmadığını bildirmiştir. Çalışmasında tek başına kaliks sıvısının veya teratositlerin enkapsülasyonu inhibe etmede işe yaramadığını, zehir (venom) sıvısının kaliks ve/veya teratositlerin etkisini desteklemesinin muhtemel olduğu sonucuna ulaşmıştır.

Dover ve ark. (1987) kendilerinden önce kaliks sıvısı ile yapılan çalışmaların, kaliks sıvısındaki filamentlerin böcek gelişimini durduran faktör olduğunu gösterdiğini belirtmiştir. Kaliks kaynaklı bu gelişim durmasının geri dönülebilir olduğunu ve bunun için

ecdysone veya 20-hydroxyecdysone dan 10µg enjekte edilmesi gerektiğini tespit etmişlerdir. Çalışmalarında *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) kaliks sıvısının enjekte edildiği *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvaların altı haftadan fazla yaşadıklarını ve oldukları aşamada kalarak hiçbir gelişim göstermediklerini bulmuşlardır. Kaliks sıvısının partiküllerden arındırılması durumunda gelişimi durdurmakta başarısız olduğunu da aynı çalışmada bulmuşlardır.

Daha sonra yapılan bir başka çalışmada kaliks sıvısının beşinci aşamadaki larval hemositlerin üzerinde iki etkisi olduğu bulunmuştur (Davies ve ark., 1987). Bu etkilerden birincisi kaliks enjeksiyonlu deneklerden, kontrol grubuna göre daha fazla hacimde hemolenf toplayabildikleridir. İkinci etki ise farklı hemosit sayılarında belirgin değişikliklerdir. Kaliks sıvısı enjeksiyonunun plazmatosit yayılması davranışı üzerinde de etkisinin olduğunu bulmuşlardır.

Davies ve Vinson (1988)'e göre konak ovipozisyon boyunca parazitoid tarafından enjekte edilen PDV'lerin baskılayıcı etkisi nedeniyle enkapsülasyon tepkisi gösteremez ve bu araştırmacılara göre PDV'lerin hangi mekanizma ile bağışıklık tepkisini baskıladığı belirsiz de olsa konak-parazitoid ilişkisi bakımından bu virüslerin varlığı önemlidir.

Bir başka çalışmaya göre ise; parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak hemosit sayılarında fark bulunmazken, hemositlerin *in vitro* yayılma hareketleri parazitlenme ile değişmektedir (Strand ve Noda, 1991). Çalıştıkları türün (*Microplitis demolitor*) kaliks sıvısının hemosit sayısını doza bağlı olarak, kontrol grubuna kıyasla arttırdığını belirlemişlerdir. Aynı türün zehirinin ise hemosit sayısında kontrol grubuna oranla anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı sonucuna ulaşmışlardır. Kaliks sıvısının konak türün gelişimini durdurduğu yine aynı çalışmanın sonuçları arasındadır. Zehir konak üzerinde hiçbir fizyolojik etkiye sahip değildir fakat virüs etkisini belirgin bir şekilde artırmaktadır. Kaliks sıvısının konak gelişimi üzerindeki etkisinden sıvının içerdiği PDV sorumludur ve bu etki doza bağlı olarak değişmektedir (Strand ve Dover, 1991).

Dover ve ark. (1995) sadece PDV enjeksiyonu ile kaliks sıvısı enjeksiyonu arasında fark olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmalarında ayrıca süperfizyolojik teratosit dozlarının tek başlarına konak gelişimini durdururken, fizyolojik dozlarda tek başlarına etkisinin olmadığını mutlaka kaliks ve zehir enjeksiyonu olmadan konak gelişimini durdurmadığı sonucuna ulaşmışlardır. Bu çalışma ile fizyolojik dozlardaki kaliks sıvısının konak gelişimini durdurmak için zehir ve teratositlerle birlikte iş görmesi gerektiğini ortaya

çıkartmışlardır. Dover ve ark. (1995) kaliks sıvısı, zehir ve teratositlerin birlikte iş görmelerinin bile beşinci seviye larvalarda doğal parazitlenme ile benzer sonuçlar doğurabildiğini ve yetersiz kaldığını belirtmiştir. Çalışmalarında son olarak Juvenil Hormon (JH) aktivitesinin kaliks/zehir enjeksiyonuna bağlı olarak düşüş gösterdiğini bulmuşlardır. Parazitlenmenin, kaliks ve zehir karışımının ayrıca kaliks, zehir ve teratosit karışımının enjekte edilmesinin JH metabolik aktivitesini altı gün boyunca baskıladığını da tespit etmişlerdir.

*Chelonus inanitus* (Hymenoptera: Braconoidae) türünde yapılan çalışmada bu türün kaliks sıvısının yüksek dozda enjeksiyonunda dahi etkisinin düşük olduğu, ancak zehir enjeksiyonu ile etkisinin arttığı sonucu ortaya çıkmıştır (Soller ve Lanzrein, 1995). Aynı çalışmada kaliks sıvısı ve zehirin konak gelişimini prepupal aşamada durdurduğunu ve metamorfoz geçirmesini engellediğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada da kaliks sıvısının aktif bileşeninin PDV olduğu belirtilmiştir.

Luckhart ve Webb (1996) çalışmalarında *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) türünün PDV'lerini kullanmış ve bu türün kaliks sıvısındaki PDV'lerin kontrol grubuna göre enkapsülasyona belirgin bir etkisinin olmadığı; PDV'lerin sadece virüslerin enjeksiyonunu takip eden 24 saat sonra belirgin bir etki gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır.

Asgari (2006) çalışmasında birçok konak-parazitoid sisteminde PDV ve zehirin birbirinden bağımsız hareket ettiği fakat sinerjistik etkilerinin bulunduğunu, bunun yanında PDV optimum fonksiyonları için zehirin gerekli olduğunu belirtmiştir.

### **2.3. Hücre Kültürü**

Böcek hücre kültürüne yönelik ilk çalışmalar temel olarak doku kültürü çalışmalarıdır. Devamlı böcek hücre hatları Grace tarafından 1962 yılında *Antherea eucalypti* güvesinin dişi bireyinin ovaryumundan elde edilen hücrelerle kurulmuştur (Lynn, 1996). Grace'in kurduğu dört hücre hattından bu yana sayısız böcek ordosundan ve çok sayıda böcek dokusundan 500'ün üzerinde böcek hücre hattı kurulmuştur. Bu hücre hatları; böcek bağışıklığı çalışmaları için sinyal mekanizmalarının incelenmesinde, virolojide, hemosit göçü ve gen ekspresyonunun hipotezlerinin test edilmesinde, ayrıca yeni insektisitlerin keşfedilmesinin dizaynında da kullanılmaktadırlar (Smagghe ve ark, 2009). Bunların yanında böcek hücre kültürü böcek fizyolojisi, gelişim biyolojisi, patolojisi ve moleküler

biyolojisi çalışmalarında kullanılmaktadır (Lynn, 2002). Baculovirus hücre kültürü çalışmalarında en çok ele alınan konulardan birisidir (Granados ve ark, 2007; Murhammer, 2007). Böcek fiziolojisinde ilgi çekici konulardan birisi olan en kompleks fizyolojik olayların koordinasyonu ve nasıl ortaya çıktıklarına ilişkin sinyal mekanizmalarının incelenmesinde hücre kültürü çalışmalarından faydalanılmaktadır (Smaghe ve ark., 2009). Örneğin model böcekler üzerinde Toll reseptörünün bulunmuş olması memeli bağışıklık sisteminde Toll benzeri reseptörün bulunmasını kolaylaştırmıştır (Lemaitre ve Hoffmann, 2007).

#### **2.4. Indol-3-Asetik Asit**

John ve ark. (1979) çalışmalarında IAA'nın 500 mg/kg dozunda fare ve sıçanlarda teratojenik etkisi olduğunu, bu dozun altında bu yönde bir etkisinin olmadığını bulmuşlardır. IAA'nın kültür ortamlarında nötrofillerde şekil bozukluklarına ve teratojenik etkilerinin olduğu, bunun yanında sıçan ve insanlarda da hypoglisemiye neden olduğu bulunmuştur (Bertuzzi ve ark., 1997). Bu çalışmaların yanında IAA'nın ve metabolitlerinin insanda böbrek yetmezliği ve fenilketonüriye neden olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (Melo ve ark., 1998). Çelik ve ark. (2002) çalışmalarında ise 25 gün boyunca 75 ppm IAA uygulanmasının 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 sonucunu bulmuşlardır. Yılmaz ve Yüksel (2005) çalışmalarında hamile farelere 300 mg/kg IAA dozunu 1/40 oranında sulandırarak üç günde bir deri altına direkt enjekte etmişler ve bu yolla yaptıkları inceleme sonucunda 3. nesil fare kemik iliğinde IAA'nın mitotik indeksi arttırdığı sonucunu bulmuşlardır. IAA fare fetüslerinde mikroensefaliye neden olmakta ve 1000 mg/kg dozunda beyin büyüklüğünü ve ağırlığını belirgin oranda azaltırken nöronların S fazını etkileyerek apoptoza neden olmaktadır (Frukawa ve ark., 2004). Lins ve ark. (2006) ise IAA'nın 2 mg ve 18 mg uygulamalarının nötrofillerin fagositoz kapasitesinde belirgin bir artışa neden olduğunu ancak aynı dozlarda karaciğerde katalaz aktivitesini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Aynı çalışmanın bir diğer sonucu ise hepatik glutathinon peroksidaz aktivitesini 18 mg dozunun belirgin oranda azaltmasıdır. Lins ve ark. (2006) sonuç olarak IAA'nın hayvanlarda olumlu etki potansiyeli olduğunu ifade etmişlerdir.

Yeşilada (2000) *Drosophila melanogaster* üzerinde yaptığı çalışmasında  $10^{-4}$  M IAA dozunun türün kanatları üzerinde yer alan büyük benekleri azalttığını bulmuştur. Aynı

çalışmada IAA'nın mutajenik bir etkisinin olabileceğini ve bunun yeni araştırmalar ile ortaya konulması gerektiğini ifade etmiştir. Karadeniz ve ark. (2011) IAA ve  $\beta$ -naphthoksi asetik asit'in *D. melanogaster* kanat hücrelerinde genotoksik etkisini incelemiş ve bu maddelerin mutajenik veya rekombinogenik bir etkilerinin olmadığı sonucuna ulaşmışlardır.

Uçkan ve ark. (2011) çalışmalarında IAA'nın *Apantales galleriae* (Hymenoptera: Braconidae) gelişim biyolojisine etkilerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada IAA'nın özellikle yüksek dozlarda (200 ppm ve üzeri) ergin gelişim süresini uzattığı sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmada farklı dozlarda uygulanan IAA'nın yaşam uzunluklarını %50'den fazla azalttığı sonucuna ulaşmışlardır. Ayrıca IAA uygulamalarının kontrol grubuna göre erkek ve dişi ergin birey sayısında yarıdan fazla azalma gösterdiğini bulmuşlardır. Çalışma sonucunda IAA dozlarına maruz kalan parazitoidin gelişim biyolojisinin özellikle yüksek dozlarda olumsuz etkilendiği sonucuna ulaşmıştır.

Uçkan ve ark. (2014) IAA'nın *Achoria grisella* (Lepidoptera: Pyralidae) hemolenfinin ve *A. galleriae* larvasının biyokimyasal parametrelerine etkisini incelemişlerdir. Bu 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 azaldığını bulmuşlardır. Parazitoid için yapılan demelerde 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 ark. (2015) IAA'nın *G. mellonella* ve *P. turionellae* biyolojik özelliklerine etkilerini incelemişlerdir. Farklı IAA dozlarının (50- 10 000) uygulanması ile birinci nesil konak larvalarının puplaşma sürecinin hızlandığını belirtmişlerdir. Konak türün verimi açısından ise sadece 5000 ppm'de %33'den fazla azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada yumurta gelişim süreçlerinde 1000 ve 10 000 ppm dozlarındaki artışın kontrol grubuna kıyasla önemli olduğu sonucuna ulaşmıştır. İkinci neslin larval gelişim süresinin 500 ve 5000 ppm'de arttığını belirlemişlerdir. İkinci nesil pupa gelişim süresinde ise 1000 ve 10 000 ppm dozlarında %47'den fazla azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmada parazitoid yaşam süresinin yüksek dozlarda %27'den fazla azalma gösterdiği sonucuna da ulaşmışlardır



Çelik (2014) “Konağa Verilen İndol-3-Asetik Asit (IAA)’in Konak *Achoria grisella* Fabricus, 1794 (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae) Hemositlerine Etkisi” başlıklı çalışması ile IAA’nın konak *A. grisella* hemositlerine etkisini incelemiştir. Yaptığı çalışmada IAA’nın tüm dozlarında kontrol grubuna göre toplam hemosit sayısının istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiğini belirtmiştir. Çalışmasının mitotik indeks sonuçlarında IAA’nın herhangi bir anlamlı değişikliğe yol açmadığını tespit etmiştir. Benzer bir şekilde hemosit tiplerinin de IAA dozlarından etkilenmeyerek kontrol grubu ile anlamlı bir fark olmadığı sonucuna ulaşmıştır. Çalışmasının apoptotik indeks sonuçlarında bazı farklılıklar olmakla beraber IAA’nın apoptotik indekste anlamlı bir farklılık yaratmadığı sonucunu bulmuştur.

### **2.5. *Galleria mellonella***

Walters ve Ratcliffe (1983) *B. cerus* ve *E. coli* bakterilerini *G. mellonella* nodülasyon tepkisini test etmek için kullanmışlardır. Çalışma sonucunda *B. cerus*’un larvanın bağışıklık sisteminin üstesinden gelerek larvayı öldürdüğünü, öteyandan *E. coli*’nin nodüle hapsolarak çoğalmasının engellediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca melanizasyonun böcek bağışıklığının önemli bir parçası olduğunu bildirmişlerdir.

Anggraeni ve Ratcliffe (1991) çalışmasında percoll gradient yöntemi ile *G. mellonella* hemolenfinden plazmatosit, garnülosit ve sferülositleri ayırmışlardır. Bu çalışmada plazmatosit ve granülositlerin fagositozda birlikte çalıştıklarını belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmanın bir diğer sonucu olarak granülositlerin böceklerde fenoloksidaz sisteminin temel hücresi olduğunu ifade etmişlerdir.

Wiesner (1991) çalışmasında steril latex boncukların *G. mellonella* larvasında hemosöle enjeksiyonu ile güçlü savunma reaksiyonlarını uyardığını bulmuştur. Hücresel savunmanın başlamasının ardından hemolenfde antibakteriyel aktivite geliştiğini de belirtmiştir. Çalışması sonucunda bulduğu bulguların hücresel savunma tepkisi boyunca hemositlerden salınan faktörlerin antibakteriyel maddelerin üretimine neden olduğu yönündeki hipotezi desteklediğini ifade etmiştir. Wiesner (1992) çalışmasında ise anyonların katyonlara göre bağışıklığı daha fazla uyardığını ve uyarının karakterine göre humoral bağışıklığın derecesinin etkilendiğini bulmuştur. Aynı çalışmada sülfürik asit ile muamele edilmiş lateks boncukların, muamele edilmeyenlere göre humoral bağışıklığı daha fazla uyardığını bulmuştur. Bu çalışmanın önemli bir diğer sonucunda uyarının yüzey karakteristiğinin değişmesiyle humoral yanıt yoğunluğunun da değiştiği olduğunu ifade etmiştir.

Mullet ve ark. (1993) GM adı verilen 100 kDa ağırlığındaki proteinin granüositlerle etkileştiğini ve bu proteinin monoklonal antibadi ile bloke edilmesinin nodül oluşuma miktarını düşürdüğünü, bunun yanında plazmatositlerin bu proteinden etkilenmediğini bulmuşlardır.

Park ve ark. (2005) *G. mellonella* lavalardan iki hemolenf proteini izole etmişlerdir. Bu proteinlerden birincisi Apolipophorin III (apoLp-III) ve diğeri de 23,768.69 Da moleküler ağırlığa sahip GM protein-24 olarak adlandırdıkları proteindir. Bu ikinci proteini yağ cisimciklerinden klonlamışlardır. ApoLp-III proteinin, cecropin gibi antibakteriyal peptit aktivitesini etkilediğini, ancak GM protein-24 bu peptit üzerinde etkisiz olduğunu belirlemişlerdir. Bunun yanında her iki proteinin de böcek bağışıklığında kritik önemde kabul edilen profenoloksidaz kaskadının aktivasyonunda iş gördüğünü ifade etmişlerdir. GM protein-24'ün profenoloksidaz üzerinde ApoLp-III'e göre daha etkili olduğunu bulmuşlardır.

Nodülasyon bakteriyal ve fungal enfeksiyonlara karşı bir bağışıklık tepkisidir ancak bazı viral enfeksiyonlar da nodül oluşumunu tetiklemektedir (Büyükgüzel ve ark., 2007). Bu konuyu incelemek için Büyükgüzel ve ark. (2007) Bovine Herpes Simplex Virüs-1 ile enfekte ettikleri *G. mellonella* larvalarını incelemişlerdir. Virüs enjeksiyonunun nodül oluşumunu tetiklediğini bulmuşlardır. Bunun eicosanoid etkisinde olabileceğini ifade etmişlerdir.

Meylaers ve ark. (2007) böceklerde bağışıklığın aşamalara göre farklılık gösterdiğini ve en etkili bağışıklık tepkisinin pupa aşamasında, sonrasında larva aşamasında, ardından da ergin aşamada görüldüğünü bulmuşlardır. Bunun yanında metamorfoz sürecinin hemolenf bileşeni bağlantılı immün hafızayı sınırladığını göstermişlerdir.

Büyükgüzel ve ark. (2010) çalışmalarının sonucunda xanthotoxin değişiminin eicosanoid aracılı lipid peroksidasyonu ve protein karboksilasyonunun yanında eicosanoid aracılı antioksidan enzim aktivitesini de uyardığını bulmuşlardır.

Altuntaş ve ark. (2012) Giberellik Asit (GA<sub>3</sub>)'ün *G. mellonella* hemositlerine etkisini incelediği çalışmalarında GA<sub>3</sub>'ün *G. mellonella* larval aşamada hemositlerinde düşük dozlarda artış olduğunu, yüksek dozlarda ise bir değişiklik gözlemediğini bildirmiştir. Çalışmalarında GA<sub>3</sub> uygulanmasına bağlı nekrotik hücre sayısının arttığını, 200 ppm dozun üzerinde geç apoptotik hücre sayısını arttırdığını bulmuşlardır. Mitotik indeksde de artış

belirlemişlerdir. Bu çalışmada ayrıca GA<sub>3</sub> uygulanmasının enkapsülasyon ve melanizasyon davranışlarını da etiklediği sonucuna ulaşmışlardır.

Wu ve Yi (2015) krom ve kurşunun *G. mellonella* bağışıklık ve antioksidan sistemine etkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda kurşun ve kromun düşük dozlarının (5µg/g) toplam hemosit sayısını, fagositoz ve enkapsülasyonunu ve larval hemolenf bağışıklık enzim aktivitesini arttırdığını, yüksek dozlarının ise (100 µg/g) azalttığını bulmuşlardır. Aynı çalışmada süperoksit dismutaz, peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzim aktivitesinin doza bağlı olarak arttığını belirlemişlerdir.

## **2.6. *Pimpla turionellae***

Büyükgüzel (2001a) çalışmasında novabioksinin düşük dozlarda *P. turionellae* hayatta kalma şansını arttırdığını, yüksek dozlarda uygulanmasının ise tam tersi bir etkiye yol açtığını tespit etmiştir. Aynı yıl yaptığı ikinci çalışmasında (Büyükgüzel, 2001b) ise novabioksin (6 mg) yanında nalidiksik asitin (2 mg) *P. turionellae* sentetik besinine karıştırılmasının %80.8 puplaşma ve % 69.94 ergin olma verimliliği sağladığını ve bu kombinasyonun erginleşme süresini kısalttığını bulmuştur.

Büyükgüzel ve Yazgan (2002) *P. turionellae* sentetik besinine 13 antimikrobiyal madde ekleyerek bunların yaşama ve gelişme özelliklerine etkilerini incelemişlerdir. Denenen bu antimikrobiyal maddelerin çoğunluğunun etkisinin larva aşaması sonrasında ortaya çıktığını ve bu aşamada olumsuz etki gösterdiklerini belirlemişlerdir. Bu antimikrobiyal maddelerin hiçbirinin *P. turionellae* üzerinde toksik bir etki göstermediği çalışmanın bir diğer sonucudur.

Büyükgüzel (2006) çalışmasında malathionun 100 ppm dozda *G. mellonella* puplaşma oranını düşürdüğünü ve buna bağlı olarak *P. turionellae* çıkma oranını da düşürdüğünü saptamıştır. Bu çalışmada ayrıca 100 ppm dozun lipid peroksidasyon ürünü olan malonaldehit miktarını da belirgin bir şekilde arttırdığını bulmuştur. Ayrıca malathion toksitesinde oksidatif stresin *P. turionellae* sağlığını kötü etkilediğine dair direkt kanıtlar bu çalışmanın bir diğer sonucudur. Bu çalışmaya göre düşük malathion uygulamaları *P. turionellae* dişilerinin oksidatif stres toleransını da arttırabilmektedir.

Durmuş ve ark. (2008) çalışmalarında Bovine Herpes Simplex-1 virüsünün *P. turionellae* larvalarında nodülasyon reaksiyonunu doza bağlı olarak değiştirdiğini ve elde ettikleri bulguların, endoparazitlerin virüslere karşı hücrel bağışıklık yanıtı geliştirdiğine

dair hipotezi desteklediğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca eicosanoid aracılı nodülasyon reaksiyonlarının böcekler için yüksek oranda özelleşmiş bir tepki olduğunu da çalışma bulgularının gösterdiğini bildirmişlerdir.

Er ve ark. (2010) *P. turionellae* zehri ve parazitlenmesinin *G. mellonella* hemositleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada doz ve zamandan bağımsız olmak üzere pupal hemosit sayısında %50'den fazla azalma olduğunu, larvada ise yüksek zehir enjeksiyonuna bağlı olarak büyük oranda düşüş gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca parazitlenmenin pupa aşamasında granülositlerin sayısında önemli bir azalmaya neden olduğunu, bununla beraber plazmatosit sayısında artışa neden olduğunu bulmuşlardır; larvada hemosit tiplerinde ne parazitlenmenin ne de zehir enjeksiyonunun etkili olduğunu göstermişlerdir.

Uçkan ve ark. (2010) çalışmalarında *P. turionellae* zehir enjeksiyonu ve parazitlenmesinin *G. mellonella* enkapsülasyon ve melanizasyonuna etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda enkapsüle olmamış boncuk sayısında hem 4. hem de 24. saatte doz arttıkça artış bulmuşlardır. Zayıf enkapsülasyon bakımından 4. saatte doza göre artış belirlerken 24. saatte bir değişim olmadığını bulmuşlardır. Güçlü enkapsülasyon tepkisi bakımından ise doza bağlı düzenli bir değişim tespit edememişlerdir.

Uçkan ve Sak (2010) cypermethrinin *P. turionellae* larval hemositlerin etkilerini inceledikleri çalışmalarında, cypermethrinin mitotik aktiviteyi azalttığı ve apoptotik indeksi arttırdığı sonucunu ortaya koymuşlardır.

Sak ve ark. (2011) çalışmalarında *P. turionellae* parazitlenmesinin ve zehrinin *G. mellonella* hemolenfinde total protein miktarına etkisini incelemişler ve bir değişikliğe neden olmadığını bulmuşlardır. Sadece, larvalarda 24 saat sonunda total protein miktarında 0,5 kese eşdeğeri zehir dozunda kontrol gurubuna oranla iki kata varan bir artış belirlemişlerdir.

Kayış ve Emre (2012) ağır metal stresinin *P. turionellae* protein ve glikojen sentezine etkilerini incelemişlerdir. Kadmiyumun 20. günden itibaren kontrol grubuna oranla protein miktarını azalttığını; 30. günden sonra en düşük kadmiyum dozunda protein miktarı artarken en yüksek dozda azalmanın devam ettiğini bulmuştur. Glikojen bakımından ise 10. günden itibaren kontrole göre artış gözlemiş, 20. günden itibaren 0,10 ve 0,50 mg kadmiyum dozlarında önemli bir artış gözlenmiş, 30. günde yalnızca 0,50 ve 1 mg dozlarında artış

gözlenmişlerdir. Kayış ve Emre (2012) çalışmalarının sonucunda *P. turionellae*'nin ağır metal kirliliğinde indikatör olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan konak ve parazitoid türler Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarında  $25 \pm 2$  °C sıcaklık,  $\%60 \pm 5$  nisbi nem ve 12: 12 (Aydılık: Karanlık) fotoperiod şartlarında yetiştirildi. Ortam sıcaklığı ve nemi, nemlendirme cihazları, nem alma özellikli klima ve ısıtıcı olarak radyatör kullanılarak sürekli denetim altında tutuldu. Fotoperiyot zamanlayıcı cihazlar aracılığı ile sağlandı.

#### 3.1. Konak

Konak kültürünün oluşturulmasında önceden Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarında bulunan *G. mellonella* erginleri kullanıldı. İki ergin dişi ve iki ergin erkek örnek 2 g doğal kararmış petek bulunan 1 lt cam kavanoz içerisine konuldu. Kavanozun ağzına hava sirkülasyonu sağlayacak biçimde uygun boyutlu bez paket lastiği yardımıyla yerleştirilerek üzerine küçük delikler açılmış kapakla kapatıldı. Bu şekilde hazırlanan kavanozlar yukarıda şartları belirtilen laboratuvar koşullarında bekletildi. Larvalar gözlemlendiğinde günlük besin ihtiyaçlarının karşılanması için sentetik besin (Sak ve ark., 2006) eklendi. Uygun boyuta ( $0.18 \pm 0.02$  g) gelen larvalar ayıklanarak deneylerde kullanıldı, bir kısmı da pupa oluşturması için ayrı bir kavanoza alınarak tutunma yüzeylerini arttırmak ve koza oluşturmasını kolaylaştırmak için bu kavanozlara katlanmış teksir kâğıdı konuldu ve aynı laboratuvar koşullarında bekletildi. Yetişen pupaların bir kısmı konak kültürün devamı için kullanılırken bir kısmı da parazitoid kültürünün oluşturulmasında ve devam ettirilmesinde kullanıldı.

#### 3.2. Parazitoid

Parazitoid tür *P. turionellae*'nin kültürünün oluşturulmasında öteden beri Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarında yetiştirilen ergin bireyler kullanıldı. Parazitoid örnekleri üç yanı uygun ağla kapatılmış ahşap 50x50 cm ölçülerindeki kafeslerde bakıldı. Beslenmeleri için düzenli aralıklarla seyreltilmiş bal çözeltisi emdirilmiş hidrofil ve steril pamuk kullanıldı. Ayrıca belirli aralıklarla konak pupalarının hemolefleri ile beslenmeleri sağlandı. Üreme olgunluğuna ulaşmış erişkin dişi parazitoidlere erken dönem konak pupaları yumurtalarını bırakmak için sunuldu. Yumurtaların bırakıldığı pupalar 100 ml'lik cam kavanozlarda parazitlenme tarihlerine göre sınıflandırılarak aynı laboratuvar koşullarında gelişmeye bırakıldı. Pupadan çıkan

parazitoidler çıkış tarihlerine göre sınıflandırılarak kafeslere alındı. Elde edilen parazitoidler kaliks sıvısı eldesinde ve süksesif kültürün devamında kullanıldı.

### 3.3. Uygulanma

Saf IAA (Merck 1.00353.0010) Bronskill (1961) tarafından verilen ve Sak ve ark. (2006) tarafından modifiye edilmiş yarı sentetik konak besinine katılacak olan suyun (besindeki su oranında değişiklik yapılmadan) yerine IAA'nın 50, 500, 1000, 5000 ve 10 000 ppm dozları bulunan sıvı eklendi. Her bir doz için *G. mellonella*'nın iki dişi ve iki erkek ergin bireyi, içerisinde 2 gr doğal kararmış petek bulunan bir litrelik kavanozlara bırakıldı. Larva çıkışı gözlemlendiğinde içerisinde ilgili doz bulunan sentetik besin her kavanoza 10 g olacak şekilde kavanozlara eklendi, örnekler uygun ağırlığa gelene kadar gerektiğçe bu işlem tekrarlandı. Bu şekilde yumurtadan çıktıkları andan itibaren IAA'nın 50-10 000 ppm dozlarına maruz bırakılan konak larvaları enkapsülasyon, mitotik indeks, hemosit tiplerinin belirlenmesi, apoptos- nekrosis denemelerinin yanısıra parazitoidin hemositlerine etkilerinin belirlenmesi için parazitlenme çalışmalarında kullanıldı.

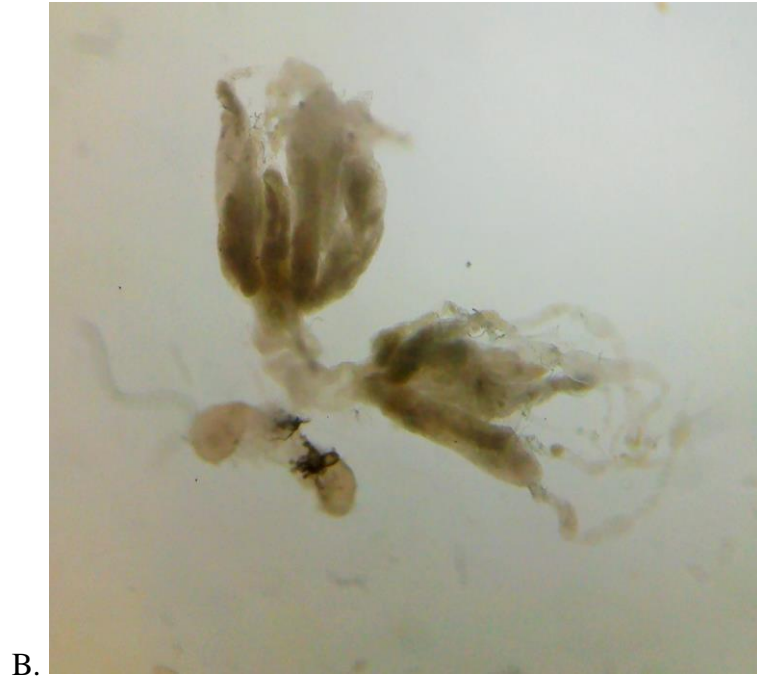
### 3.4. Kaliks Sıvısı

Çalışmalarda 10-20 günlük *P. turionellae* dişilerinin kaliks sıvısı kullanıldı. Bunun için 20 adet dişi parazitoidin ovipozitörleri kavranıp çekilmek suretiyle parazitoid vücudundan ayrıldı ve ovaryumları stereomikroskop altında pens ve diseksiyon iğneleri ile çıkartılarak 20 µl fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS Sigma pH: 7.4) bulunan buz içerisindeki ependorf tüpleri içine alındı. Bu tüpler +4°C'de 800 g'de 15 dakika santrifüje tabi tutuldu ve bu işlem üç kez tekrar edildi. Bu şekilde elde edilen kaliks sıvısı, gerekli oranda PBS eklenerek - 70°C'de stoklandı. Bu yolla kaliks sıvısının Dişi Eşdeğeri Kaliks (DEK) dozları aşağıdaki şekilde hesaplandı;

20 ovaryum	→	100 µl PBS	→	5 µl 1 Dişi Eşdeğeri
20 ovaryum	→	200 µl PBS	→	5 µl 0,5 Dişi Eşdeğeri
20 ovaryum	→	400 µl PBS	→	5 µl 0,25 Dişi Eşdeğeri
20 ovaryum	→	1000 µl PBS	→	5 µl 0,1 Dişi Eşdeğeri

Bu şekilde hazırlanan kaliks sıvısı dozları her bir konak larvasına “abdominal proleg”in (abdomen kısmında yer alan bacak grubu) ön kısmında yer alan segmentten mikroenjektör (10 µl kapasiteli Hamilton marka) yardımıyla 5 µl olarak verildi. Enjektörden

kaynaklanan delikten hemolenf sızmasının engellenmesi için bölge vazelin sürülerek kapatıldı. Ayrıca hiçbir işlem yapılmayan, sadece boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılan üç kontrol grupları için de aynı işlemler uygulandı. Bu yöntem Yu ve ark. (2007) makalesindeki yöntem modifiye edilerek oluşturuldu.



Şekil 3.1. *Pimpla turionellae* ovaryumu A. Konumu B. Ovaryum

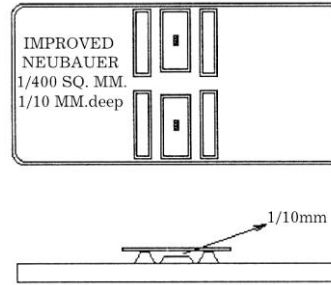


### 3.5. Hemosit

#### 3.5.1. IAA'nın hemosit sayısına etkisi

**In vivo:** 50-10 000 ppm doz aralığındaki IAA'nın konak son dönem larvalarının hemositleri üzerine etkilerinin belirlendiği çalışmalarda,  $0.18 \pm 0.02$  g ağırlığında son evre larvalardan hemolenf alınıp hemosit sayıları belirlendi. Deney için her IAA dozu ve kontrol grubundan 5'er larva kullanılarak 3 tekrar yapıldı.

Farklı deney ve kontrol gruplarında toplam hemosit sayılarının belirlenebilmesi için larva birinci abdominal prolegin ön segmentinden 4 µl hemolenf mikropipet tüp (Sigma) yardımıyla alındı. Elde edilen hemolenf içerisinde 36 µl pıhtılaşma engelleyici solüsyon (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M Na<sub>2</sub>EDTA ve 0,041 M Sitrik asit, pH: 4.5) bulunan eppendorf tüplerine aktarıldı. Seyreltilmiş (1: 10) hücre süspansiyonu mikropipet yardımıyla birkaç kez çekip bırakılmak suretiyle karıştırıldı ve hücre süspansiyonundan 10 µl mikropipet ile çekilerek 0,100 mm derinliğe sahip Neubauer hemositometresine (Improved Neubauer Hemocytometer; Superior, Germany) yüklendi. Hemositler Olympus BX51 model Faz – Kontrast mikroskobunda sayıldı.



**Şekil 3.2.** Neubauer Hemositometre Lamı

Neubauer hemositometresi üzerinde iki farklı sayım alanı bulunan ve bu sayım alanlarının bir çukurlukla birbirinden ayrıldığı sayma lamıdır. Her bir sayım alanında köşelerde dört tane 1 mm<sup>2</sup>'lik bölümler (büyük kareler) bulunur. Bunlar 16 tane orta büyüklükte kareye ayrılmıştır ( $1/4 \times 1/4 = 1/16$  mm<sup>2</sup>). Ortada bulunan büyük kare ise 25 tane orta büyüklükte kareye ayrılmıştır. Orta büyüklükteki karelerin etrafı çift çizgi ile çevrilmiştir. Her bir orta kare de 16 küçük kareye bölünmüştür (Şekil 3.2). Böylece, ortadaki alanda 25 tane orta kare, 4 tane küçük kare vardır. Bir küçük karenin alanı  $1/20 \times 1/20 = 1/400$  mm<sup>2</sup>'dir. Sayım alanı dışında kalan kenarlar, sayım alanı yüzeyinden 0,1 mm yüksektir. Sayım alanı üzerine hemositometrenin lameli konulunca, lamel ile sayım alanı

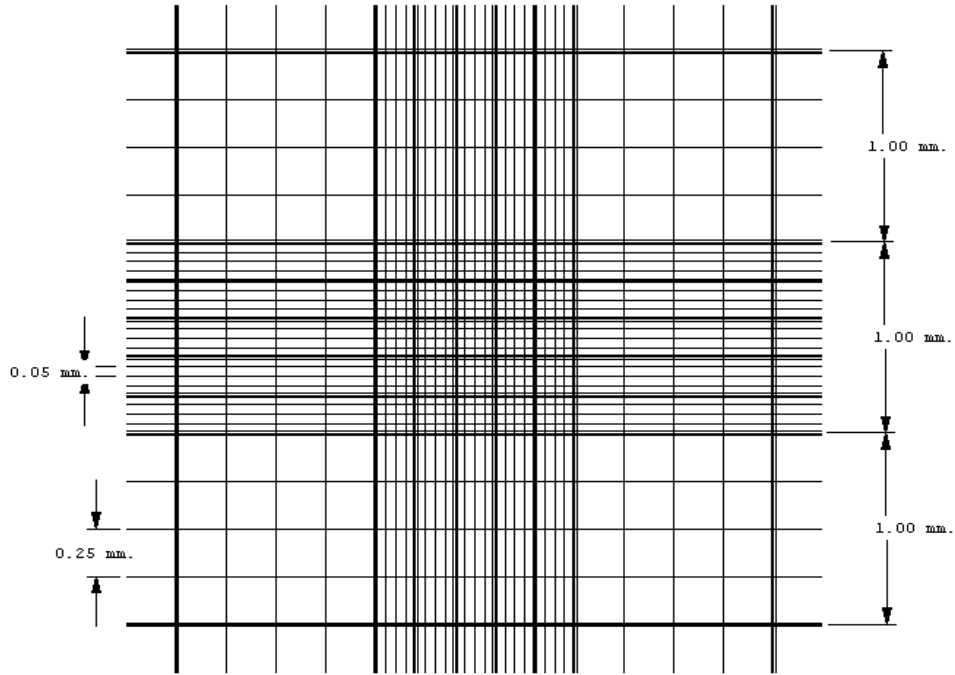
yüzeyi arasında 0,1 mm'lik bir boşluk kalır. Böylece lam ve lamel arasında kalan her karenin hacmi hesaplanabilir:

En büyük (1mm<sup>2</sup>'lik) karenin hacmi, 1 X 1 X 0,1= 0,1 mm<sup>3</sup>

0,1 mm<sup>3</sup> = 0,0001 cm<sup>3</sup> = 0,0001 ml'dir.

Sayım için hemositometre lamının orta kısmında bulunan, 25 orta büyüklükte karenin tamamı sayılarak toplam hemosit sayıları belirlendi. Mililitredeki toplam hemosit sayılarının hesaplanması için;

Hücre sayısı / ml = Büyük karede saydığımız hücre sayısı X Sulandırma katsayısı X 10<sup>4</sup> formülünden yararlanıldı.



Şekil 3.3. Neubauer hemositometresi sayım alanı

**In vitro:** Çalışmalar steril biyolojik güvenlik kabini (Esco Class II) içerisinde gerçekleştirildi. Kabin içerisinde steril durumdaki 96 kuyucuklu hücre kültürü kabında çalışılacak her örnek için 5 kuyucuk kullanıldı. Besi ortamı hazırlanması için Biochore marka ısı inaktivasyondan geçirilmiş Fetal Bovin Serum (FBS)'dan 5 ml alınarak 0.22 µm aralıklı Sartorius marka şırınga filtresi ile süzüldü. Bu süzütünün üzerine Grace's Insect Medium (Sigma)'dan 45 ml eklenerek besiy ortamı hazırlandı. Her bir kuyucuk içerisinde önceden hazırlanmış olan bu besiy ortamından 100 µl konuldu. Bu şekilde hazırlanan her bir

kuyucuğa, yüzey sterilizasyonu yapılmış  $0.18 \pm 0.02$  g ağırlığındaki *G. mellonella* örneklerinden elde edilen 2 µl hemolenf eklendi. Hazırlanan hücre kültürü kabı 27°C sıcaklıktaki inkübatörde (Binder) iki saat karanlıkta inkübe edildi. Bu yolla *in vitro* deneylerde kullanılacak hücre kültürü materyali hazırlandı. *In vitro* çalışmalarda Nikon Ti-U model inverted mikroskopta faz- kontrast'da 40x büyütmede incelendi.

Sayımlar için her bir birey için hazırlanan aynı sütundaki beş kuyucuk kullanıldı. Bu kuyucukların her birisinde birbirinden uzak, bağlantısız ve random (serbest seçimli) seçilen bölgelerde alandaki hücre sayısı belirlendi.

Breed (Prescott ve Breed, 1910) metoduna göre hücre sayısının hesaplanması için görüntüleme alanının hesaplanması gerekmektedir. Büyütmede (40x) görüntülenen alanın çapı 0,52 mm olarak belirlendi, alan ise  $0,212 \text{ mm}^2$  olarak hesaplandı. Her bir kuyucuğun taban alanı  $35 \text{ mm}^2$  olarak üretici tarafından belirtilmiştir. Buradan görüntülenen alanın  $1/165.094$ 'ü olduğu hesaplandı. Kullanılan hemolenf miktarı  $1/500$  ml'dir. Buradan da 1 ml hemolenfteki hücre sayısının hesaplanması için aşağıdaki formüle ulaşıldı.

$$\text{ml'deki hücre sayısı} = \text{Sayılan hücre sayısı} \times 165.094 \times 500$$

### 3.5.2. IAA'nın *P. turionellae* hemosit sayısına etkisi

IAA'nın *P. turionellae* larvaları üzerine etkisinin belirlenebilmesi için daha önce anlatıldığı gibi çeşitli IAA dozlarının uygulanması ile yetiştirilen *G. mellonella* larvalarının pupaları parazitletildi. Bu şekilde parazitoid larvaları IAA'e maruz bırakıldı. Parazitletmenin ardından sekizinci günde uygun boyuta gelen son evre *P. turionellae* larvaları *G. mellonella* pupaları açılarak toplandı. Toplanan larvalar stereo mikroskop altında böcek iğnesi ile delindi. Dışarı sızan hemolenf 5µl kapasiteli mikrokapiller tüp (Sigma) aracılığıyla 4 µl toplanarak 36 µl pıhtılaşma önleyici solüsyon içerisine konulup otomatik pipet yardımıyla eşit şekilde dağılması sağlandı. Bu şekilde on kat sulandırılan hemolenf *G. mellonella* örneklerinde tarif edildiği şekilde hemositometreye yüklenerek sayımları yapıldı ve aynı hesaplama kullanılarak hemosit sayısı belirlendi.

### 3.5.3. Kaliks sıvısının hemositlere etkisi

***In vivo:*** *G. mellonella* larvalarının toplam hemosit sayısına kaliks sıvısının etkisinin belirlenmesi için toplanan kaliks sıvısı, uygun büyüklüğe ulaşan ( $0.18 \pm 0.02$  g) *G. mellonella* larvalarına enjekte edilerek kullanıldı. Enjeksiyon için larvalar toplandıktan sonra buz kasedi

üzerinde hareketlerinin yavaşlatılması sağlandı. Hareketleri yavaşlayan larvalar sırtüstü çevrilerek ilk abdominal prolegin önündeki segmentten her bir larvaya 5µl kaliks dozları mikroenjektör (Hamilton) yardımıyla enjekte edildi. Enjeksiyondan sonra hemolenf sızmasını engellemek için enjektörün yol açtığı deliğin bulunduğu bölge vazelin ile kapatıldı. Kaliks sıvısının etkisinin belirlenmesi için bir saat beklendi. Ardından kaliks enjeksiyonu yapılan larvaların birinci abdominal prolegin ön segmentinden 4 µl hemolenf mikrokapiler tüp (Sigma) yardımıyla alınarak 36 µl antikoagulant içeren mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Dibe çöken hemolenf ve antikoagulant karışımı otomatik pipetle çekip bırakma yöntemi ile karıştırıldı. Bu yolla on kat sulandırılan hemolenf IAA için kullanılan yöntemle (3.5.1) hemositometreye yüklenerek sayım yapıldı. Elde edilen sonuçlar yukarıda verilen formüle göre hesaplanarak hemosit sayısı belirlendi.

***In vitro***: Kaliks sıvısı başlığında (3.4.) anlatıldığı gibi toplanan kaliks sıvısı uygun boyuttaki *G. mellonella* larvalarına daha önce açıklanan şekilde enjekte edildi. Enjeksiyondan sonra bir saat süreyle beklendikten sonra hücre kültürleri daha önce tarif edildiği şekilde oluşturuldu. İnkübasyon için 27°C sıcaklıktaki inkübatör'de (Binder) iki saat bekletildi. İki saat sonunda kuyucuklar Nikon Ti-U model inverted mikroskopta faz-kontrast'da 40x büyütmede incelendi. Hesaplamada IAA *in vitro* başlığında açıklaması yapılan formülden yararlanılarak hesaplandı.

### **3.6. Enkapsülasyon ve Melanizasyon**

Enkapsülasyon ve melanizasyon tepkilerinin belirlenebilmesi için Sephadex DEAE A-25 (40-120 µm çapta) kromatografi boncukları kullanıldı. Boncukların larva içerisinde bulunmasını kolaylaştırmak amacıyla boncuklar ependorf santrifüj tüpüne alındı ve PBS içinde hazırlanan %1'lik Coomassie mavisini (Brilliant Blue G Sigma) boncuklar üzerine mikropipet yardımıyla ilave edildi. Sephadex A-25 boncukları bir saat boya çözeltisi içerisinde bekletilerek boyanmaları sağlandı. Bir saatin sonunda süpernatant uzaklaştırıldı ve boncuklar üzerine taze PBS eklenerek yıkandı. Yıkama işlemi üç defa tekrar edildi. Hazırlanan bu boncuk stoğundan 50 µl kapasiteli ve 22 g uçlu Hamilton mikroenjektör yardımıyla örnekler enjekte edildi. Enjeksiyonunu takiben 4 saatlik ve 24 saatlik deney grupları oluşturularak belirlenen saatlerin bitiminde stereomikroskop altında 40'lık büyütmede larvalar disekte edildi. Larvaların tüm vücut bölgeleri incelenerek bulunan boncuklar ince uçlu diseksiyon iğnesi yardımıyla alınıp üzerinde bir damla PBS bulunan lam üzerine aktarıldı, lamel ile kapatılarak mikroskopta incelendi ve hemositlerin enkapsülasyon

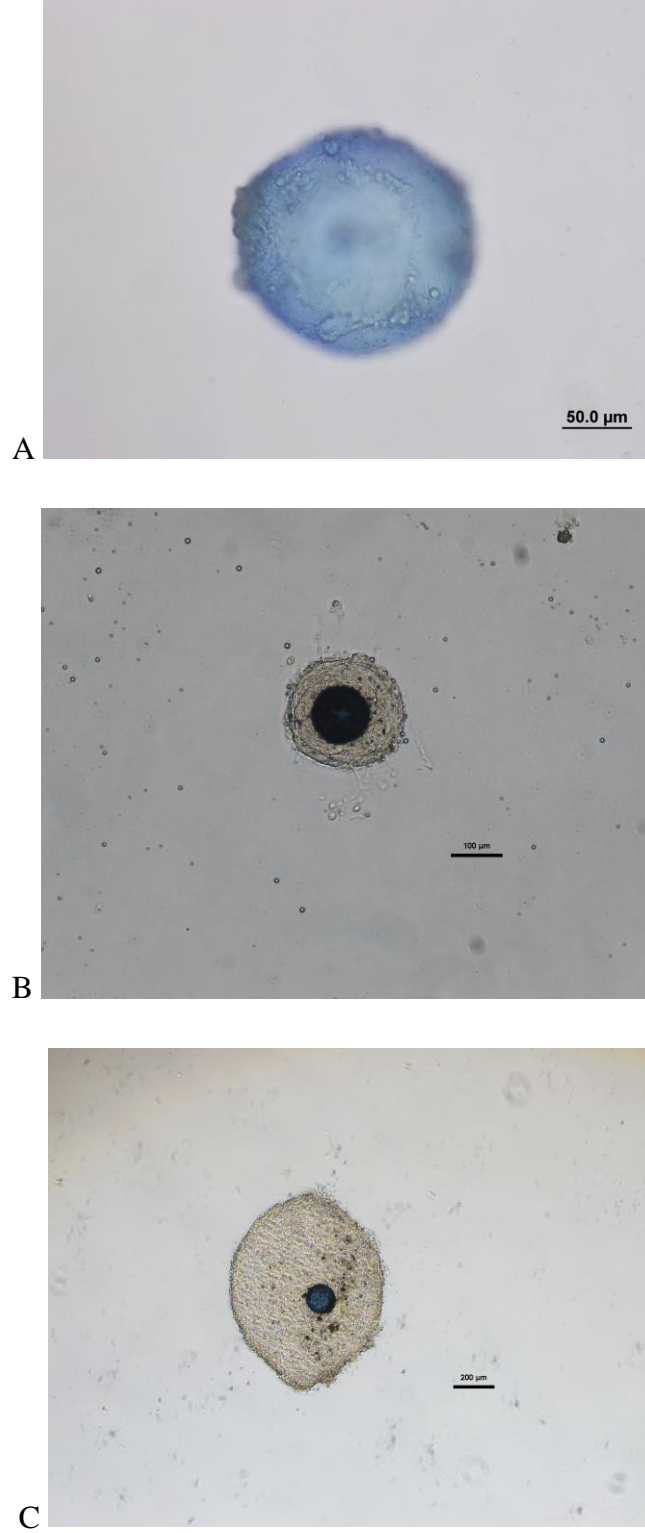
davranışları belirlendi. Konak larvaları içerisinde disekte edilerek çıkarılan boncuklar Richards ve Dani (2008) ve Er (2011)'e uygun olarak;

- Boncuk enkapsüle olmamış veya üzerinde birkaç hemosit var ise enkapsüle olmamış
- Boncuk üzerinde 2-9 katman hemosit var ise zayıf enkapsüle olmuş
- Boncuk üzerinde 10 ve daha fazla hemosit katmanı var ise güçlü enkapsüle olmuş olarak değerlendirildi.

Boncuklar değerlendirilirken; boncukların çevresinin %50'si ve fazlasının hücre tabakası durumu göz önünde bulunduruldu. %50'si veya fazlası enkapsüle olmamış ise boncuk enkapsüle olmamış, 2-10 tabaka hücre ile kaplı ise zayıf ve 10'dan fazla hücre tabakası var ise güçlü enkapsülasyon tepkisine sahipse güçlü kabul edildi. Bunların yanında boncukların yarıçapları da enkapsülasyon durumlarının değerlendirilmesine teyit etmek amacıyla kullanıldı. Eğer boncuk etrafındaki hücre tabakası boncuk yarıçapından fazla ise güçlü, az ise zayıf kabul edildi.

Melanizasyon durumu ise boncuk etrafındaki hücre tabakalarındaki hücrelerin %20 veya daha azında melanizasyon var ise zayıf, %20-%70 arası orta %70'den fazla ise güçlü tepki olarak değerlendirildi.

IAA uygulaması yapılan uygun boyuttaki son evre *G. mellonella* larvalarına yukarıda açıklandığı gibi mikroenjeksiyon yardımıyla kromatografi boncukları verildi ve enkapsülasyon ve melanizasyon tepkileri değerlendirildi. Her bir doz için beş adet 4 saat grubunda, beş adet 24 saat grubunda olmak üzere toplam 10 örnek değerlendirildi. Her bir deney üç defa tekrar edildi.



**Şekil 3.4.** Enkapsülasyon durumları; A Enkapsüle olmamış, B Zayıf Enkapsülasyon, C Güçlü Enkapsülasyon (Nikon Ti-U 10X)

Kaliks dozları ile yapılan denemelerde ise önceden belirlenmiş olan kaliks dozları, kaliks sıvısı başlığında anlatıldığı gibi son evre *G. mellonella* larvalarına enjekte edildi.

Enjeksiyonun ardından bir saat beklendikten sonra yukarıda aktarıldığı gibi kromatografi boncukları, kaliks enjeksiyonu için açılan delikten vücut içerisine verildi. Boncuklar her doz için 4 ve 24 saat bekleme süreleri sonunda diseksiyonla toplanarak değerlendirmeleri yapıldı. Her bir doz için beş adet 4 saat grubunda, beş adet 24 saat grubunda olmak üzere toplam 10 örnek değerlendirildi. Her bir deney üç defa tekrar edildi.

### 3.7. Apoptotik İndeks, Mitotik İndeks ve Mikroçekirdek

***In vivo***: Er ve ark. (2011) tarafından apoptotik indeksin belirlenmesi için geliştirilen Acridine Orange (AO) ve Ethidium Bromide (EB) floresans boyalar ile ikili boyama yöntemi IAA dozlarında yetişen *G. mellonella* örneklerinin apoptotik indeksin, mitotik indeksin ve mikroçekirdek durumlarının belirlenmesinde kullanıldı. Bu yöntemin kullanılabilmesi için Er (2011) ve Altuntaş (2011) çalışmalarında verilen prosedür incelendi. Örneklerden abdominal proleg önündeki segmenten delinerek mikrokapiller tüp yardımıyla alınan 5 µl hemolenf lam üzerine yayıldı. Bu hemolenf üzerine sırasıyla 100 µg/ ml AO ve 100 µg/ ml EB çözeltilerinden 5 µl ilave edilerek bekletilmeden Olympus BX51 marka floresans mikroskopunda mavi ışıkta incelenerek hemositlerin erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücre sayıları Cendoroglo ve ark., (1999) ile Kosmider ve ark. (2004)'e göre belirlendi. Buna göre;

- Canlı hücreler (Yeşil nükleus, stoplazma turuncu veya kırmızı görünebilir.)
- Erken apoptoz (Hücre membran bütünlüğü bozulmamıştır ancak kromatin yoğunlaşması ve fragmantasyonu vardır, nükleus parlak yeşil görünür.)
- Geç apoptoz (sekonder nekroz veya apoptotik nekroz da denmektedir. Ethidium Bromide membran bütünlüğü bozulmuş hücelere girerek nükleusu turuncu renge boyamaktadır. Kromatin yoğunlaşması ve fragmantasyonu vardır.)
- Nekroz (Şekil olarak normal olan turuncu nükleus gözlenir.)

Mitotik indeks belirlenmesi için apoptotik indeksi belirlemek amacıyla sayılan 1000 hücrede gözlemlenen çift nükleus (tek hücrede aynı boyutlu iki nükleus) barındıran hücreler sayıldı.

Mikroçekirdek durumlarının belirlenmesi için de apoptotik indeks için sayılan hücrelerdeki mikroçekirdek oluşumlarının bulunduğu hücreler belirlendi.

IAA uygulanmış *G. mellonella* larvalarından elde edilen 5 µl hemolenf ile her bir IAA dozu için (50-10 000) her tekrarda beş örnek olmak üzere üç tekrarda 15 örnek kullanılarak deneyler tamamlandı.

Kaliks enjeksiyonu ardından apoptotik ve mitotik indeksi ile mikroçekirdek oluşumu durumları yukarıdaki yöntemle değerlendirildi. Her bir deneme için beş örnek ve toplamda üç tekrarda 15 örnek kullanıldı.

*P. turionellae* larvalarının apoptotik, mitotik indeksi ile mikroçekirdek oluşum durumlarının incelenmesi için IAA dozlarına maruz kalmış *G. mellonella* pupalarının parazitlenmesiyle elde edilen *P. turionellae* larvaları kullanıldı. Bu yolla elde edilen *P. turionellae* larvalarının vücutlarının posterior bölgesi böcek iğnesi ile stereomikroskop altında delindi. Delikten sızan hemolenf mikrokapiller tüp ile 5 µl çekilerek lam üzerine yayıldı. Ardından yukarıda açıklandığı şekilde AO ve EB ikili boyaması kullanılarak Olympus BX51 model mikroskop ile mavi ışık altında değerlendirildi.

***In vitro:*** *In vitro* koşullarda apoptotik ve mitotik indeks ile mikroçekirdek durumlarının saptanması için hücre kültürü ortamları hazırlandı. İnkübasyonun ardından 100 µg/ ml AO ve 100 µg/ ml EB çözeltilerinden sırasıyla 5 µl ve 30 µl eklenerek beş dakika karanlıkta bekletildi. Bekleme süresinin ardından besi ortamı kuyucuktan çekilip hücreler PBS aracılığıyla yıkanarak fazlalık boyanın uzaklaşması sağlandı. Bu işlemin ardından Nikon Ti-U tip mikroskopta mavi filtre ile canlı ve erken apoptotik hücreler belirlenirken, yeşil filtre ile geç apoptotik ve nekrotik hücreler belirlendi. Her iki filtre ile incelenen hücrelerden çift nükleuslu olanlar mitotik, küçük nükleus parça veya parçaları içerenler mikroçekirdek olarak değerlendirildi. IAA'nın ve kaliksin belirlenen dozları için her tekrarda beş örnek kullanıldı ve deneyler üç kez tekrar edildi.

IAA uygulanmış örneklerden hazırlanan hücre kültürü ortamı yukarıda anlatılan işlemlere tabi tutulduktan sonra *in vivo* yöntemde bahsedilen sınıflandırma yöntemine göre apoptotik durumları değerlendirildi.

Kaliks enjeksiyonu ardından hazırlanan örnekler hücre kültürü oluşturulması için kullanıldı. Örneklerin apoptotik durumları *in vivo* yöntemde bahsedilen sınıflandırma yöntemine göre değerlendirildi.

### **3.8. İstatistik**

Tüm deney sonuçlarında elde edilen ortalamalar tek yönlü varyans analizleri (ANOVA) ile karşılaştırıldı. Bulunan ortalamalar arasındaki farklar Tukey gerçekten anlamlı farklılık (Tukey HSD) testleri ile değerlendirildi. Veri analizinde SPSS 20.0 istatistik programı (IBM) kullanıldı. Sonuçlar  $P < 0,05$  düzeyinde olanlar istatistiksel olarak anlamlı,  $P > 0,05$  olanlar istatistiksel olarak anlamsız/önemsiz olarak değerlendirildi.



## BÖLÜM 4

### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

#### 4.1. Hemosit Sayısı

##### 4.1.1. IAA'nın toplam hemosit sayısına etkisi

*In vivo*: IAA'nın farklı dozlarında (50-10 000 ppm) yetiştirilen *G. mellonella* son dönem larvalarında, toplam hemosit sayılarına etkileri için üç tekrar yapıldı ve her tekrarda beş larva kullanıldı. Çizelge 4.1.1'de görüldüğü gibi kontrol grubu *G. mellonella* larvalarında hemosit sayısı  $19.13 \times 10^6$  hücre/ml iken, IAA dozunda yetişen örneklerin tamamında hemosit sayıları kontrol gurubundan yüksek olarak belirlendi. 50 ppm dozu  $25.21 \times 10^6$  hücre/ml ile en yüksek hemosit sayısına sahip IAA dozu olarak saptandı. Sonuçlar Çizelge 4.1'de ve Şekil 4.1'de gösterilmektedir. Yapılan tek yönlü varyans analizi sonuçlarına göre kontrol gurubuna göre tüm IAA gruplarında hemosit sayısı yüksek bulundu ve istatistiksel olarak bu fark önemli olarak olarak tespit edildi. IAA grupları içerisindeki fark ise önemsiz olduğu belirlendi (F: 7.779; dF:5; P: 0.00).

Literatür bilgisi incelendiğinde çeşitli fiziksel etmenlerin (yaralanma, ısı şokları vb) ve bazı biyolojik etmenlerin (bakteriyal yada viral enfeksiyon, çeşitli kimyasal uygulamaları) veya parazitlenmenin dolaşımdaki hemosit sayısını etkilediği görülmektedir (Ratcliffe ve ark., 1985; Narayanan, 2004; Phukan ve ark., 2008; AbdEl-Aziz ve Award, 2010; Er ve ark., 2010; Kim ve Kim, 2010; Altuntaş ve ark., 2012; Çelik, 2014). Altuntaş ve ark. (2012) çalışmalarında bir başka bitki gelişim düzenleyicisi olan GA<sub>3</sub> kullanmışlardır. Çalışma sonucunda GA<sub>3</sub> uygulamasının düşük dozlarda (50-500 ppm) toplam hemosit sayısında artışına neden olurken yüksek dozlarda (1000-5000 ppm) düşüşe neden olduğunu bulmuşlardır. Çelik (2014) IAA uygulaması yaparak *Achoria grisella* ile yaptığı çalışmada IAA'nın tüm uygulama dozlarının kontrol grubu ortalamasına göre daha yüksek sayıda hemosite sahip oldukları sonucuna ulaşmıştır.

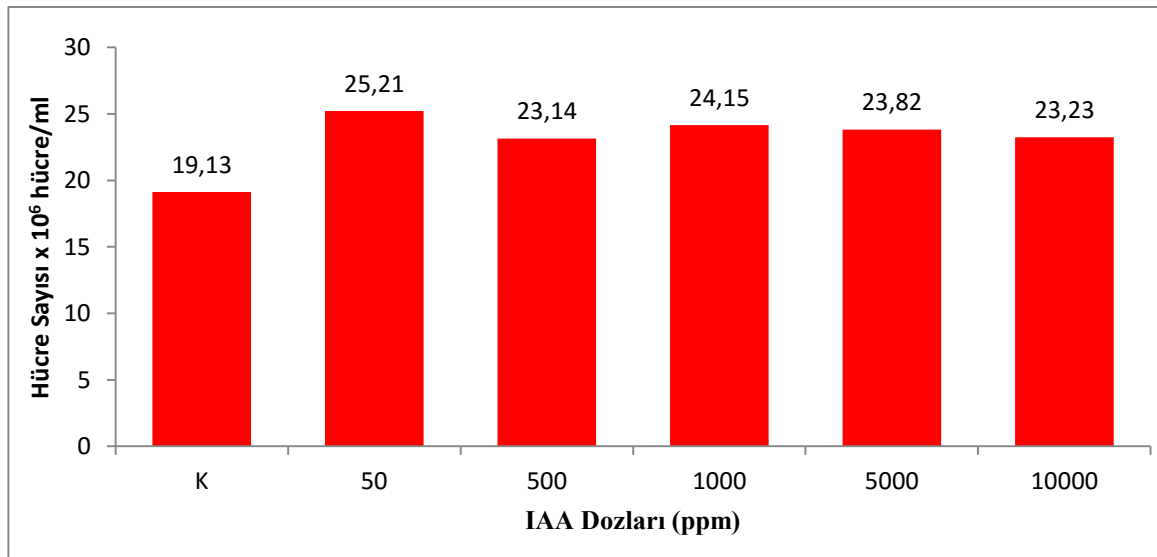
Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar literatür bilgisi ile karşılaştırıldığında uyumlu olduğu görülmektedir. IAA uygulaması hemosit sayısında anlamlı bir artışa neden olmaktadır.

**Çizelge 4.1.** IAA'nın *G. mellonella* toplam hemosit sayısına etkisi (*in vivo*)

IAA dozu (ppm)	Min. - Max. değerler ( x10 <sup>6</sup> ) (Hücre/ml)	Hemosit Ortalaması ( x10 <sup>6</sup> ) (Hücre/ml)
		Ortalama hücre sayısı ± SH *
<b>Kontrol</b>	14.70 – 24.30	19.13 ± 0.81 <sup>a</sup>
<b>50</b>	21.30 – 29.50	25.21 ± 0.68 <sup>b</sup>
<b>500</b>	18.70 – 28.80	23.14 ± 0.81 <sup>b</sup>
<b>1000</b>	19.70 – 29.30	24.15 ± 0.81 <sup>b</sup>
<b>5000</b>	20.40 – 27.50	23.82 ± 0.64 <sup>b</sup>
<b>10 000</b>	19.60 – 28.00	23.23 ± 0.72 <sup>b</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.



**Şekil 4.1.** IAA'nın *G. mellonella* toplam hemosit sayısına etkisi (*in vivo*)

**In vitro:** IAA'nın farklı dozlarında (50-10 000 ppm) yetiştirilen *G. mellonella* son dönem larvalarından hazırlanan hücre kültürü ortamlarında, IAA dozlarının toplam hemosit sayılarına etkileri için üç tekrar yapıldı, toplamda 15 örnek kullanıldı. Yapılan sayımlarda IAA dozlarında yetişen tüm örneklerin hemosit sayıları, kontrol grubuna (10.85 x 10<sup>6</sup> hücre/ml) oranla yüksek bulundu. 50 ppm dozu 19.16 x 10<sup>6</sup> hücre/ml ile en yüksek hemosit

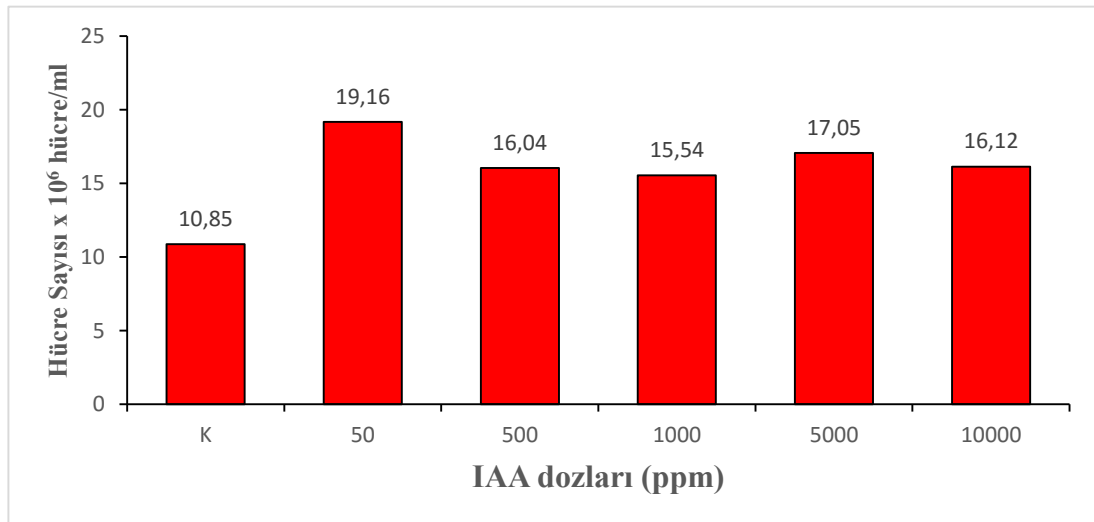
sayısına sahip IAA dozu olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2’de sunulmaktadır. Yapılan tek yönlü varyans analizi sonucu tıpkı *in vivo* sonuçlarda olduğu gibi tüm IAA dozlarında kontrol grubuna göre hemosit sayılarında artış vardır ve bu artış istatistiksel olarak önemlidir. IAA dozları arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemsizdir. *In vitro* koşullarda elde edilen sonuçlar, *in vivo* sonuçlar ile uyum içerisindedir. (F: 7.593; dF:5; P: 0.00)

**Çizelge 4.2.** IAA’nın *G. mellonella* toplam hemosit sayısına etkisi (*in vitro*)

IAA dozu (ppm)	Min. - Max. değerler (x10 <sup>6</sup> ) (Hücre/ml)	Hemosit Ortalaması (x10 <sup>6</sup> ) (Hücre/ml) Ortalama hücre sayısı ± SH *
<b>Kontrol</b>	8.33 – 12.18	10.85 ± 0.27 <sup>a</sup>
<b>50</b>	11.62 – 24.98	19.16 ± 0.13 <sup>b</sup>
<b>500</b>	8.14 – 20.99	16.04 ± 0.10 <sup>b</sup>
<b>1000</b>	10.68 – 22.57	15.54 ± 0.10 <sup>b</sup>
<b>5000</b>	10.82 – 21.92	17.05 ± 0.11 <sup>b</sup>
<b>10 000</b>	8.54 – 21.22	16.12 ± 0.99 <sup>b</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.



**Şekil 4.2.** IAA’nın *G. mellonella* toplam hemosit sayısına etkisi (*in vitro*)

#### 4.1.2. Kaliks sıvısının *G. mellonella* toplam hemosit sayısına etkisi

**In vivo:** *P. turionellae* dişilerinden elde edilen kaliks sıvısının farklı dozlarının (0,1 – 1 Dişi Eşdeğeri Kaliks) son evre *G. mellonella* larvalarının toplam hemosit sayısına etkilerinin belirlenmesi için her bir doz için beş örnekten üç tekrar yapıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3’de gösterilmektedir. Kontrol, Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonunda hemosit sayıları birbirlerine yakın değerlerken kaliks dozlarında tedrici bir azalma söz konusudur. Buna göre kaliks enjeksiyonu dozu 0,1’den 1 dişi eşdeğeri doza doğru gidildikçe hemosit sayısı azalmaktadır. Yapılan tek yönlü varyans analizi sonucunda kontrol grupları olan Kontrol, Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu grupları ile 0,1 DEK enjeksiyonu arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir; ancak diğer kaliks dozları olan 0,25 DEK; 0,5 DEK ve 1 DEK enjeksiyonu ile kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Kaliks grupları arasında ise 0,1 DEK ile 0,25 DEK ve 0,5 DEK arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz; ancak 0,1 DEK ile 1 DEK arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Son olarak 0,25 DEK, 0,5 DEK ve 1 DEK arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (F: 10.364; dF:6; P: 0.00).

Kaliks enjeksiyonunun konak toplam hemosit sayısına etkisi ile alakalı az sayıda çalışma vardır. Er ve ark. (2010) *P. turionellae* parazitlemesinin ve zehir enjeksiyonunun *G. mellonella*’da pupal ve larval hemositlerin nasıl etkilediği konusunda bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında parazitlenmenin ve zehir enjeksiyonunun pupal hemosit sayılarında kontrol grubuna göre önemli bir azalmaya neden olduğunu, ancak kendi aralarında bir farklılığa neden olmadığı sonucuna ulaşmışlardır. Pupal hemosit sayısı değişimlerinin zehir dozuna bağlı olduğunu ancak zamana göre değişmediğini de belirlemişlerdir. Larvada ise deney gruplarında farklılık gözlemlenmesine rağmen düşük dozlarda bunun anlamlı bir fark yaratmadığı, yüksek dozlarda farkların görüldüğü ortaya konmuştur. Araştırmacılar pupal evrede hemosit sayılarındaki değişimin aksine larval evrede hemosit sayılarındaki değişimin hem doza hem de zamana bağlı olarak değiştiği sonucuna varmışlardır.

Davies ve ark. (1987) *Campoletis sonorensis* PDV’lerinin *Heliothis virescens* hemosit sayısı ve plazmatosit davranışlarına etkisinin incelendiği çalışmalarında; kaliks enjeksiyonunun zamana bağlı olarak hemosit sayısını düşürdüğü, ilk dört saatte hemosit sayısında önemli bir değişiklik olmazken sekizinci saatten sonra hemosit sayısındaki değişimlerin önemli olduğunu bulmuşlardır. Kaliks enjeksiyonunu takip eden 16 gün

boyunca incelemelerine devam etmişler sekizinci saat sonrasında bulunan sonuçlar ile 16. gün sonunda elde edilen veriler arasında istatistiksel fark bulunamamıştır.

Strand ve Noda (1991) *Microplitis demolitor* (Hymenoptera: Braconidae) parazitizminin *Pseudoplusia includens* hemositleri üzerine etkilerini incelediği çalışmada parazitlenme sonrası ilk üç günde hemosit sayılarında artış, sonrasında ise azalma olduğunu bulmuşlardır. Kaliks sıvısının etkisini ise doza bağlı olarak değiştiğini; düşük dişi eşdeğeri uygulamalarında kontrol grubundan daha yüksek oranda hemosit gözlemlendiğini, yüksek doz uygulamalarının ise kontrol grubu ile hemen hemen aynı olduğunu bulmuşlardır. Aynı zamanda kaliks sıvısı ile birlikte zehir enjeksiyonunun da sonucu değiştirmedeğini bildirmişlerdir.

Gupta ve Ferkovich (1998) kaliks enjeksiyonunun *Galleria mellonella* larvasında gelişimi belirgin oranda önlediği, puplaşmanın da azaldığı sonucuna varmışlardır.

Stettler ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada farklı türlerin parazitlenmesinin, zehir ve/veya kaliks enjeksiyonunun enkapsülasyon, hemositlerin yayılma aktivitesi, toplam ve farklı hemositlere etkileri ile hemosit morfolojisine etkilerini özetlemişlerdir. Bu çalışmada yer alan tabloya göre kaliks sıvısı, zehir sıvısı ve parazitlenme türden türe değişken özellik göstermektedir. Çalışmalarının sonucu olarak kaliks sıvısı ve PDV'lerin tek başlarına veya zehir ile birlikte hemositlerdeki değişikliklerden sorumlu olabileceklerini öne sürmüşlerdir.

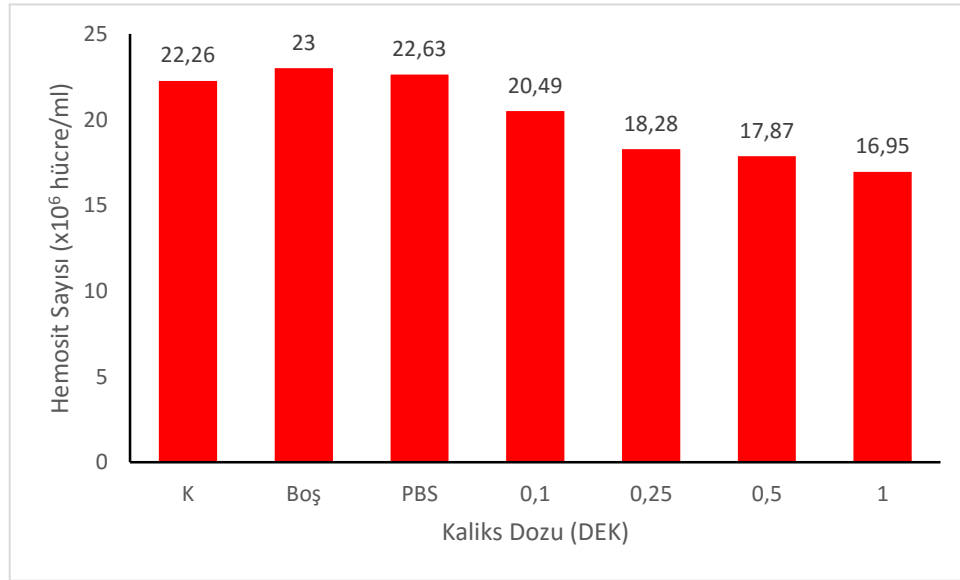
Literatür bilgisi incelendiğinde kaliks sıvısının enjeksiyonu ile toplam hemosit sayısında genel olarak azalma görülmektedir. Önceki çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda kaliks sıvısının etkisi türden türe değişmektedir. Er ve ark. (2010)'nın zehir enjeksiyonundan elde ettiği sonuç ve diğer literatür bilgisi ile karşılaştırıldığında; çalışmamızda elde ettiğimiz kaliks enjeksiyonunun hemosit sayısında azalmaya neden olması sonucu literatür bilgisi ile genel olarak uyum içerisindedir.

**Çizelge 4.3.** Kaliks sıvısının *G. mellonella* toplam hemosit sayısına etkisi (*in vivo*)

Kaliks dozu (DEK)	Min. - Max. değerler ( x10 <sup>6</sup> ) (Hücre/ml)	Hemosit Ortalaması ( x10 <sup>6</sup> ) (Hücre/ml) ± SH *
<b>Kontrol</b>	18.40 – 28.30	22.26 ± 0.80 <sup>a</sup>
<b>Boş</b>	17.50 – 28.80	23.00 ± 0.96 <sup>a</sup>
<b>PBS</b>	17.70 – 26.70	22.63 ± 0.73 <sup>a</sup>
<b>0,1</b>	17.50 – 24.70	20.49 ± 0.50 <sup>ab</sup>
<b>0,25</b>	12.50 – 24.60	18.28 ± 0.91 <sup>bc</sup>
<b>0,50</b>	12.80 – 23.20	17.87 ± 0.78 <sup>bc</sup>
<b>1</b>	11.30 – 21.00	16.95 ± 0.69 <sup>c</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a-c) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir



**Şekil 4.3.** Kaliks sıvısının *G. mellonella* toplam hemosit sayısına etkisi (*in vivo*)

*In vitro* *P. turionellae* dişilerinden elde edilen kaliks sıvısının farklı dozlarının (0,1 – 1 Dişi eşdeğeri) son evre *G. mellonella* larvalarının toplam hemosit sayısına etkilerinin *in vitro* belirlenmesi için her bir doz için üç tekrar yapıldı ve her tekrarda beş örnek kullanıldı.

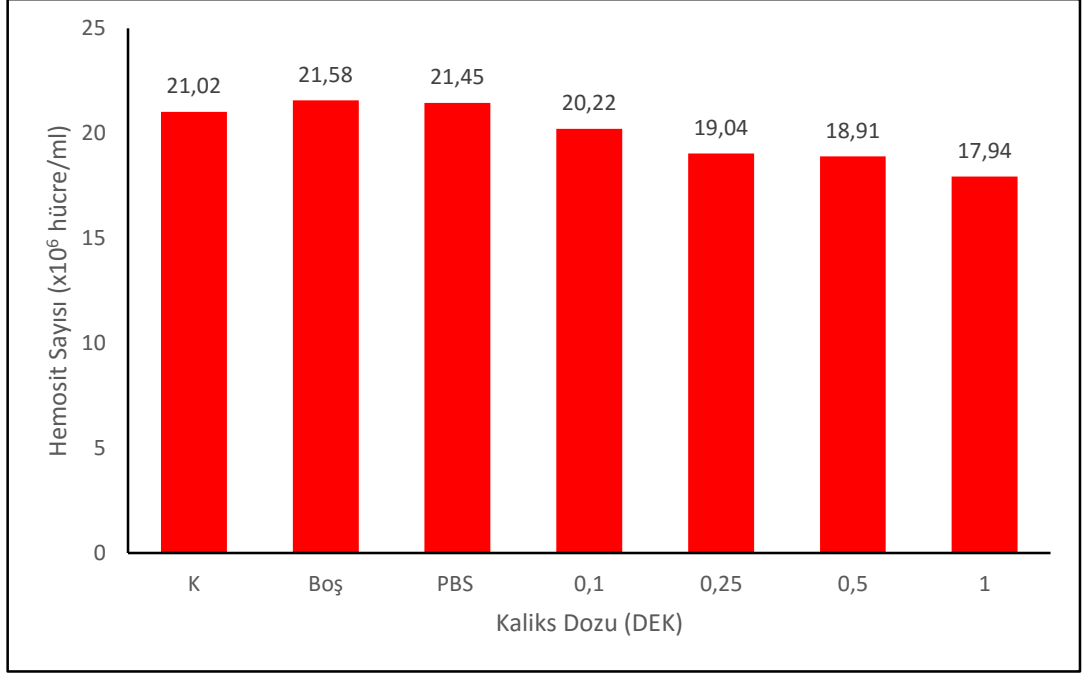
Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4. ve Şekil 4.4’de gösterilmektedir. Kontrol, Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonunda hemosit sayısı ortalamaları birbirine yakındır. Hemosit sayısı kaliks dozlarında ise 0,1’den 1 dişi eşdeğeri doza doğru gidildikçe azalmaktadır. SPSS programı ile yapılan tek yönlü varyans analizi sonucu farklı dozlardaki kaliks enjeksiyonunun *in vivo* ve *in vitro* sonuçları aynıdır. Kontrol, Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu grupları ile 0,1 DEK enjeksiyonu arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir. Diğer enjeksiyon dozları olan 0,25 DEK; 0,5 DEK ve 1 DEK enjeksiyonu ile kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Kaliks grupları arasında ise 0,1 DEK ile 0,25 Dek ve 0,5 DEK arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunurken 0,1 DEK ile 1 DEK arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Kaliks dozları arasında son olarak 0,25 DEK, 0,5 DEK ve 1 DEK arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (F: 16.591; dF:6; P: 0.00).

**Çizelge 4.4.** Kaliks sıvısının *G. mellonella* hemosit sayısına etkisi (*in vitro*)

Kaliks dozu (DEK)	Min. - Max. değerler ( x10 <sup>6</sup> ) (Hücre/ml)	Hemosit Ortalaması ( x10 <sup>6</sup> ) (Hücre/ml) ± SH *
<b>Kontrol</b>	18.24 – 24.43	21.02 ± 0.48 <sup>a</sup>
<b>Boş</b>	17.91 – 23.88	21.58 ± 0.41 <sup>a</sup>
<b>PBS</b>	19.76 – 23.06	21.46 ± 0.25 <sup>a</sup>
<b>0,1</b>	17.89 – 22.62	20.22 ± 0.34 <sup>ab</sup>
<b>0,25</b>	16.40 – 20.77	19.04 ± 0.33 <sup>bc</sup>
<b>0,50</b>	16.21 – 20.91	18.91 ± 0.35 <sup>bc</sup>
<b>1</b>	16.62 – 19.29	17.94 ± 0.20 <sup>c</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a-c) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.



Şekil 4.4. Kaliks sıvısının *G. mellonella* toplam hemosit sayısına etkisi (*in vitro*)

#### 4.1.3. IAA'nın *P. turionellae* toplam hemosit sayısına etkisi

Farklı IAA dozlarının (50-10 000 ppm) parazitoid *P. turionellae* hemosit sayısına etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışma sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5'de gösterilmektedir. Kontrol grubunda ml'de ortalama 17.11 x10<sup>6</sup> hücre vardır. En yüksek hemosit sayısı ml'de 18.29 x10<sup>6</sup> hücre ile 50 ppm dozda tespit edildi. Yapılan tek yönlü varyans analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile IAA grupları arasında hemosit sayısı farklı olsa da istatistiksel olarak bu fark önemsiz olarak bulundu. (F: 0.736; dF:5; P: 0.599)

Literatür de *P. turionellae* hemosit sayılarına ilişkin bir çalışma bulunmadığı gibi BGD'lerin bu tür üzerine etkisine ilişkin bir çalışma da bulunmamaktadır. Ancak konak tür *G. mellonella* hemosit sayısında IAA dozlarına bağlı değişim göz önünde tutulduğunda *P. turionellae* hemosit sayısında değişim gözlemlenmemesi, elde edilen diğer bulgularla uyum içerisindedir.

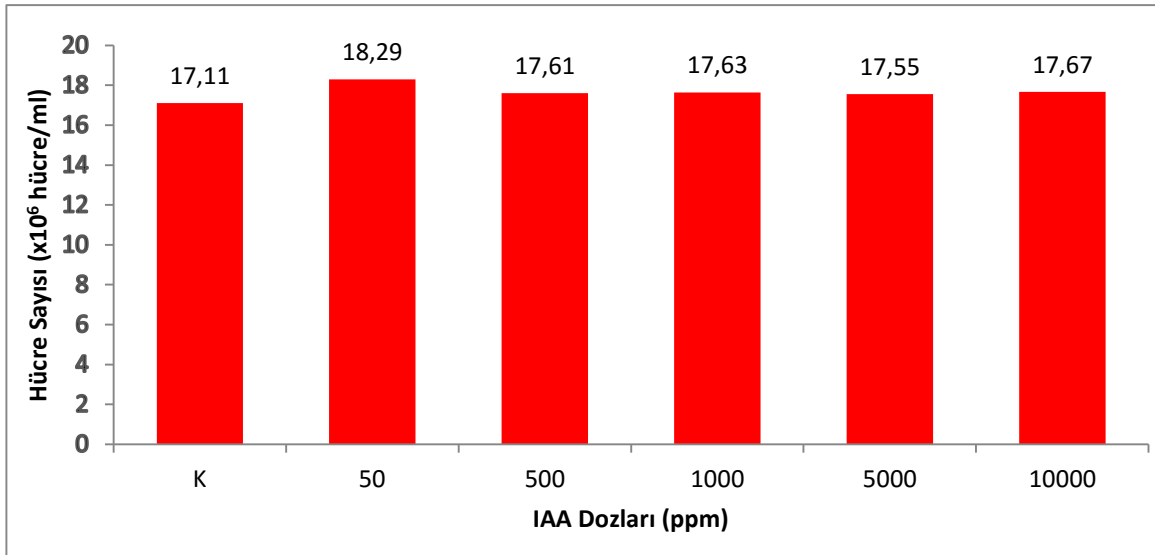


**Çizelge 4.5.** IAA'nın *P. turionellae* toplam hemosit sayısına etkisi

IAA dozu (ppm)	Min. - Max. değerler (x10 <sup>6</sup> ) (Hücre/ml)	Hemosit Ortalaması (x10 <sup>6</sup> ) (Hücre/ml) ± SH *
Kontrol	15.30 – 19.40	17.11 ± 0.32 <sup>a</sup>
50	15.40 – 20.70	18.29 ± 0.45 <sup>a</sup>
500	14.40 – 21.10	17.61 ± 0.60 <sup>a</sup>
1000	15.20 – 18.80	17.63 ± 0.26 <sup>a</sup>
500	16.60 – 19.00	17.55 ± 0.17 <sup>a</sup>
10 000	13.10 – 21.50	17.67 ± 0.63 <sup>a</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a-c) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.



**Şekil 4.5.** IAA'nın *P. turionellae* toplam hemosit sayısına etkisi

## 4.2. *G. mellonella* Hemositlerinin Enkapsülasyon ve Melanizasyonu

### 4.2.1. IAA'nın enkapsülasyona etkisi

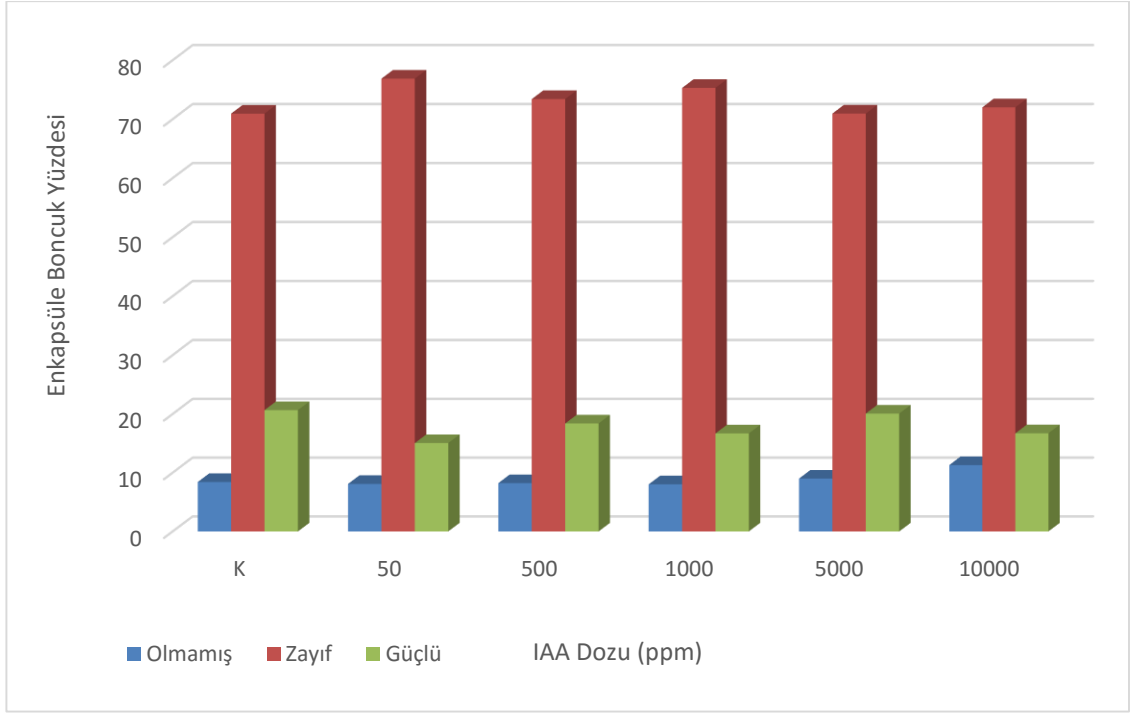
Belirlenmiş IAA dozlarında yetiştirilen *G. mellonella* larvalarındaki enkapsülasyon tepkisindeki değişiklikleri incelemek için üç tekrar yapıldı ve tepkiler 4. saat ile 24. saatte gözlemlendi. Her doz için 4. saatte 15, 24. saatte 15 olmak üzere toplam 30 örnek üzerinde deneme yapıldı. Dördüncü saat için elde edilen bulgular Şekil 4.6'da, 24. saat için elde edilen

bulgular Şekil 4.7’de gösterilmektedir. Ayrıca elde edilen verilerin tamamı Çizelge 4.6’da sunulmaktadır. Yapılan tek yönlü varyans analizi sonucuna göre IAA dozları kontrol grubuna göre çeşitli değişiklikler gösterse de bu farklılıklar 4. saatte istatistiki olarak önemsiz bulunurken, 24. Saatte 50 ppm ile 5000 ppm arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bu dozların diğer dozlar ve kontrol grubu ile arasındaki fark ise önemsiz olarak saptandı.

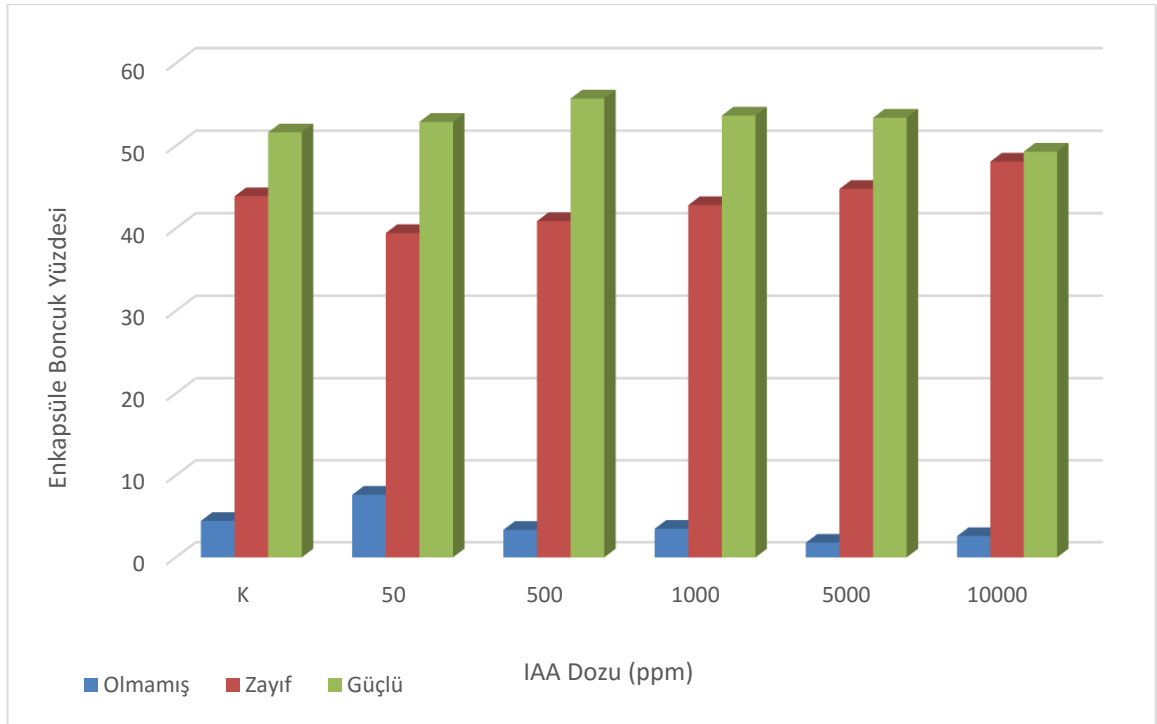
4. enkapsülasyon sonuçları incelendiğinde; enkapsülasyon bakımından istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır [(enkapsüle olmamış boncuk; F: 0.373; dF: 5; P: 0.866) (zayıf enkapsüle olmuş; F: 0.797; dF: 5; P: 0.555) (güçlü enkapsüle olmuş; F: 0.451; dF: 5; P: 0.711)].

24. saat enkapsülasyon sonuçları değerlendirildiğinde; enkapsüle olmamış boncuklar bakımından 50 ppm doz ile 5000 ppm doz arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Enkapsüle olmamış boncuklar 50 ppm dozunda artış gösterirken (% 7.65), diğer tüm dozlarda kontrole (% 4.46) göre düşük bulundu. En düşük değer ise 5000 ppm’de (% 1.81) bulundu. Enkapsüle olmamış boncuk durumları bakımından 50 ppm ve 5000 ppm birbirlerinden farklı iken; diğer IAA dozları ve kontrol ile aralarındaki fark önemsizdir (F: 2.235; dF:5; P: 0.058). Zayıf ve güçlü enkapsüle olmuş boncukların yüzde durumları değerlendirildiğinde anlamlı bir fark bulunamamıştır [( zayıf enkapsüle olmuş; F: 0.621; dF:5; P: 0.684) (güçlü enkapsüle olmuş F: 0.251; dF:5; P: 0.938)].

Böcek hemosit aracılı bağışıklık tepkilerinden birisi olan enkapsülasyon davranışına BGD’lerin etkileri ile alakalı az sayıda çalışma bulunmaktadır. Altuntaş ve ark. (2012) GA<sub>3</sub> ile yaptıkları çalışmada bu hormonun 4. saat enkapsülasyon davranışlarında enkapsüle olmamış ve güçlü enkapsüle olmuş boncuk sayısında artışa neden olduğu, 24. saat enkapsülasyon davranışlarında ise zayıf enkapsüle olmuş boncuk sayısı artarken, güçlü enkapsüle olmuş boncuk sayısında önemli oranda azalma olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Bu bakımdan değerlendirildiğinde çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar GA<sub>3</sub> ile yapılan çalışmada elde edilen sonuçlardan farklılık göstermektedir. Bunun nedeni olarak iki farklı bitki gelişim düzenleyicisi olan IAA ve GA<sub>3</sub>’ün birbirlerinden farklı BGD olmaları ve farklı mekanizmalarla çalışıyor olmaları düşünülebilir.



Şekil 4.6. IAA'nın *G. mellonella* enkapsülasyonuna etkilerinin 4. saat sonuçları



Şekil 4.7. IAA'nın *G. mellonella* enkapsülasyonuna etkilerinin 24. saat sonuçları

**Çizelge 4.6.** IAA'nın *G. mellonella* enkapsülasyonuna etkisinin 4. ve 24. saat sonuçları

IAA dozu (ppm)	4. saat [Boncuk sayısı (% ± SH)*]			
	Boncuk Sayısı	Enkapsüle olmamış	Zayıf Enkapsülasyon	Güçlü Enkapsülasyon
<b>Kontrol</b>	263	23 (%8.41 ± 2.09) <sup>a</sup>	182 (%70.93 ± 2.82) <sup>a</sup>	58 (%20.66 ± 2.87) <sup>a</sup>
<b>50</b>	292	25 (%8.09 ± 2.47) <sup>a</sup>	220 (%76.87 ± 3.89) <sup>a</sup>	47 (%15.04 ± 4.16) <sup>a</sup>
<b>500</b>	319	33 (%8.22 ± 1.75) <sup>a</sup>	223 (%73.41 ± 3.46) <sup>a</sup>	63 (%18.37 ± 2.99) <sup>a</sup>
<b>1000</b>	312	29 (%8.02 ± 1.89) <sup>a</sup>	229 (%75.30 ± 2.82) <sup>a</sup>	54 (%16.68 ± 2.44) <sup>a</sup>
<b>5000</b>	287	26 (%8.99 ± 2.06) <sup>a</sup>	202 (%70.94 ± 3.35) <sup>a</sup>	59 (%20.06 ± 3.11) <sup>a</sup>
<b>10 000</b>	266	33 (%11.29 ± 1.92) <sup>a</sup>	191 (%71.99 ± 2.64) <sup>a</sup>	42 (%16.71 ± 2.76) <sup>a</sup>
24. saat [Boncuk sayısı (% ± SH)*]				
<b>Kontrol</b>	315	10 (%4.46 ± 1.35) <sup>ab</sup>	136 (%43.90 ± 3.81) <sup>a</sup>	169 (%51.64 ± 4.31) <sup>a</sup>
<b>50</b>	327	21 (%7.65 ± 2.01) <sup>b</sup>	122 (%39.44 ± 2.98) <sup>a</sup>	184 (%52.92 ± 3.86) <sup>a</sup>
<b>500</b>	330	14 (%3.37 ± 0.88) <sup>ab</sup>	131 (%40.89 ± 3.71) <sup>a</sup>	185 (%55.74 ± 4.16) <sup>a</sup>
<b>1000</b>	326	9 (%3.50 ± 1.42) <sup>ab</sup>	130 (%42.83 ± 4.27) <sup>a</sup>	187 (%53.67 ± 5.08) <sup>a</sup>
<b>5000</b>	292	6 (%1.81 ± 0.87) <sup>a</sup>	124 (%44.79 ± 4.92) <sup>a</sup>	162 (%53.41 ± 4.73) <sup>a</sup>
<b>10 000</b>	287	8 (%2.60 ± 1.35) <sup>ab</sup>	135 (%48.10 ± 5.19) <sup>a</sup>	144 (%49.30 ± 4.52) <sup>a</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a-b) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.

#### 4.2.2. IAA'nın melanizasyona etkisi

Farklı dozlardaki IAA'nın konak *G. mellonella* hemositlerinin melanizasyon davranışlarına etkisinin incelendiği deneylerde 4. saat sonucunda ulaşılan sonuçlar Şekil

4.8’de gösterilmektedir. Şekil 4.9’da ise 24. saat sonuçları verilmektedir. Tüm sonuçlar bir arada Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

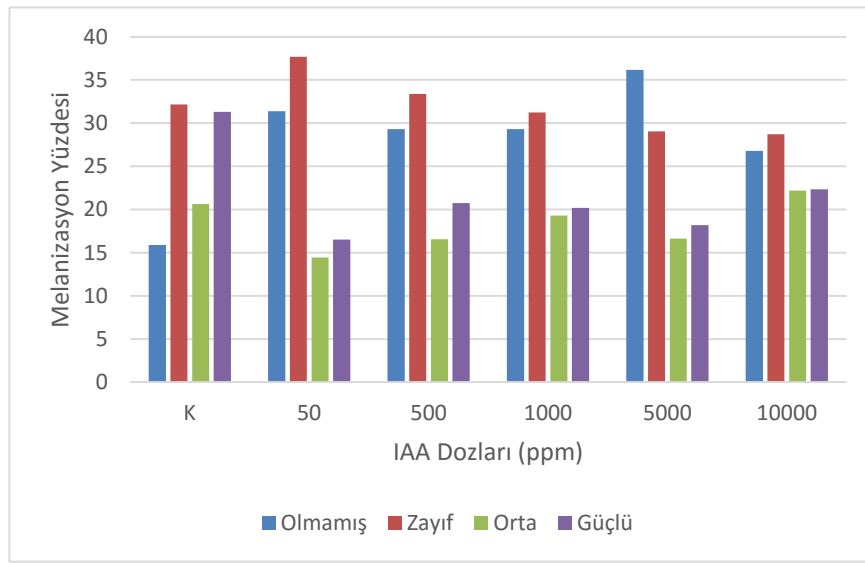
Sonuçlar değerlendirildiğinde 4. saatte zayıf melanizasyonda gruplar arasında fark görülmemiştir (F: 0.640; dF:5; P: 0.670). Orta dereceli melanizasyonda da gruplar arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (F: 1.192; dF:5; P: 0.32). Güçlü melanizasyon bakımından değerlendirildiğinde 50 ppm dozu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark vardır. Bunun yanında 50 ppm dozu ile diğer IAA dozları arasında önemli bir farklılık bulunmazken, 50 ppm dışındaki dozlar ile kontrol grubu arasında da fark yoktur (F: 2.631; dF:5; P: 0.029). Melanize olmamış boncuklar bakımından değerlendirildiğinde 5000 ppm dozu diğer IAA dozlarından farklılık göstermezken, kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır. Melanize olmamış boncuklar bakımından kontrol grubu ile 5000 ppm dozu arasındaki fark önemli, bu grupların diğer IAA dozları ile arasındaki fark anlamsızdır (Olmamış F: 2.446; dF:5; P: 0.040).

Melanizasyonun 24. saatte zayıf olarak sınıflandırılan durumunda gruplar arasındaki fark önemsiz bulundu (F: 2.216; dF:5; P: 0.060). Orta olarak sınıflandırılan melanizasyon tepkisinde ise dozlar arası fark anlamsız olarak tespit edildi (F: 1.094; dF:5; P: 0.370). Güçlü melanizasyon görülen gruplar arası fark anlamsızdır (F: 1.967; dF:5; P: 0.092). Melanize olmamış boncuklar bakımından değerlendirildiğinde 50 ppm ve 1000 ppm dozları kontrol grubundan farklılık göstermektedir, bunun yanında 50, 1000 ve 5000 ppm dozları arasındaki fark önemsizdir. Aynı zamanda 1000 ppm dozu ile 10 000 ve 500 ppm dozları arasındaki fark da önemlidir. Melanize olmamış boncuklar bakımından kontrol grubu ile 500, 5000 ve 10 000 ppm dozları arasındaki fark önemsizdir (F: 5.158; dF:5; P: 0.00).

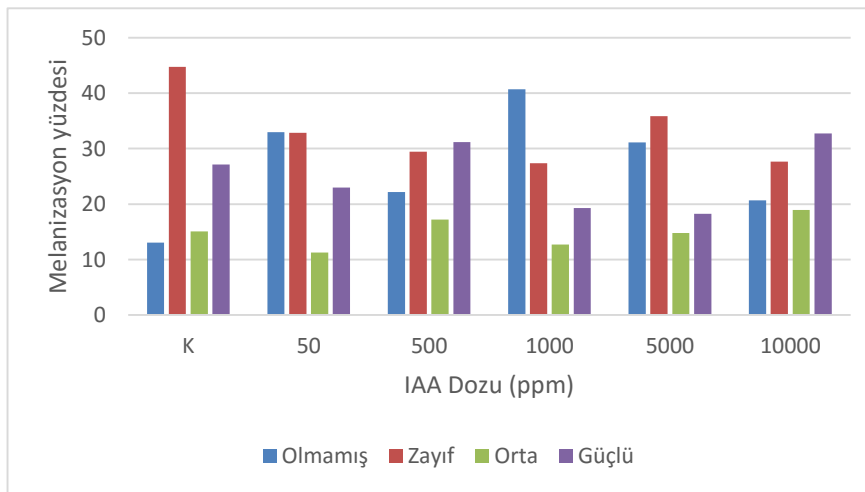
Melanizasyon durumları zayıf, orta ve güçlü olarak sınıflandırılmadan; melanize olmuş ve olmamış boncuklar karşılaştırıldığında 4. saatte kontrol grubunda boncukların %15.89 melanize olmamışken kalan %84.11’luk kısmı melanize olmuştur. IAA’nın 5000 ppm dozunda melanize olmamış boncukların yüzdesi %36.15 iken melanize olan boncukların yüzdesi % 63.85’dir. Melanize olmamış boncukların istatistiki değerlendirmesinde bu iki grup arasındaki fark önemli bulunmuştur. Melanize olmamış boncukların 24. saat durumları incelendiğinde kontrol grubundan elde edilen boncuklardan %13.06’sı melanize olmamışken %86.94’ü melanize olmuştur. Kontrol grubuna göre melanize olmamış boncuk bakımından farklılık gösteren 50 ppm dozunda boncukların %32.95’i melanize olmamışken, %62.05’i melanize olmuştur. Aynı şekilde kontrol

grubundan 1000 ppm dozunda boncukların %40.67'si melanize olmamış, %59.33'ü melanize olmuştur.

IAA'nın melanizasyon tepkimelerine etkisi hakkında literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. İlk kez çalışmamızda uyguladığımız melanizasyon derecesine göre sınıflandırarak incelenmesi önceden yapılmadığı için bir karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak melanize olmuş boncuk sayısı bakımından bir değerlendirme yapılacak olursa IAA'nın melanizasyonu tüm dozlarında azalttığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu sonuç Altuntaş ve ark. (2012)'nin melanizasyon sonuçları ile uyum içerisindedir.



Şekil 4.8. IAA'nın *G. mellonella* 4. saat melanizasyonuna etkisi (% değer)



Şekil 4.9. IAA'nın *G. mellonella* 24. saat melanizasyonuna etkisi (% değer)

**Çizelge 4.7.** IAA'nın *G. mellonella* melanizasyonuna etkisinin 4. ve 24. saat sonuçları

IAA dozu (ppm)	Melanizasyon (% ± SH*)			
	4 saat			
	Olmamış	Zayıf	Orta	Güçlü
<b>Kontrol</b>	15.89 ± 3.41 <sup>a</sup>	32.17 ± 4.25 <sup>a</sup>	20.64 ± 3.13 <sup>a</sup>	31.31 ± 3.80 <sup>a</sup>
<b>50</b>	31.38 ± 4.53 <sup>ab</sup>	37.69 ± 4.95 <sup>a</sup>	14.43 ± 2.07 <sup>a</sup>	16.50 ± 1.93 <sup>b</sup>
<b>500</b>	29.32 ± 5.37 <sup>ab</sup>	33.37 ± 6.11 <sup>a</sup>	16.56 ± 3.05 <sup>a</sup>	20.74 ± 3.66 <sup>ab</sup>
<b>1000</b>	29.29 ± 4.03 <sup>ab</sup>	31.23 ± 3.86 <sup>a</sup>	19.30 ± 2.44 <sup>a</sup>	20.18 ± 3.37 <sup>ab</sup>
<b>5000</b>	36.15 ± 5.21 <sup>b</sup>	29.05 ± 4.52 <sup>a</sup>	16.61 ± 3.01 <sup>a</sup>	18.19 ± 3.56 <sup>ab</sup>
<b>10 000</b>	26.78 ± 3.03 <sup>ab</sup>	28.71 ± 2.88 <sup>a</sup>	22.17 ± 2.65 <sup>a</sup>	22.34 ± 3.12 <sup>ab</sup>
24 saat				
<b>Kontrol</b>	13.06 ± 2.32 <sup>a</sup>	44.74 ± 4.96 <sup>a</sup>	15.05 ± 2.71 <sup>a</sup>	27.16 ± 5.25 <sup>a</sup>
<b>50</b>	32.95 ± 4.63 <sup>bc</sup>	32.85 ± 4.54 <sup>a</sup>	11.25 ± 1.54 <sup>a</sup>	22.95 ± 4.42 <sup>a</sup>
<b>500</b>	22.18 ± 4.43 <sup>ab</sup>	29.45 ± 5.08 <sup>a</sup>	17.22 ± 2.69 <sup>a</sup>	31.15 ± 4.31 <sup>a</sup>
<b>1000</b>	40.67 ± 5.41 <sup>c</sup>	27.34 ± 3.64 <sup>a</sup>	12.71 ± 2.29 <sup>a</sup>	19.28 ± 3.34 <sup>a</sup>
<b>5000</b>	31.10 ± 4.24 <sup>abc</sup>	35.84 ± 3.60 <sup>a</sup>	14.80 ± 3.49 <sup>a</sup>	18.27 ± 2.97 <sup>a</sup>
<b>10 000</b>	20.65 ± 4.33 <sup>ab</sup>	27.67 ± 4.83 <sup>a</sup>	18.96 ± 3.00 <sup>a</sup>	32.72 ± 5.17 <sup>a</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi taşıyan gruplar arasında ki fark istatistiksel olarak önemsizdir (a-c)

#### 4.2.3. Kaliks sıvısının enkapsülasyona etkisi

Belirlenmiş Dişi Eşdeğeri Kaliks (DEK) dozları (Kontrol, Boş enjeksiyon, PBS enjeksiyonu, 0,1 DEK, 0,25 DEK, 0,50 DEK ve 1 DEK) ile *G. mellonella* larvalarındaki enkapsülasyon tepkisindeki değişiklikleri incelemek için üç tekrar yapıldı ve tepkiler 4. saat ile 24. saat sonunda gözlemlendi. Her doz için 4. saatte 15, 24. saatte 15 olmak üzere toplam 30 örnek üzerinden deneme yapıldı. 4. saat için elde edilen bulgular Şekil 4.10'da, 24. saat için elde edilen bulgular Şekil 4.11'de gösterilmektedir. Elde edilen veriler yüzde değer olarak Çizelge 4.8'dedir.

Kaliks enjeksiyonunu takip eden 4. saatte kontrol grupları olan Kontrol, Boş Enjeksiyon ve PBS enjeksiyonunda tüm enkapsülasyon durumlarında (enkapsüle olmamış, zayıf enkapsüle olmuş ve güçlü enkapsüle olmuş) boncuklar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız olarak saptandı. Kaliks enjeksiyon grupları olan 0,1 DEK, 0,25 DEK, 0,5 DEK ve 1 DEK grupları arasındaki fark ise tüm enkapsülasyon durumlarında istatistiksel olarak önemsiz bulundu. Kaliks enjeksiyonu yapılan örnekler ile kontrol grupları arasındaki fark ise tüm enkapsülasyon durumlarında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kaliks enjeksiyonuna bağlı olarak doz arttıkça (0,1 DEK den 1 DEK'e doğru) enkapsüle olmamış boncuk yüzdesi de artış gösterdi. Zayıf ve güçlü enkapsüle olan boncukların yüzde değerleri de kaliks enjeksiyon dozu arttıkça kontrol gruplarına göre azaldı [(Enkapsüle olmamış F: 41.197; dF:6; P: 0.00), (Zayıf Enkapsüle Olmuş F: 45.586; dF:6; P: 0.00), (Güçlü Enkapsüle Olmuş F: 7.863; dF:6; P: 0.00)].

Kaliks enjeksiyonundan 24. saat sonra kontrol grupları (Kontrol, Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu) ile 0,1 ve 0.25 DEK dozu arasında enkapsüle olmamış boncuk yüzdesi bakımından anlamlı bir farklılık tespit edilemedi. Enkapsüle olmamış boncuk durumu bakımından 0,5 DEK ve 1 DEK arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır, bu yüksek kaliks dozları ile kontrol grupları, 0,1 ve 0,25 DEK arasındaki farkda istatistiksel olarak anlamlıdır. Kaliks enjeksiyonuna bağlı olarak enkapsüle olmamış boncuk sayısı doz arttıkça doğru orantılı olarak artış gösterdi. Zayıf enkapsülasyon durumunda kontrol grupları ile 0,5 DEK ve 1 DEK dozları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı. Diğer dozlar ve kontrol grupları ile 0,1 DEK ve 0,25 dozları arasındaki fark önemli bulundu. Aynı zamanda 0,1 DEK ve 0,25 DEK dozlarının kendi aralarındaki fark önemsizdir. Güçlü enkapsülasyon tepkisi bakımından ise kontrol grupları kendi arasında anlamlı bir fark göstermezken, kaliks dozları da kendi arasında önemli bir fark göstermedi. Ancak kaliks enjeksiyon grupları ile kontrol grupları arasındaki fark önemlidir [(Enkapsüle olmamış F: 56.850; dF:6; P: 0.00), (Zayıf Enkapsüle Olmuş F: 22.371; dF:6; P: 0.00), (Güçlü Enkapsüle Olmuş F: 130.726; dF:6; P: 0.00)].

Davies ve Vinson (1988) çalışmalarında. *sonorensis* kaliks sıvısının *H. virescens* enkapsülasyon tepkisini baskıladığı sonucuna ulaşmıştır. Luchart ve Webb (1996) *Campoletis sonorensis* ile yaptıkları çalışmada 0,1; 0,4 ve 1 DEK dozlarının erken enkapsülasyona etkisi olmadığı, uzun vadede (24 saat sonunda) ise etkili olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Kitano (1982) *Apanteles glomeratus* ile yaptığı çalışmasında zehir aparatı uzaklaştırıldığında; sadece kaliks sıvısı ve yumurta enjekte edildiğinde enkapsülasyon

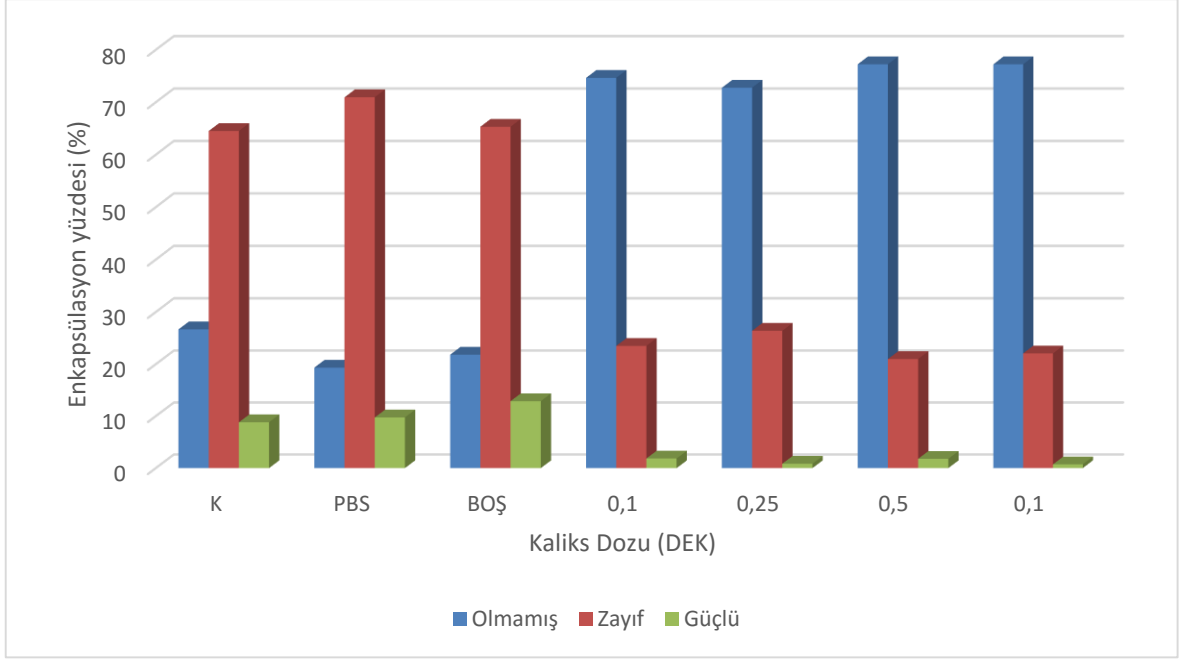


gözlemlemiştir. Normal *A. glomeratus* ile yaptığı çalışmada ise yumurtaların hiçbirisinin enkapsüle olmadığı sonucunu bulmuştur. Çalışmasının sonucunda *A. glomeratus* zehir kesesinin konak bağışıklığını baskılamada önemli bir faktör olduğunu belirtmiştir. Kitano (1986) yaptığı bir diğer çalışmada ise *A. glomeratus* kaliks sıvısının bir önce bahsettiğimiz çalışmasında olduğu gibi tek başına enkapsülasyonu baskılamada yeterli olmadığı sonucunu bulmuştur.

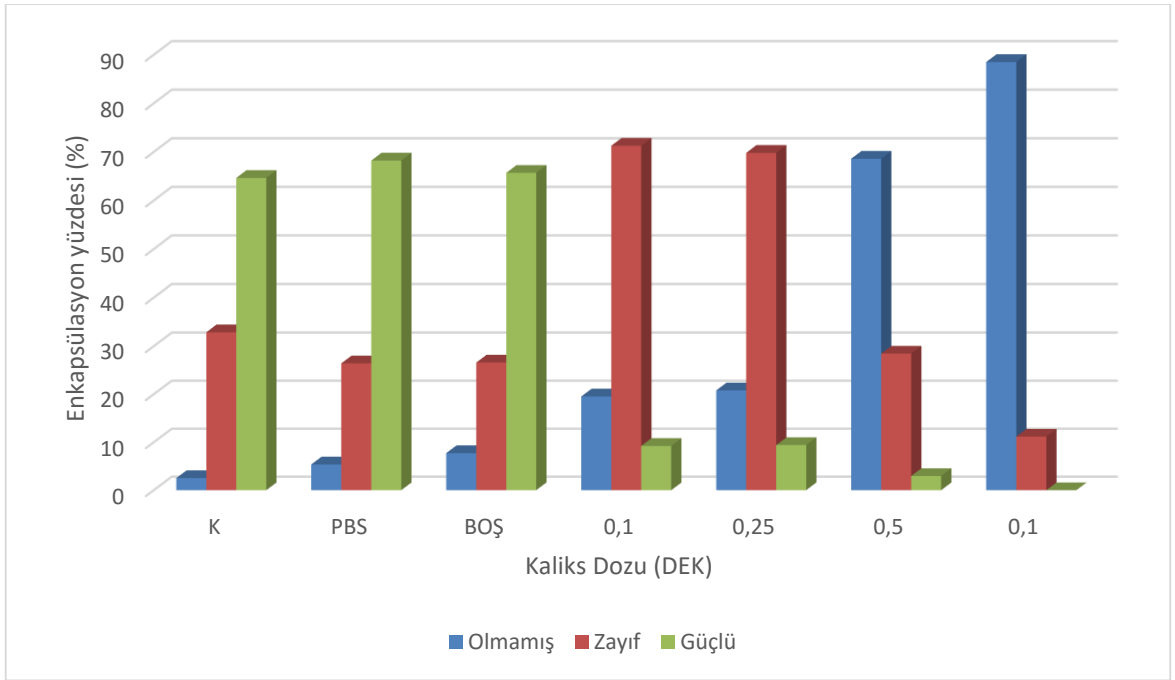
Webb ve Luckhart (1994) *C. sonorensis* zehir ve ovaryum proteinlerinin *H. virescens* üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında PDV'lerin ilk ekspresyonlarının parazitlenmenin 4. saatinden sonra görülmeye başladığını tespit etmişlerdir. Stoltz ve Guzo (1986) çalışmalarının *Hyposoter fugitivus* kaliks sıvısı ve PDV'lerinin *Malacosoma disstria* enkapsülasyon tepkisine etkisini inceledikleri kısımda kaliks ve PDV'lerin enkapsülasyonu büyük oranda baskılandığını göstermişlerdir.

Tanaka (1987c) çalışmasında zehir enjeksiyonunun enkapsülasyonunu baskılamadığı; sadece kaliks enjeksiyonunda % 54'ünün tamamen enkapsüle olduğunu, %39'una hemositlerin bağlandığını tespit etmiştir. Zehir ve kaliks enjeksiyonunda ise Sephadex boncuklarının % 38,5 oranında enkapsüle olmadığını, % 46,2'sinin yüzeyine hemositlerin bağlandığını, % 15,4 oranında ise tamamen enkapsüle olduğunu bulmuştur.

Çalışmamızda elde edilen bulgular yukarıda özetlenen literatür bilgisi ile uyum içerisindedir. Kaliks sıvısının 4. saat enkapsülasyon davranışlarını baskılandığı görülmektedir. Öte yandan 24. saat enkapsülasyon davranışları bakımından incelendiğinde enkapsüle olmamış boncuklar sadece yüksek dozlarda artış gösterirken, zayıf enkapsülasyon 0,1 ve 0,25 DEK dozları diğer kaliks dozlarından ve kontrol gruplarından farklılık göstermektedir. Güçlü enkapsülasyon bakımından ise yine yüksek kaliks dozları olan 0,5 ve 1 DEK dozları diğer dozlar ve kontrol gruplarından farklılık göstermektedir. Kaliks ile alakalı çalışmaların yanında Er ve ark. (2010) çalışması göz önünde bulundurulduğunda *P. turionellae* zehirinin *G. mellonella* enkapsülasyonunun baskılanmasında kaliks sıvısı ile birlikte iş gördüğü düşünülebilir.



Şekil 4.10. Kaliks sıvısının *G. mellonella*'nın 4. saat enkapsülasyonuna etkisi



Şekil 4.11. Kaliks sıvısının *G. mellonella*'nın 24. saat enkapsülasyonuna etkisi

**Çizelge 4.8.** Kaliks sıvısının *G. mellonella*'nin enkapsülasyonuna etkisinin 4. saat ve 24. saat sonuçları

Kaliks (DEK)	4 saat (ortalama $\pm$ SH*)			
	Boncuk Sayısı	Enkapsüle olmamış	Zayıf Enkapsülasyon	Güçlü Enkapsülasyon
<b>Kontrol</b>	219	56 (% 26.68 $\pm$ 4.12) <sup>a</sup>	142 (% 64.51 $\pm$ 4.35) <sup>a</sup>	21 (% 8.81 $\pm$ 0.34) <sup>a</sup>
<b>Boş</b>	222	55 (% 21.81 $\pm$ 2.53) <sup>a</sup>	152 (%65.32 $\pm$ 2.60) <sup>a</sup>	15 (% 12.87 $\pm$ 1.98) <sup>a</sup>
<b>PBS</b>	249	53 (%19.32 $\pm$ 2.78) <sup>a</sup>	172 (%70.94 $\pm$ 3.45) <sup>a</sup>	24 (%9.74 $\pm$ 0.26) <sup>a</sup>
<b>0,1</b>	238	169 (% 74.65 $\pm$ 3.80) <sup>b</sup>	65 (% 23.50 $\pm$ 3.80) <sup>b</sup>	4 (% 1.85 $\pm$ 0.01) <sup>b</sup>
<b>0,25</b>	221	160 (% 72.76 $\pm$ 2.31) <sup>b</sup>	59 (%26.40 $\pm$ 2.36) <sup>b</sup>	2 (% 0.84 $\pm$ 0.06) <sup>b</sup>
<b>0,5</b>	298	227 (% 77.24 $\pm$ 2.15) <sup>b</sup>	66 (% 20.99 $\pm$ 2.00) <sup>b</sup>	5 (% 1.78 $\pm$ 0.08) <sup>b</sup>
<b>1</b>	229	177 (% 77.23 $\pm$ 4.02) <sup>b</sup>	50 (% 22.05 $\pm$ 4.15) <sup>b</sup>	2 (% 0.72 $\pm$ 0.05) <sup>b</sup>
<b>24. Saat</b>				
<b>Kontrol</b>	232	7 (% 2.52 $\pm$ 1.01) <sup>a</sup>	77 (% 32.85 $\pm$ 2.27) <sup>a</sup>	148 (% 64.64 $\pm$ 2.30) <sup>a</sup>
<b>Boş</b>	210	13 (%7.72 $\pm$ 1.33) <sup>a</sup>	56 (%26.60 $\pm$ 3.51) <sup>a</sup>	141 (% 65.68 $\pm$ 3.80) <sup>a</sup>
<b>PBS</b>	208	13 (% 5.36 $\pm$ 2.58) <sup>a</sup>	53 (% 26.43 $\pm$ 2.57) <sup>a</sup>	142 (% 68.21 $\pm$ 2.98) <sup>a</sup>
<b>0,1</b>	220	43 (% 19.53 $\pm$ 3.27) <sup>a</sup>	154 (% 71.25 $\pm$ 3.83) <sup>b</sup>	23 (% 9.22 $\pm$ 2.48) <sup>b</sup>
<b>0,25</b>	194	41 (%20.79 $\pm$ 7.36) <sup>a</sup>	135 (% 69.81 $\pm$ 7.93) <sup>b</sup>	18 (% 9.40 $\pm$ 3.24) <sup>b</sup>
<b>0,5</b>	240	178 (%77.24 $\pm$ 6.91) <sup>b</sup>	55 (% 28.46 $\pm$ 6.75) <sup>a</sup>	7 (% 2.95 $\pm$ 1.26) <sup>b</sup>
<b>1</b>	192	169 (% 89.21 $\pm$ 1.59) <sup>c</sup>	23 (% 10.79 $\pm$ 1.59) <sup>a</sup>	0 (% 0)

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a-c) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir

#### 4.2.4. Kaliks sıvısının melanizasyona etkisi

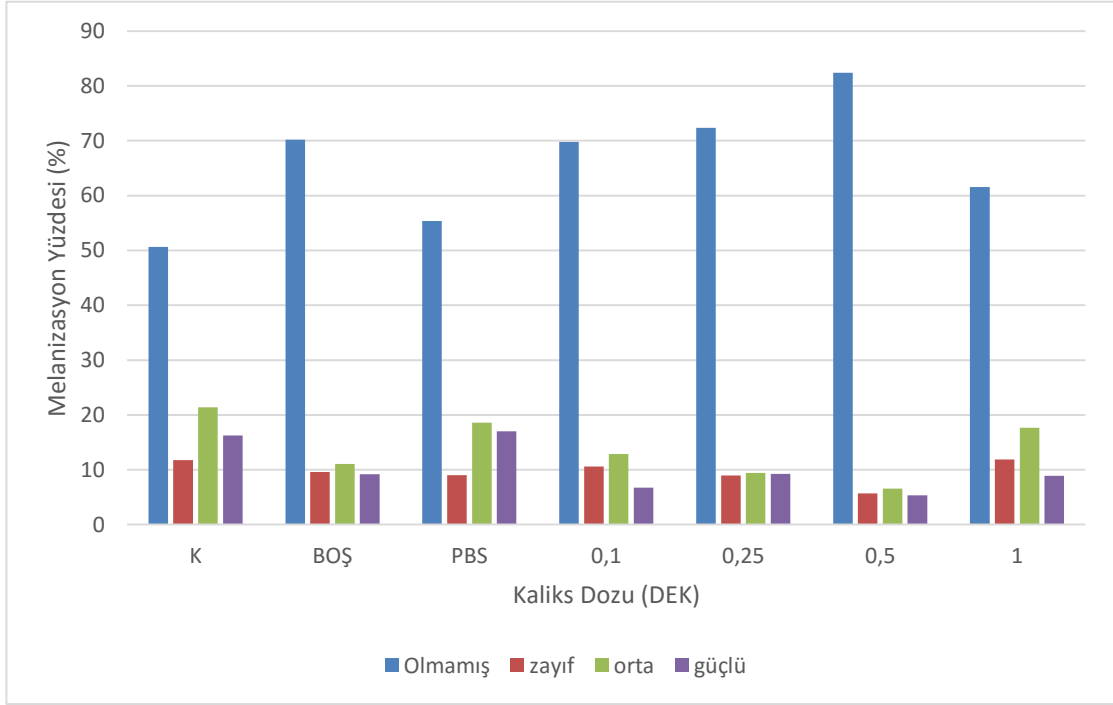
Kaliks enjeksiyonunun *G. mellonella* hemositlerinin melanizasyonuna etkisinin incelendiği deneylerde 4. saat sonucunda ulaşılan sonuçlar Şekil 4.12’de gösterilmektedir. 24. saat sonuçları ise Şekil 4.13’da gösterilmektedir, elde edilen tüm bulgular Çizelge 4.9’da sunulmaktadır. Kaliks enjeksiyonu kontrol gruplarına (Kontrol, Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu) göre hem 4. saatte hem de 24. saatte anlamlı değişikliklere neden oldu.

Yapılan deneylerin 4. saat sonuçlarında melanize olmamış boncuklar bakımından 0,5 DEK dozu kontrol, PBS enjeksiyonu ve 1 DEK dozu ile anlamlı bir farklılık gösterirken, diğer dozlarla bir farklılık göstermemiştir. Zayıf ve güçlü melanizasyonda gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. Orta melanizasyon durumunda ise 0,25 ve 0,5 DEK dozları kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermektedir. Bunun yanı sıra 0,5 DEK dozu boş enjeksiyon ve 0,1 DEK dozu ile farklılık göstermezken diğer dozlarla ve PBS enjeksiyonu ile de farklılık göstermektedir. [(Olmamış F: 4.891; dF:6; P: 0.00) (Zayıf melanizasyon F: 1.291; dF:6; P: 0.269), (Orta melanizasyon F: 4.375; dF:6; P: 0.001), (Güçlü melanizasyon F: 2.574; dF:6; P: 0.023)].

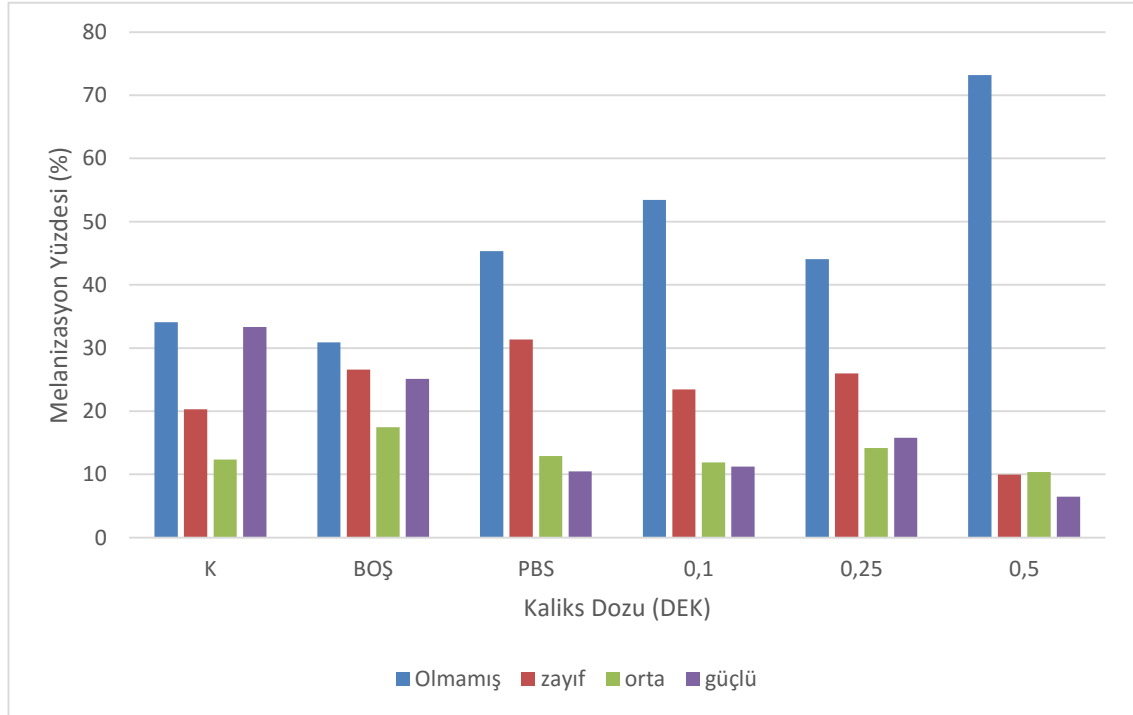
Yapılan deneyler sonucunda 1 DEK dozunda 24. saat sonunda boncuklardan hiçbirisinde melanizasyon tespit edilemedi. Melanize olmamış boncuklar bakımından 0,5 DEK dozu 0,1 DEK dozundan farklılık göstermedi, diğer tüm dozlar ve kontrol grupları ile arasındaki fark önemli bulundu. Zayıf melanizasyon bakımından değerlendirildiğinde 0,5 DEK dozu, kontrol ve 0,1 DEK dozu arasında anlamlı bir fark bulunmazken diğer tüm dozlarla arasındaki fark önemli bulundu. Orta melanizasyon bakımından gruplar arasında fark tespit edilemedi. Güçlü melanizasyon tepkisi bakımından değerlendirildiğinde 0,5 Dek dozu ile kontrol ve boş enjeksiyon grupları arasında önemli bir fark vardır. PBS enjeksiyonu, 0,1 DEK ve 0,25 DEK dozları ile kontrol grubu arasında önemli bir fark varken; aynı grupların boş enjeksiyon grubu ile arasındaki fark anlamsızdır [(Olmamış F: 7.402; dF:5; P: 0.00) (Zayıf melanizasyon F: 3.952; dF:5; P: 0.003), (Orta melanizasyon F: 1.427; dF:5; P: 0.223), (Güçlü melanizasyon F: 6.067; dF:5; P: 0.00)].

Kaliks sıvısının melanizasyon tepkimelerine etkisi hakkında çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda uyguladığımız melanizasyon derecesine göre sınıflandırma sonucu bu nedenle karşılaştırılamamıştır. Ancak melanize olmuş boncuk sayısı bakımından bir değerlendirme yapılacak olursa kaliks enjeksiyonu sonucunda melanize olmayan boncuklar bakımından karşılaştırıldığında tüm dozlarında azalttığı sonucu ortaya

çıkılmaktadır. Bu sonuç Er (2011)'in çalışmasında elde ettiği melanizasyon sonuçları ile uyum içerisindedir.



Şekil 4.12. Kaliks sıvısının *G. mellonella* 4. saat melanizasyonuna etkisi (% değer)



Şekil 4.13. Kaliks sıvısının *G. mellonella* 24. saat melanizasyonuna etkisi (% değer)

**Çizelge 4.9.** Kaliks sıvısının *G. mellonella*'nın melanizasyonuna etkisinin 4. ve 24. saat sonuçları

Kalisk (DEK)	Melanizasyon (% ± SH*)			
	4 saat			
	Olmamış	Zayıf	Orta	Güçlü
<b>Kontrol</b>	50.66 ± 6.28 <sup>a</sup>	11.73 ± 2.15 <sup>a</sup>	21.38 ± 2.58 <sup>a</sup>	16.23 ± 4.46 <sup>a</sup>
<b>Boş</b>	70.18 ± 4.89 <sup>ab</sup>	9.59 ± 1.93 <sup>a</sup>	11.04 ± 1.76 <sup>abc</sup>	9.19 ± 2.01 <sup>a</sup>
<b>PBS</b>	55.37 ± 6.21 <sup>a</sup>	9.02 ± 1.69 <sup>a</sup>	18.60 ± 3.39 <sup>ab</sup>	17.01 ± 4.48 <sup>a</sup>
<b>0,1</b>	69.82 ± 5.09 <sup>ab</sup>	10.59 ± 2.14 <sup>a</sup>	12.85 ± 3.16 <sup>abc</sup>	6.74 ± 0.69 <sup>a</sup>
<b>0,25</b>	72.36 ± 3.36 <sup>ab</sup>	8.95 ± 1.50 <sup>a</sup>	9.44 ± 1.14 <sup>bc</sup>	9.25 ± 2.12 <sup>a</sup>
<b>0,5</b>	82.43 ± 1.45 <sup>b</sup>	5.66 ± 0.40 <sup>a</sup>	6.59 ± 0.95 <sup>c</sup>	5.33 ± 0.59 <sup>a</sup>
<b>1</b>	61.56 ± 6.98 <sup>a</sup>	11.89 ± 2.48 <sup>a</sup>	17.64 ± 3.46 <sup>ab</sup>	8.91 ± 2.39 <sup>a</sup>
	24 saat			
<b>Kontrol</b>	34.06 ± 7.24 <sup>a</sup>	20.30 ± 2.69 <sup>ab</sup>	12.34 ± 2.23 <sup>a</sup>	33.30 ± 7.63 <sup>a</sup>
<b>Boş</b>	30.87 ± 5.53 <sup>a</sup>	26.57 ± 4.22 <sup>a</sup>	17.46 ± 2.14 <sup>a</sup>	25.09 ± 5.28 <sup>ab</sup>
<b>PBS</b>	45.31 ± 6.56 <sup>a</sup>	31.34 ± 4.80 <sup>a</sup>	12.90 ± 1.96 <sup>a</sup>	10.46 ± 1.45 <sup>bc</sup>
<b>0,1</b>	53.44 ± 6.11 <sup>ab</sup>	23.46 ± 4.31 <sup>ab</sup>	11.88 ± 1.95 <sup>a</sup>	11.22 ± 2.08 <sup>bc</sup>
<b>0,25</b>	44.05 ± 5.70 <sup>a</sup>	25.98 ± 3.31 <sup>a</sup>	14.19 ± 1.97 <sup>a</sup>	15.79 ± 2.54 <sup>bc</sup>
<b>0,5</b>	73.20 ± 2.97 <sup>b</sup>	9.94 ± 1.56 <sup>b</sup>	10.37 ± 1.93 <sup>a</sup>	6.49 ± 0.57 <sup>c</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a-c) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir

### 4.3. Apoptotik İndeks, Mitotik İndeks ve Mikroçekirdek

#### 4.3.1. IAA'nın *G. mellonella* hemositlerinde apoptotik indekse etkisi

*In vivo* koşullarda IAA'nın farklı dozlarda (50-10 000 ppm) yetiştirilen *G. mellonella* son dönem larvalarında, apoptotik indekse etkilerinin belirlenmesi için üç tekrar yapıldı. Bu deneyde her bir doz için beş, üç tekrar için toplam 15 larva kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.14 ve Çizelge 4.10'da gösterilmektedir. Yapılan istatistiki değerlendirme sonucunda IAA'nın apoptotik indekste önemli bir fark ortaya çıkartmadığı tespit edildi.

Yapılan denemelerde canlı hücreler bakımından değerlendirildiğinde en yüksek ortalama % 91.53 ile 1000 ppm dozunda bulundu. En düşük canlı hücre yüzdesi ise % 89.37 ile kontrol grubundadır. Diğer IAA dozları bu iki değer arasında dağılım gösterdi (F: 1.493; dF:5; P: 0.201).

Erken apoptotik hücreler bakımından elde edilen veriler değerlendirildiğinde kontrol grubu %5.55 ortalama ile en yüksek değer görüldüğü gruptur. En düşük ortalama ise %4.80 ile 500 ppm değerinde görüldü. Diğer IAA dozlarının ortalamaları bu iki değer arasında dağılım göstermektedir, ancak bu değerler düzenli bir artış veya azalma şeklinde değildir (F: 0.660; dF:5; P:0.655).

Geç apoptoz yüzde ortalamaları bakımından elde edilen veriler değerlendirildiğinde en yüksek ortalama % 3.77 ile 500 ppm dozunda, en düşük değer ise % 2.61 ile 1000 ve 5000 ppm dozlarında saptandı. Kontrol grubu ve kalan IAA dozları bu değerler arasında ortalamalara sahiptir. Düzenli bir artış veya azalma söz konusu değildir (F: 1.444; dF:5; P: 0.217).

Nekrotik hücreler bakımından en yüksek ortalama kontrol grubundadır (% 1.07). En düşük nekrotik hücre yüzdesi % 0.57 ile 1000 ppm dozundadır. Diğer dozlar sıralandığında; 50 ppm de %0.68, 500 ppm de %0.81, 5000 ppm de %0.71 ve 10 000 ppm dozunda %0.62'dir (F: 0.987; dF:5; P: 0.431)

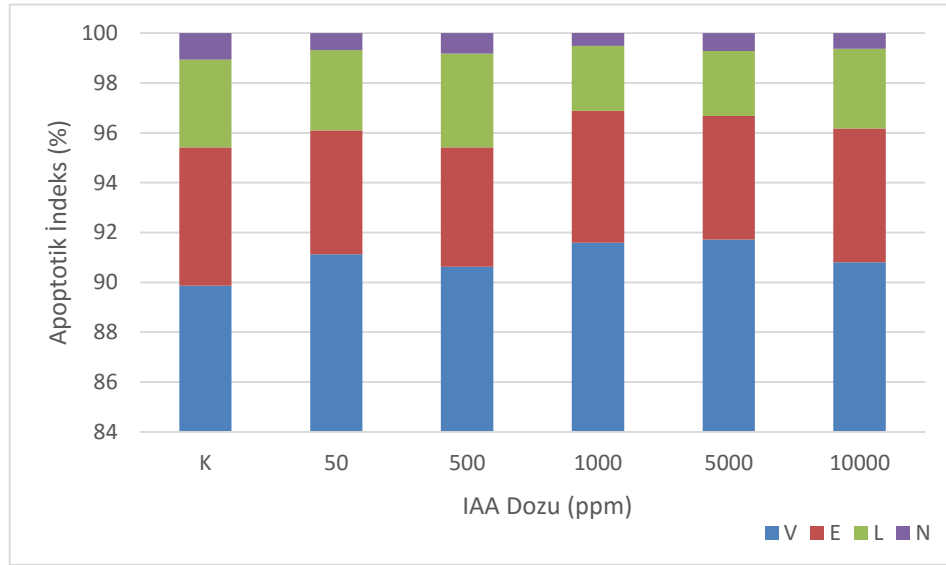
Apoptoz; hücrelerde küçülme, hücre zarında kabarcıklar oluşması ve sitoplazmik içerikte meydana gelen değişmelerle karakterizedir. Omurgasızlar istilacı türler, toksik maddeler ve yabancı cisimlere karşı bağışıklık tepkilerini gösterirken apoptoz meydana gelmektedir (Clem ve ark., 1991; Strand ve Pech, 1995b; Pech ve Strand, 2000; Clarke ve Clem, 2003; Le ve ark., 2003; Sung ve ark., 2003a,b).

Bitki gelişim düzenleyicilerinin böceklerdeki apoptotik indekse etkileri üzerine az sayıda çalışma vardır. Furukawa ve ark. (2004) çalışmasında IAA uygulanmasının serebral korteksin erken gelişim safhasında mikroensefaliye neden olduğunu bulmuşlardır. Kim ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada IAA'nın Horseradish Peroxidase (HRP) ile birlikte uygulanmasının insan melanoma hücrelerinde apoptosise neden olduğunu bulmuşlardır.

Altuntaş ve ark. (2012) GA<sub>3</sub> ile yaptıkları çalışmada yüksek dozların apoptotik etkiyi önemli oranda arttırdığını, nekrotik hücrelerin tüm dozlarda yüksek olduğunu, canlı hücre sayılarının ise 5000 ppm dozunda önemli oranda azaldığını bulmuşlardır. Çelik (2014)

çalışmasında IAA dozlarında artışa rağmen canlı hücre sayısı ve apoptotik hücreler bakımından anlamlı bir değişim olmadığı sonucuna ulaşmıştır.

Önceki çalışmalardan da anlaşılabilir olduğu gibi IAA ile apoptoz arasında bir ilişki bulunmaktadır. Tüm hücre durumları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık bulunamadı. Bu sonuç literatür bilgisi ile ve Çelik (2014)'in çalışma sonuçları ile uyum içerisindedir.



**Şekil 4.14.** IAA'nın *G. mellonella* apoptotik indeksine etkisi (*in vivo*) (V: Canlı; E: Erken Apoptoz; L: Geç Apoptoz; N: Nekroz)

**Çizelge 4.10.** IAA'nın *G. mellonella* apoptotik indeksine etkisi (*in vivo*)

IAA Dozu (ppm)	Apoptotik İndeks (ortalama ± SH*)			
	Canlı Hücre (V)	Erken Apoptoz (E)	Geç Apoptoz (L)	Nekroz (N)
<b>Kontrol</b>	89.87 ± 0.59 <sup>a</sup>	5.55 ± 0.43 <sup>a</sup>	3.51 ± 0.37 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.29 <sup>a</sup>
<b>50</b>	91.13 ± 0.58 <sup>a</sup>	4.96 ± 0.35 <sup>a</sup>	3.23 ± 0.43 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.11 <sup>a</sup>
<b>500</b>	90.62 ± 0.74 <sup>a</sup>	4.80 ± 0.45 <sup>a</sup>	3.77 ± 0.69 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.27 <sup>a</sup>
<b>1000</b>	91.53 ± 0.44 <sup>a</sup>	5.29 ± 0.32 <sup>a</sup>	2.61 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.09 <sup>a</sup>
<b>5000</b>	90.80 ± 0.48 <sup>a</sup>	4.95 ± 0.26 <sup>a</sup>	2.61 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.71 ± 0.09 <sup>a</sup>
<b>10 000</b>	90.95 ± 0.23 <sup>a</sup>	5.38 ± 0.32 <sup>a</sup>	3.20 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.11 <sup>a</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir



*In vitro* çalışmalarda elde edilen bulgular Şekil 4.15 ve Çizelge 4.11’de gösterilmektedir. IAA’nın farklı dozlarında (50-10 000 ppm) yetiştirilen *G. mellonella* son dönem larvalarında üç tekrar yapıldı ve toplamda her bir doz için 15 larva kullanıldı.

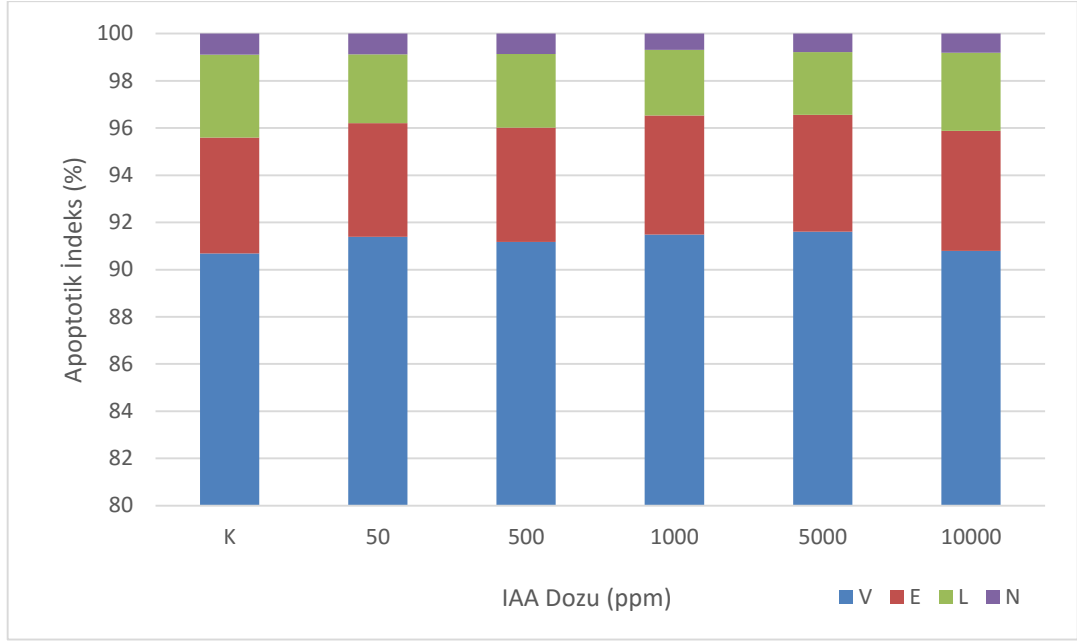
Bulgular canlı hücre yüzdeleri bakımından değerlendirildiğinde en düşük ortalama %90.69 ile kontrol grubundadır. En yüksek ortalama ise %91.60 ile 5000 ppm dozundadır. Dozlar arasında 10 000 ppm %90.79 ile kontrol grubuna en yakın ortalama sahiptir. Geride kalan 50, 500 ve 1000 ppm dozlarının ortalamaları ise 5000 ppm ortalamasına yakındır. Gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur (F: 1.422; dF:5; P: 0.225).

Erken apoptotik hücre durumları bakımından en düşük ortalama %4.81 ile 50 ppm dozunda görüldü. En yüksek ortalama ise %5.09 ile 10 000 ppm dozunda bulundu. Kontrol grubu ile diğer dozların ortalaması bu değerler arasındadır. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı (F: 0.274; dF:5; P: 0.926).

Geç apoptotik hücreler bakımından en düşük ortalama 5000 ppm dozunda (% 2.65); en yüksek değer kontrol grubunda (% 3.51) görüldü. IAA dozlarından 5000 ppm ile 10 000 ppm arasındaki fark önemli bulunurken 10 000 ppm dozun diğer gruplarla arasındaki fark önemsizdir. Kontrol ve 5000 ppm dozu arasındaki fark da önemlidir (F: 4.459; dF:5; P: 0.001).

Nekrotik hücrelerin ortalamaları bakımından en düşük ortalama %0.69 (1000 ppm); en yüksek ortalama % 0.89 (kontrol grubu) olarak tesbit edildi. Diğer dozların ortalamaları bu değerler arasındadır (F: 1.308; dF:5; P: 0.268).

*In vivo* da olduğu gibi *in vitro* bulgularda da uygulanan testler sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. *In vivo* için yapılan literatür karşılaştırması *in vitro* için de geçerli olup elde edilen bulgular literatür ile karşılaştırıldığında uyumlu gözükmektedir.



**Şekil 4.15.** IAA'nın *G. mellonella* apoptotik indeksine etkisi (*in vitro*) (V: Canlı; E: Erken Apoptoz; L: Geç Apoptoz; N: Nekroz)

**Çizelge 4.11.** IAA'nın *G. mellonella* apoptotik indeksine etkisi (*in vitro*)

IAA Dozu (ppm)	Apoptotik İndeks (ortalama $\pm$ SH*)			
	Canlı Hücre (V)	Erken Apoptoz (E)	Geç Apoptoz (L)	Nekroz (N)
<b>Kontrol</b>	90.69 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	4.91 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	3.51 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
<b>50</b>	91.39 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	4.81 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	2.93 $\pm$ 0.13 <sup>abc</sup>	0.87 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
<b>500</b>	91.18 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	4.83 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	3.12 $\pm$ 0.14 <sup>abc</sup>	0.87 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
<b>1000</b>	91.49 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	5.05 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.77 $\pm$ 0.19 <sup>bc</sup>	0.69 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
<b>5000</b>	91.60 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>	4.95 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	2.65 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	0.79 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
<b>10 000</b>	90.79 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	5.09 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	3.30 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.81 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a-c) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.

#### 4.3.2. Kaliks sıvısının *G. mellonella* hemositlerinde apoptotik indekse etkisi

*In vivo* koşullarda kaliks dozlarının (0,1 – 1 dişi eşdeğeri) enjeksiyonu ile *G. mellonella* larvalarında apoptotik indekse etkisindeki değişiklikleri incelemek için üç tekrar yapıldı ve toplam 15 örnek değerlendirildi. Ulaşılan sonuçlar Şekil 4.16 ve Çizelge 4.12'de gösterilmektedir.

Bulgular canlı hücreler bakımından değerlendirildiğinde kontrol grupları % 91 – 92 arasında yer alırken, kaliks uygulamaları sonucunda doz artışına bağlı olarak giderek artan tedrici bir azalma söz konusudur. Kontrol grupları olan kontrol, boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu sonucunda elde edilen bulgular kendi aralarında fark göstermezken; tüm kaliks dozları ile anlamlı bir fark gösterdi. Ayrıca tüm kaliks dozları birbirleri ile önemli farklılıklar gösterdi. Sırasıyla; 0,1 DEK uygulamasında ortalama %82.01 canlı hücre, 0,25 dek uygulamasında ortalama %77.97 canlı hücre, 0,5 dek uygulamasında %75.83 canlı hücre ve 1 dek uygulamasında %72.91 canlı hücre bulundu (F: 290.114; dF:6; P: 0.00).

Erken apoptotik hücreler bakımından değerlendirildiğinde; kontrol gruplarının ortalamaları kendi aralarında fark göstermezken tüm kaliks uygulamaları arasında önemli farklılık olduğu görüldü. Kaliks dozlarında erken apoptotik hücre ortalaması incelendiğinde 0,1 ve 0,5 dek dozları kendi aralarında; 0,25 ve 1 dek dozları kendi aralarında önemli bir fark göstermemiştir. Ancak bu gruplar diğer gruplarla önemli farklar gösterdi (F: 106.751; dF:6; P: 0.00).

Geç apoptotik hücreler bakımından elde edilen sonuçlar ile canlı hücreler bakımından elde edilen sonuçlar arasında benzerlik görülmektedir. Kontrol grupları kendi aralarında fark göstermezken, kaliks dozları ile kontrol grupları arasında farklılık görüldü. Kaliks dozlarının hepsi birbirine göre anlamlı farklılıklar gösterdi (F: 336.578; dF:6; P:0.00)

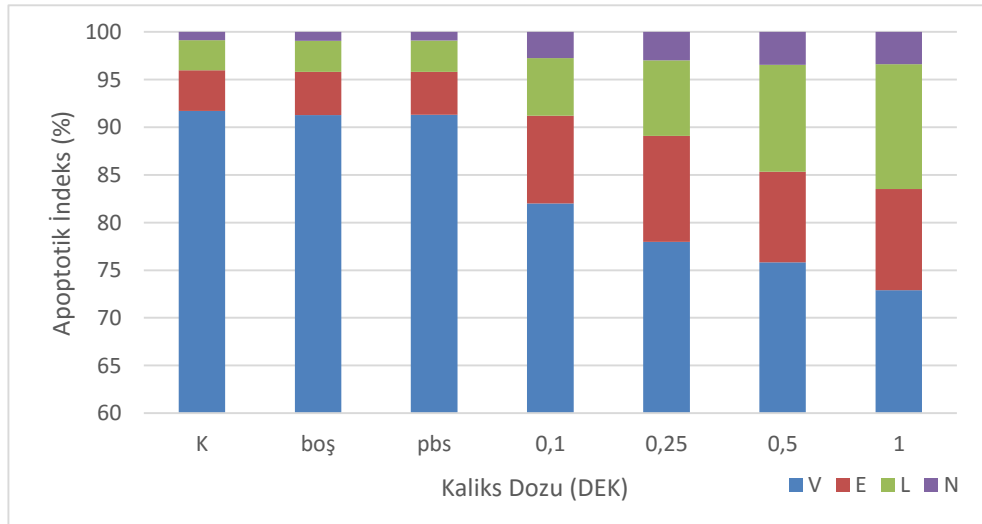
Nekrotik hücre durumu değerlendirildiğinde kontrol grupları diğer hücre durumlarında olduğu gibi kendi arasında farklılıklar göstermezken, kaliks uygulamaları ile farklılıklar gösterdi. Kaliks uygulamaları incelendiğinde 0,1 DEK ile 0,25 DEK arasında anlamlı bir farklılık görülmezken; 0,1 DEK dozu ile 0,5 DEK ve 1 DEK arasında fark önemlidir. Buna karşın 0,25 DEK, 0,5 DEK ve 1 DEK dozları arasında önemli bir farklılık yoktur (F: 92.468; dF:6; P:0.00).

Parazitoidlerin konak bağışıklık sistemini baskılamasında kaliks sıvısı ve/veya içeriğinde yer alan partiküller (PDV/VLP) bazı türlerde tek başına bazı türlerde de zehir ile birlikte iş görmektedir. Konak bağışıklık sisteminin zehir ve kaliks sıvısı ile baskılanmasının incelendiği çalışmalarda genellikle enkapsülasyon baskılanmasının üzerinde durulmuştur (Kitano, 1982, 1986; Stoltz ve Guzo, 1986; Tanaka, 1987a,b; Davies ve Vinson, 1988; Luchart ve Webb, 1996; Shelby ve Webb, 1999). Bu sıvıların hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelendiği az sayıda çalışma vardır (Wago ve Tanaka, 1989; Strand ve Pech, 1995; Teramoto ve Tanaka, 2004; Yu ve ark., 2007; Er ve ark, 2010). Bu çalışmalardan

Wago ve Tanaka (1989)'ya göre *Apanteles kariyai* kaliks ve zehirinin *Pseudaletia seperata* granüler hücrelerine uygulanması sonucunda hücreler hasara uğramaktadır ve bu yolla granüler hücrelerin yayılma yetenekleri zarar görmektedir. Strand ve Pech (1995) çalışmalarında *Microplitis demolitor* PDV içeriğinin konak hemositlerinde apoptoz oluşumunu tetiklediğini bulmuşlardır. Teramoto ve Tanaka (2004)'ya göre *Cotesia kariyai* parzitlemesinin sonucunda *Pseudaletia separata* hemosit sayısındaki azalmaya kaliks sıvısındaki PDV'ler neden olmuştur. Yu ve ark. (2007) çalışmalarında da benzer bir şekilde kaliks sıvısının hücre canlılığını azalttığı sonucunu bulmuşlardır.

Er ve ark. (2010) çalışmasında *P. turionellae* zehir ve parzitlemesinin *G. mellonella* hemositlerinin canlılığı üzerine etkisini incelemiştir. Yaptıkları çalışmanın sonucunda larval evrede kontrol gruplarının apoptotik indeks bakımından kendi içerisinde anlamlı bir farklılık göstermediğini; erken ve geç apoptosis durumlarında 0,1 ve 0,5 KEZ dozlarında anlamlı bir artış, canlı hücre durumlarında anlamlı bir azalma görürken nekrotik hücrelerde bir değişiklik olmadığını saptamışlardır.

Literatürde yer alan bilgiler ışığında değerlendirildiğinde çalışmamızda elde edilen veriler literatür bilgisi ile uyum içerisindedir. Yüksek kaliks dozu uygulamalarında canlı hücre sayısında azalma yaşanırken, erken apoptotik, geç apoptotik ve nektotik hücre durumlarında anlamlı bir artış gözlemlendi.



**Şekil 4.16.** Kaliks sıvısının *G. mellonella* apoptotik indeksine etkisi (*in vivo*) (V: Canlı; E: Erken Apoptoz; L: Geç Apoptoz; N: Nekroz)

**Çizelge 4.12.** Kaliks sıvısının *G. mellonella* apoptotik indeksine etkisi (*in vivo*)

Kaliks (DEK)	Apoptotik İndeks (ortalama ± SH*)			
	Canlı Hücre (V)	Erken Apoptoz (E)	Geç Apoptoz (L)	Nekroz (N)
<b>Kontrol</b>	91.71 ± 0.48 <sup>a</sup>	4.28 ± 0.28 <sup>a</sup>	3.15 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.10 <sup>a</sup>
<b>Boş</b>	91.28 ± 0.43 <sup>a</sup>	4.51 ± 0.23 <sup>a</sup>	3.29 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.10 <sup>a</sup>
<b>PBS</b>	91.32 ± 0.28 <sup>a</sup>	4.48 ± 0.17 <sup>a</sup>	3.31 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.89 ± 0.06 <sup>a</sup>
<b>0,1</b>	82.01 ± 0.39 <sup>b</sup>	9.19 ± 0.31 <sup>b</sup>	6.05 ± 0.17 <sup>b</sup>	2.74 ± 0.14 <sup>b</sup>
<b>0,25</b>	77.97 ± 0.72 <sup>c</sup>	11.11 ± 0.53 <sup>c</sup>	7.92 ± 0.36 <sup>c</sup>	2.99 ± 0.19 <sup>bc</sup>
<b>0,50</b>	75.83 ± 0.47 <sup>d</sup>	9.51 ± 0.24 <sup>b</sup>	11.21 ± 0.18 <sup>d</sup>	3.46 ± 0.16 <sup>c</sup>
<b>1</b>	72.91 ± 0.21 <sup>e</sup>	10.59 ± 0.21 <sup>c</sup>	13.13 ± 0.18 <sup>e</sup>	3.37 ± 0.11 <sup>c</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a-e) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir

*In vitro*: Kaliks enjeksiyonu ile *G. mellonella* larvalarındaki apoptotik indekse etkisinde ki değişiklikler incelemek için üç tekrar yapıldı; her tekrarda beş örnek kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.17 ve Çizelge 4.13’de sunulmaktadır.

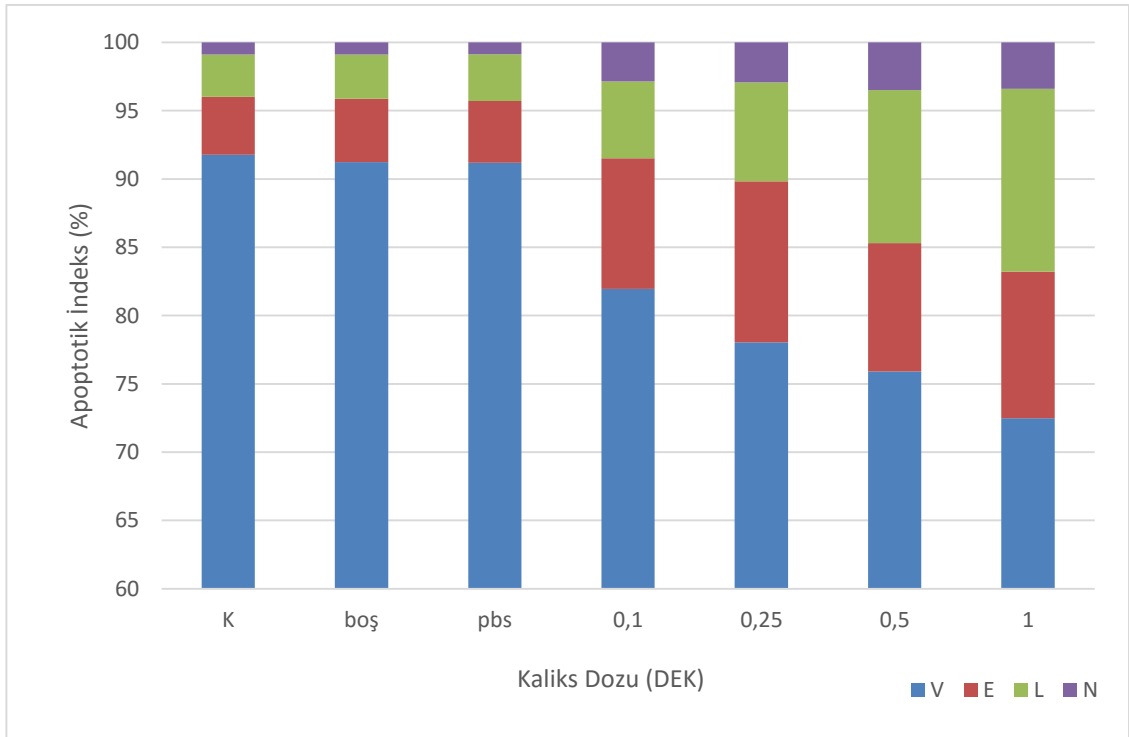
Canlı hücre ortalamaları karşılaştırıldığında kontrol grupları %91.18 – 91.77 arasındadır. Kaliks uygulamaları sonucunda doz artışına bağlı olarak aşamalı bir azalma söz konusudur. Tüm kaliks dozları birbirleri ile ve kontrol grubu ile önemli farklılıklar gösterdi. Kaliks uygulamaları arasında en yüksek ortalama %81.97 ile 0,1 DEK dozunda bulundu. İkinci yüksek doz 0,25 DEK ( %78.05), sonrasında 0,5 DEK ( %75.91) en düşük doz ise 1 DEK ( %72.48) dozunda görüldü (F: 339.023; dF:6; P: 0.00).

Bulgular erken apoptotik hücreler bakımından karşılaştırıldığında; kontrol gruplarının ortalamaları kendi aralarında fark göstermemektedir. Kaliks uygulamaları arasında düzenli bir artış veya azalma görülmemektedir. Kaliks dozlarından elde edilen veriler değerlendirildiğinde 0,1 ve 0,5 DEK dozları kendi aralarında bir grup oluşturdu. Kalan kaliks dozlarından 0,25 DEK tüm diğer gruplardan farklılık gösterdi ve en yüksek ortalamaya sahipti (%11.79). En yüksek kaliks dozu olan 1 DEK % 10.73 ortalama ile diğer tüm gruplardan farklıdır ve bu fark önemlidir (F: 127.199; dF:6; P: 0.00).

Geç apoptotik hücreler; canlı hücreler ile aynı farklılıkları göstermektedir. Kontrol grupları kendi arasında farklılık göstermezken, tüm kaliks dozları birbirlerinden ve kontrol gurubu ortalamalarından anlamlı farklılıklar gösterdi (F: 282.497; dF:6; P: 0.00).

Nekrotik hücrelerin durumu değerlendirildiğinde kontrol grupları diğer hücre durumlarında olduğu gibi kendi arasında farklılık göstermedi, kaliks uygulamaları ile farklılıklar gösterdi. Kaliks uygulamaları incelendiğinde 0,1 DEK ile 0,25 DEK arasında farklılık görülmezken; 0,1 DEK dozu ile 0,5 DEK ve 1 DEK arasında fark önemlidir. Bunun yanında 0,25 DEK ve 1 DEK dozları arasında önemli bir farklılık yoktur ancak, 0,5 DEK ile arasındaki fark önemlidir. Yapılan istatistiki karşılaştırma sonucunda 0,5 DEK ile 1 DEK arasındaki fark önemsiz bulundu (F: 86.428; dF:6; P: 0.00).

*In vivo* ve *in vitro* apoptotik indeks sonuçları birbiriri ile uyum içerisindedir ve literatürde bu konu ile alakalı bilgileri destekler niteliktedir.



**Şekil 4.17** Kaliks sıvısının *G. mellonella* apoptotik indeksine etkisi (*in vitro*) (V: Canlı; E: Erken Apoptoz; L: Geç Apoptoz; N: Nekroz)

**Çizelge 4.13.** Kaliks sıvısının *G. mellonella* apoptotik indeksine etkisi (*in vitro*)

Kaliks (DEK)	Apoptotik İndeks (ortalama ± SH*)			
	Canlı Hücre (V)	Erken Apoptoz (E)	Geç Apoptoz (L)	Nekroz (N)
<b>Kontrol</b>	91.77 ± 0.40 <sup>a</sup>	4.23 ± 0.20 <sup>a</sup>	3.11 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.08 <sup>a</sup>
<b>Boş</b>	91.23 ± 0.40 <sup>a</sup>	4.65 ± 0.23 <sup>a</sup>	3.23 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.10 <sup>a</sup>
<b>PBS</b>	91.18 ± 0.24 <sup>a</sup>	4.53 ± 0.16 <sup>a</sup>	3.42 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.09 <sup>a</sup>
<b>0,1</b>	81.97 ± 0.41 <sup>b</sup>	9.55 ± 0.30 <sup>b</sup>	5.64 ± 0.16 <sup>b</sup>	2.85 ± 0.15 <sup>b</sup>
<b>0,25</b>	78.05 ± 0.64 <sup>c</sup>	11.79 ± 0.27 <sup>e</sup>	7.23 ± 0.45 <sup>c</sup>	2.94 ± 0.19 <sup>bc</sup>
<b>0,50</b>	75.91 ± 0.55 <sup>d</sup>	9.38 ± 0.47 <sup>b</sup>	11.22 ± 0.22 <sup>d</sup>	3.48 ± 0.18 <sup>d</sup>
<b>1</b>	72.48 ± 0.29 <sup>e</sup>	10.73 ± 0.29 <sup>c</sup>	13.39 ± 0.19 <sup>e</sup>	3.40 ± 0.13 <sup>cd</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a-e) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir

#### 4.3.3. IAA'nın *P. turionellae* hemositlerinde apoptotik indekse etkisi

IAA'nın *P. turionellae*'nin hemositlerine etkisinin belirlenmesi için üç tekrar yapıldı, her bir doz için üç tekrarda 15 örnek değerlendirildi. Veriler Şekil 4.18 ile Çizelge 4.14'de gösterilmektedir.

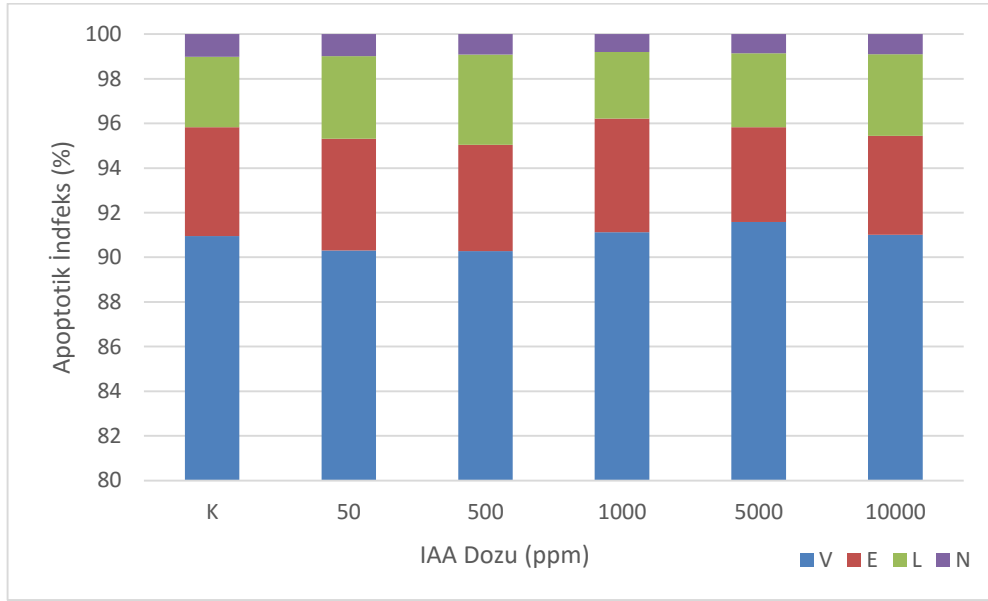
Yapılan çalışma sonucunda elde edilen bulgular canlı hücreler bakımından değerlendirildiğinde kontrol grubu ile IAA dozları arasında fark bulunamadı. En yüksek ortalama %91.59 ile 5000 ppm de bulundu. Diğer yüksek dozlar 1000 ppm (%91.13) ve 10000 ppm (%91.01)'dir. Kontrol (%90,95), 50 ppm (%90.31) ve 500 ppm (%90.27) dozları diğerlerinden daha düşük ortalamalara sahiptir (F: 2.214; dF:5; P: 0.06).

Erken apoptotik hücrelerin durumları incelendiğinde kontrol grubu ile 1000 ppm dozu birbirinden anlamlı farklılık gösterdi. Kontrol grubu ile diğer IAA dozları arasındaki fark önemsiz bulundu. Aynı şekilde 1000 ppm ile diğer IAA dozları arasındaki fark da önemsizdir (F: 2.715; dF:5; P: 0.025).

Geç apoptotik hücreler bakımından en düşük ortalama 1000 ppm dozunda (%2.99) görüldü. Bu doz ile kontrol ve 5000 ppm dozları arasındaki fark önemsizken, diğer dozlarla arasındaki fark önemlidir. Kontrol ve 5000 ppm dozları arasındaki fark önemsizken her iki dozunda 500 ppm doz ile arasındaki fark anlamlıdır. Ayrıca 500 ppm dozu ile 50 ppm ve 10 000 ppm dozları arasındaki fark da önemsizdir (F: 6.251; dF:5; P: 0.00 ).

Deney sonuçları incelendiğinde nekrotik hücreler açısından kontrol ve IAA grupları arasındaki fark anlamsızdır (F: 1.144; dF:5; P: 0.344).

Literatürde *P. turionellae* ile yapılan bir çalışma bulunmadığından elde edilen veriler literatür ile karşılaştırılamamışsa da IAA'nın *G. mellonella* apoptotik indeksi ile karşılaştırıldığında benzeri bir sonuç verdiği görülmektedir.



**Şekil 4.18.** IAA'nın *P. turionellae* apoptotik indeksine etkisi (V: Canlı; E: Erken Apoptoz; L: Geç Apoptoz; N: Nekroz)

**Çizelge 4.14.** IAA'nın *P. turionellae* apoptotik indeksine etkisi

IAA Dozu (ppm)	Apoptotik İndeks (ortalama $\pm$ SH*)			
	Canlı Hücre (V)	Erken Apoptoz (E)	Geç Apoptoz (L)	Nekroz (N)
<b>Kontrol</b>	90.95 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	4.89 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	3.15 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	1.01 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
<b>50</b>	90.31 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	4.99 $\pm$ 0.18 <sup>ab</sup>	3.71 $\pm$ 0.12 <sup>bc</sup>	0.98 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
<b>500</b>	90.27 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	4.77 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup>	4.05 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>	0.91 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
<b>1000</b>	91.13 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	5.09 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	2.99 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.79 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
<b>5000</b>	91.59 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	4.25 $\pm$ 0.19 <sup>ab</sup>	3.31 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>	0.85 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
<b>10 000</b>	91.01 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	4.42 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>	3.67 $\pm$ 0.16 <sup>bc</sup>	0.89 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilmiş sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a-c) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir



#### 4.3.4. IAA'nın *G. mellonella* mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi

Apoptotik indeks ile birlikte değerlendirilen mitotik indeks ve mikroçekirdek oluşumu deneylerinde her bir doz için üç tekrar yapıldı ve her bir doz için toplam 15 örnek değerlendirildi. Bu denemeler *in vivo* ve *in vitro* koşullarda yapıldı.

*In vivo* yapılan denemelerde kontrol grubunda mitotik indeks ortalaması %1.31 olarak bulundu. IAA dozlarında en yüksek mitotik indeks 10 000 ppm dozunda (%1.87) görüldü. IAA doz uygulamalarının tamamının mitotik indeks ortalaması kontrol grubuna oranla yüksek çıktı. Elde edilen veriler Çizelge 4.15'de sunulmaktadır. Yapılan istatistiki değerlendirme sonucunda IAA uygulamaları ile kontrol grubu arasındaki fark önemsiz bulundu (F: 1.083; dF:5; P: 0.376).

Mikroçekirdek oluşumu ile alakalı olarak *in vivo* sonuçlar Çizelge 4.15'de gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre kontrol grubunun mikroçekirdek ortalaması %0.39'dur. Mitotik indeksdeki duruma benzer şekilde en yüksek mikroçekirdek ortalaması 10 000 ppm dozunda (%0.6) bulundu. Tüm IAA dozlarında ortalamalar kontrol grubundan yüksektir, ancak istatistiki değerlendirme sonucu bu farklar anlamsızdır (F: 0.6; dF:5; P:0.700).

**Çizelge 4.15.** IAA'nın *G. mellonella* mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi (*in vivo*)

IAA Dozu (ppm)	Mitotik İndeks (Min-Max % ) (Ortalama $\pm$ SH*)	Mikroçekirdek (Min-Max % ) (Ortalama $\pm$ SH*)
<b>Kontrol</b>	0.4 – 2.4 1.31 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.1 – 0.8 0.39 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
<b>50</b>	0.4 – 3.2 1.64 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	0.1 – 1.4 0.52 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
<b>500</b>	0.4 – 3.0 1.53 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.1 – 1.2 0.47 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
<b>1000</b>	0.4 – 3.0 1.36 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.1 – 1.0 0.49 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
<b>5000</b>	0.4 – 3.0 1.56 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.1 – 1.0 0.43 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
<b>10 000</b>	0.6 – 3.2 1.87 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.1 – 1.8 0.60 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir

*In vitro* denemelerin sonucu da *in vivo* sonuçlara benzer şekildedir. Kontrol grubunda mitotik indeks ortalaması %1.34 olarak bulundu. Denemeler sonucunda en yüksek mitotik indeks 10 000 ppm dozunda (%1.74) görüldü. IAA doz uygulamalarının tamamının mitotik indeks ortalaması kontrol grubuna oranla yüksek çıkmıştır, aralarında ki bu fark istatistiksel

olarak önemsizdir. Mitotik indeks ile alakalı elde edilen *in vitro* veriler Çizelge 4.16'da gösterilmektedir (F: 1.645; dF:5; P: 0.157).

Mikroçekirdek oluşumu ile alakalı olarak *in vitro* sonuçlarda Çizelge 4.16'da sunulmaktadır. Bu sonuçlara göre kontrol grubunun mikroçekirdek ortalaması %0.37'dir. Mitotik indeksdeki duruma benzer şekilde en yüksek mikroçekirdek ortalaması 10 000 ppm dozunda (%0.59) bulundu. Tüm IAA dozlarında ortalamalar kontrol grubundan yüksektir, ancak istatistiki değerlendirme sonucu bu farklar önemsizdir (F: 2.011; dF:5; P: 0.085).

Böceklerde hemositler embriyogenez sürecinde ilk olarak baş veya dorsal mezodermden gelişmeye başlar (Hoffmann ve ark., 1979; Rattcliffe ve ark., 1985; Tepass ve ark., 1994). Böcekler daha sonra larva ve nimf aşamalarında mezodermden dönüşen hematopoietik organlarda yer alan kök hücrelerin bölünmesi ve/veya dolaşımdaki hemositlerin mitozu ile üretilmeye devam eder (Jones, 1970; Akai ve Sato, 1971; Rattcliffe ve ark., 1985; Strand, 2008). Beaulaton (1979) Lepidopteralarda hematopoietik organlarda prohemositlerin plazmatositlere farklılaştığını ve bunların dolaşıma salındıklarını; dolaşımdaki plazmatositlerin dolaşımdaki diğer hücreler olan granülosit, sferülosit ve önositoidlere dönüştüğü bilgisini vermiştir. Strand (2008) çalışmasında Beaulaton (1979)'un verdiği bilgiyi doğrulamıştır. Konak tür *G. mellonella* post embriyonik hemositlerinin kaynağı mitozdur (Jones, 1968). Yapılan çalışmalarla Lepidopteralarda dolaşımda yer alan hücrelerin % 1-8 arasında mitotik fazda olduğu gösterilmiştir (Jones, 1970; Beaulaton, 1979; Er ve ark., 2010; Altuntaş ve ark., 2012). Yılmaz ve Yüksel (2005) IAA'nın hamile dişi farelerde deri altı uygulaması sonucunda üçüncü nesil fare kemik iliğinde mitotik indeksi arttırdığını çalışmalarıyla ortaya koymuştur.

Çalışmamızda elde ettiğimiz hem *in vivo* hem de *in vitro* sonuçlara göre IAA mitotik indeksde istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmamasının yanında ilgili literatürde vurgulanan %1-8 sınırları içerisinde kaldığı için literatür bilgisi ile uyumludur. IAA dozlarında görülen kontrol grubuna oranla mitotik indeks ortalamalarının artışı Yılmaz ve Yüksel (2005) çalışmasında IAA'nın mitotik indeksde artışa neden olduğu yönündeki bulgularını desteklemektedir. Ancak çalışmamızda bulduğumuz bu sayısal artış istatistiksel olarak önemsizdir.

**Çizelge 4.16.** IAA'nın *G. mellonella* mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi (*in vitro*)

IAA Dozu (ppm)	Mitotik İndeks		Mikroçekirdek	
	(Min-Max % )	(Ortalama $\pm$ SH*)	(Min-Max % )	(Ortalama $\pm$ SH*)
<b>Kontrol</b>	0.8 – 2.1	1.34 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.1 – 0.7	0.37 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
<b>50</b>	0.9 – 2.9	1.69 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.1 – 0.9	0.51 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
<b>500</b>	0.8 – 2.2	1.55 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.1 – 0.8	0.43 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
<b>1000</b>	0.7 – 2.3	1.43 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.1 – 0.9	0.49 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
<b>5000</b>	0.7 – 2.4	1.55 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.1 – 0.8	0.41 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
<b>10 000</b>	1.1 – 2.6	1.74 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.1 – 0.9	0.59 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir

#### **4.3.5. Kaliks sıvısının *G. mellonella* mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi**

Kaliks enjeksiyonunun mitotik indeks ve mikroçekirdek oluşumu deneylerinde her bir doz için üç tekrar yapıldı ve her bir doz için toplam 15 örnek değerlendirildi. Bu denemeler *in vivo* ve *in vitro* koşullarda tekrar edildi. Elde edilen veriler Çizelge 4.17'de gösterilmektedir.

Kaliks enjeksiyonu sonrasında *G. mellonella* mitotik indeksinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda kontrol (%1.31), boş enjeksiyon (%1.29), PBS enjeksiyonu (%1.27) ve 0,1 DEK kaliks (%1.23) ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark yoktur; bununla beraber 0,25 DEK (%0.71) ve 0,5 DEK (%0.57) kaliks dozları hem kontrol gruplarından hem de 1 DEK (% 0.22) dozundan istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. En düşük mitotik indeks ortalamasına sahip 1 DEK kaliks dozu diğer tüm uygulamalardan önemli derecede farklılık gösterdi (F: 55.455; dF:6; P:0.00).

Mikroçekirdek oluşumu bakımından yapılan incelemede elde edilen verilerde de kontrol, boş enjeksiyon, PBS enjeksiyonu ve 0,1 DEK uygulaması kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermezken, diğer uygulamalar ile kendi aralarındaki fark önemli bulundu. Kaliks uygulamalarından 0,25 DEK diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterirken, 0,5 DEK ve 1 DEK uygulamaları arasındaki fark önemli değildir (F: 55.698; dF:6; P:0.00).

Önceki çalışmalarla Lepidopteralarda dolaşımda yer alan hücrelerin % 1-8 arasında mitotik fazda olduğu bulunmuştur (Jones, 1970; Beaulaton, 1979; Er ve ark., 2010; Altuntaş

ve ark., 2012). Er ve ark. (2010) çalışmaları *P. turionellae* parazitleme ve zehir enjeksiyonunun *G. mellonella* mitotik indeksinin % 0,5 seviyesinin de altına düşmeye neden olduğu ile ortaya konmuştur.

Teramoto ve Tanaka (2004) *Cotesia kariyai* kaliks sıvısında yer alan PDV'lerin zehir enjeksiyonu ile birlikte *Pseudaletia separata* hemositlerinde mitozu durdurduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *Cotesia kariyai* PDV'lerinin hematopoez sürecini veya hematopoetik organlarını etkilediğini ve hücre döngüsünü baskılayan humoral plazma faktörü veya faktörlerinin üretilmesi ihtimali olduğu sonucunu ortaya koymuşlardır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre kaliks sıvısının mitotik indeksi olumsuz yönde etkilediği görüldü. Bu sonuç yukarıda atıfta bulunulan literatür tarafından da desteklenmektedir.

**Çizelge 4.17.** Kaliks sıvısının *G. mellonella* mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi (*in vivo*)

Kaliks	Mitotik İndeks		Mikroçekirdek	
	(Min-Max % )	(Ortalama ± SH*)	(Min-Max % )	(Ortalama ± SH*)
<b>Kontrol</b>	0.8 – 1.7	1.31 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.2 – 0.9	0.49 ± 0.05 <sup>a</sup>
<b>Boş</b>	0.7 – 1.8	1.29 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.2 – 0.8	0.49 ± 0.05 <sup>a</sup>
<b>PBS</b>	0.8 – 1.8	1.27 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.2 – 0.8	0.51 ± 0.05 <sup>a</sup>
<b>0,1</b>	0.9 – 1.5	1.23 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.3 – 0.8	0.51 ± 0.04 <sup>a</sup>
<b>0,25</b>	0.3 – 0.9	0.71 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.7 – 1.3	0.96 ± 0.04 <sup>b</sup>
<b>0,5</b>	0.3 – 0.9	0.57 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.9 – 1.6	1.26 ± 0.05 <sup>c</sup>
<b>1</b>	0.1 – 0.5	0.22 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.9 – 1.7	1.33 ± 0.07 <sup>c</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a-c) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir

*In vitro* koşullarda elde edilen mitotik indeks sonuçları da *in vivo* koşullarda elde edilenle benzerdir. Kontrol, boş enjeksiyon, PBS enjeksiyonu ve 0,1 DEK kaliks enjeksiyonu kendi aralarında önemli bir farklılık göstermezken diğer kaliks enjeksiyonları ile anlamlı bir farklılık gösterdi. Kaliks uygulamalarından 0,25 ve 0,5 DEK dozları da kendi aralarında bir grup oluştururken, 1 DEK uygulaması tüm diğer uygulamalardan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdi (F: 48.348; dF:6; P: 0.00). Elde edilen bu bulgular Çizelge 4.18'de gösterilmiştir.

*In vitro* koşullarda yapılan incelemede mikroçekirdek oluşumuna ilişkin elde edilen veriler *in vivo* koşullarda yapılan denemelerin sonuçlarına benzer bir sonuç ortaya koydu. Kontrol, boş enjeksiyon, PBS enjeksiyonu ve 0,1 DEK uygulaması kendi aralarında bir grup oluştururken, 0,25 DEK diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdi. Kaliks uygulamalarından 0,5 DEK ve 1 DEK ortalamaları birbirlerinden fark göstermedi, fakat diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak önemli fark gösterdiler (F: 47.848; dF:6; P: 0.00). Mikroçekirdek çalışmasından elde edilen bulgular Çizelge 4.18’de gösterilmektedir.

*In vivo* deneyler sonucunda elde edilen bulgular ile *in vitro* deneylerden elde edilenler birbirine benzerdir. *In vivo* için literatürle yapılan karşılaştırma ve değerlendirmeler *in vitro* çalışma sonucu için de aynıdır.

**Çizelge 4.18.** Kaliks sıvısının *G. mellonella* mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi (*in vitro*)

Kaliks (DEK)	Mitotik İndeks		Mikroçekirdek	
	(Min-Max %)	(Ortalama $\pm$ SH*)	(Min-Max %)	(Ortalama $\pm$ SH*)
<b>Kontrol</b>	0.8 – 1.9	1.35 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.3 – 0.9	0.51 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
<b>Boş</b>	0.8 – 1.9	1.32 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.1 – 0.8	0.49 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
<b>PBS</b>	0.9 – 1.7	1.31 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.2 – 0.8	0.51 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
<b>0,1</b>	0.8 – 1.8	1.29 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.2 – 0.8	0.53 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
<b>0,25</b>	0.2 – 1.1	0.72 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.6 – 1.3	0.99 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
<b>0,5</b>	0.3 – 0.9	0.59 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.9 – 1.6	1.25 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
<b>1</b>	0.1 – 0.5	0.23 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.9 – 1.8	1.37 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a-c) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir

#### 4.3.6. IAA’nın *P. turionellae* mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi

Parazitoid larvaları ile yapılan denemelerde kontrol grubunda mitotik indeks ortalaması %0.99 olarak bulundu. IAA dozlarında en yüksek mitotik indeks 10 000 ppm dozunda (%1.27) görüldü. IAA uygulamalarının tamamında mitotik indeks ortalaması kontrol gurubuna oranla yüksek çıktı. Elde edilen veriler Çizelge 4.19’da gösterilmektedir.

Yapılan istatistiki değerlendirme sonucunda Kontrol grubu ile 500 ppm ve 5000 ppm dozları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir. Bunun yanında kontrol grubu ile 50,

1000 ve 10 000 ppm dozları arasındaki fark ise önemlidir. IAA dozları arasındaki fark ise önemsizdir (F: 4.450; dF:5; P: 0.001).

Mikroçekirdek oluşumu ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.19’da sunulmaktadır. Bu sonuçlara göre kontrol grubunun mikroçekirdek ortalaması %0.48’dir. Mikroçekirdek oluşumu ortalaması en yüksek 500 ppm dozunda (%0.55) görüldü. Tüm IAA dozlarında ortalamalar kontrol grubuna oranla yüksek bulundu, fakat bu farklar istatistiksel olarak önemsizdi (F: 0.423; dF:5; P: 0.832).

Parazitoid *P. turionellae* mitotik indeks ve mikroçekirdek ile alakalı çalışmalarında Uçkan ve Sak (2010) cypermethrinin mitozu azalttığını, bunun yanında mikroçekirdekli hücre sayısını arttırdığını bulmuşlardır. Cypermethrinin bir pestisit olarak etki mekanizması IAA’dan farklıdır. Çalışmamızda 50, 1000 ve 10 000 ppm dozlarının mitotik indeksi arttırdığı sonucu *G. mellonella* sonuçları ile karşılaştırıldığında IAA uygulamasının *P. turionellae* mitotik indeksini daha fazla etkilediğini ve arttırdığını göstermektedir. *G. mellonella* mitotik indeksindeki anlamlı olmayan artışlar *P. turionellae* için anlamlıdır.

**Çizelge 4.19.** IAA’nın *P. turionellae* mitotik ve mikroçekirdek indekslerine etkisi

IAA Dozu (ppm)	Mitotik İndeks (Min-Max % ) (Ortalama ± SH*)		Mikroçekirdek (Min-Max % ) (Ortalama ± SH*)	
	<b>Kontrol</b>	0.7 – 1.3	0.99 ± 0,05 <sup>a</sup>	0.1 – 0.8
<b>50</b>	0.9 – 1.6	1.23 ± 0,05 <sup>b</sup>	0.2 – 0.9	0.56 ± 0,05 <sup>a</sup>
<b>500</b>	0.8 – 1.4	1.14 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0.3 – 0.8	0.59 ± 0,04 <sup>a</sup>
<b>1000</b>	0.9 – 1.5	1.21 ± 0,05 <sup>b</sup>	0.2 – 0.9	0.57 ± 0,05 <sup>a</sup>
<b>5000</b>	0.8 – 1.5	1.13 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0.3 – 0.9	0.57 ± 0,05 <sup>a</sup>
<b>10 000</b>	0.8 – 1.5	1.27 ± 0,05 <sup>b</sup>	0.2 – 0.9	0.55 ± 0,05 <sup>a</sup>

\* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

\*\* Ortalama hücre sayılarının yanında aynı sütunda aynı harfi (a) taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.

## BÖLÜM 5

### SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Böcek bağışıklık sisteminin temellerinden olan hücresel bağışıklığın ilişkili olduğu hemosit sayısının IAA'nın çeşitli dozlarından nasıl etkilendiğini incelediğimiz bu çalışmada; IAA dozlarının hepsinin hemosit sayısı kontrol grubuna göre yüksek çıkmıştır. 50 ppm dozundaki hemosit sayısı diğer tüm gruplardan yüksek çıkmıştır. Bu durum "hormesis" etkisini akla getirmektedir. Altuntaş (2011) tarafından BGD uygulanması sonucunda hemosit sayısının artmasının nedeninin ilgili stres koşulları ile başa çıkabilmek için önce hücre sayısının artırılması ile immün savunmanın artırıldığı, ancak stres koşullarının devam etmesine bağlı olarak mekanizmanın da etkilenmesinden dolayı, bir süre sonra larval savunmanın zayıflayabileceği olduğu yorumu yapılmıştır. Benzeri bir durum IAA için de geçerli olabilir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bir diğer sonuç IAA'nın mitotik indeksde anlamlı bir farklılığa neden olmadığı yönündedir. Fare kemik iliğinde IAA'nın mitotik indeksi arttırdığı Yılmaz ve Yüksel (2005)'in çalışmasıyla ortaya konulmuştur. Bizim çalışmamızda görülen artış bu çalışma ile uyum içerisindedir. Ayrıca hemosit sayısındaki artış ve mitotik indeksde elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde birbirini desteklemektedir.

Önemli bağışıklık tepkilerinden olan enkapsülasyon ve melanizasyon davranışlarının IAA uygulaması ile nasıl değiştiği de çalışmamızda incelediğimiz bir diğer unsurdur. Enkapsülasyon tepkisi yabancı cismin tespit edilmesi ve bunun etrafında hemositlerin birikerek tabakalar oluşturması ile bu cismin soyutlanmasıdır (Rowley ve Ratcliffe, 1981; Pech ve Strand, 1996; Richard ve Edwards, 2002; Marmaras ve Lampropoulou, 2009). Bu hemosit tabakalarının bir kısmının veya tamamının melanin oluşturması ile melanizasyon gerçekleşir (Marmaras ve Lampropoulou, 2009). Çalışmamızda IAA'nın enkapsülasyon davranışları üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır. Hemosit sayısı artışı göz önüne alındığında bu durum ilgi çekicidir. Hemosit aracılı bağışıklık tepkisi olan enkapsülasyon tepkisinin; hücre sayısı arttıkça doğru orantılı olarak artması beklenebilir. Bunun gerçekleşmemesinin sebebi sayısı artan hemosit tipinin enkapsülasyonda ağırlıklı olarak görev alan granülosit ve plazmatositler olmaması olabilir. İkinci olarak da çeşitli PDV'lerin hemosit davranışları üzerinde etkili olması gibi IAA'da hemositlerin yayılma davranışı üzerinde etkili oluyor olabilir. Bir diğer ihtimal ise hemositlerin yüzeyinde yer alan proteinlerin işlevinde değişikliğe neden olmuş olabilir. Bu durumun netlik kazanması için

IAA'nın hemosit davranışları ve hemolenf biyokimyası üzerine etkilerinin incelenmesi gerekmektedir.

Melanizasyon durumu bakımından çalışmamızın sonucu değerlendirildiğinde önemli bir değişiklik gözlenmedi. Bu durumun nedeni melanizasyona neden olan etmenler üzerinde IAA'nın bir etkisinin bulunmaması olabilir. Marmaras ve Lampropoulou (2009) çalışmalarında melanizasyonun tirozin metabolizmasına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Tirozin fenoloksidaz ile etkileşerek DOPA'ya; DOPA da fenoloksidaz varlığında çeşitli biyokimyasal süreçlerden sonra Eumelanin'e dönüşmektedir (Marmaras ve Lampropoulou, 2009). Söz konusu bu süreç değişime uğramadıkça melanizasyon tepkisinde bir değişim olmayacaktır.

Altuntaş ve ark. (2012) çalışmalarında bir diğer BGD olan  $GA_3$ 'ün apoptotik indekste ve nektorik hücrelerde artışa neden olduğunu ortaya koymuştur. Çelik (2014) çalışmasında IAA'nın *Achoria grisella* hemositlerinde apoptotik indeksi istatistiksel olarak değiştirmedığı sonucunu bulmuştur. Aynı çalışmada canlı hücre sayısında azalma tespit etmiştir. Bizim çalışmamızda IAA'nın apoptotik indekste istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmamıştır. Buradan ulaştığımız sonuç ise IAA'nın apoptosis üzerinde önemli bir etkisinin olmadığıdır. Bununla beraber IAA dozlarına bağlı olarak apoptotik hücre sayısında değişimler görülmesi olasıdır. Çalışmamızda IAA uygulamasına bağlı olarak hemosit sayısında ve mitotik indekste görülen artışla; apoptotik indekste canlı hücre sayısında meydana gelen artış birbirini destekler niteliktedir. Mitoz ile meydana gelen artışın canlı hücre sayısını artırması bu anlamda doğal bir sonuçtur. Aynı şekilde hemosit sayısında görülen artış ile de birlikte düşünüldüğünde apoptotik indekste görülen değişimler tutarlıdır.

*P. turionellae* IAA uygulamasının hemosit sayısı, mitotik indeks ve apoptotik indeks üzerine etkileri bakımından *G. mellonella* ile paralellik göstermektedir. IAA uygulaması *P. turionellae* hemosit sayısında bir artışa neden olduysa da bu artış istatistiksel açıdan önemsizdi. Bunun nedeni *P. turionellae* larvalarının *G. mellonella* pupasında dolaylı olarak ve nispeten kısa bir süre IAA'ya maruz kalmasından kaynaklı olabilir. Benzer şekilde apoptotik indekste canlı hücre sayısı bakımından sınırlı artış söz konusudur. IAA uygulamasının *P. turionellae* mitotik indeksine ve mikroçekirdek oluşumuna önemli bir etkisi olmadı.

Kaliks sıvısı enjeksiyonunun *G. mellonella* hemositlerin üzerine etkisi çalışmamızın bir diğer araştırma başlığıdır. Kaliks *P. turionellae* ovaryumunun proksimal kısmında yer



alan özel bir bölgeden salgılanan sıvıdır. Parazitoidin yumurtaları ile birlikte konak vücuduna enjekte edilir. Bazı türlerde PDV ve VLP benzeri yapılar içerirken, bazılarında bu yapılar bulunmamaktadır. Çalışmamızda kullandığımız *P. turionellae* PDV içermeyen türler arasındadır. Yapılan diğer çalışmalar kaliks sıvısının bazı türlerde bağışıklığın baskılanmasına etkisi olmadığını, bazı türlerde ise zehirin konak bağışıklık sistemi üzerindeki etkisini arttırdığını göstermektedir.

Başarılı bir parazitlemenin en önemli koşulu konağın bağışıklık sisteminin baskılanmasıdır. Hemosit aracılı bağışıklık tepkilerinin baskılanması için hemosit sayısının azalması gerekmektedir. Kaliks sıvısının *G. mellonella* hemosit sayısında anlamlı bir azalmaya neden olduğu çalışmamızın sonuçlarından birisidir. Kaliks dozu arttıkça hemosit sayısında anlamlı bir azalma görüldü. Bu sonuç Davies ve ark. (1987)'de görülen sonuç ile uyum içerisindedir. Bir diğer çalışmada (Er ve ark., 2012) *P. turionellae* zehirinin doza bağlı olarak *G. mellonella* hemosit sayısında anlamlı bir azalmaya yol açtığı sonucu bulunmuştur. Bu sonuç da kaliks sıvısı enjeksiyonunun *G. mellonella* larval hemositlerinde azalmaya neden olduğu bulgumuzu destekler niteliktedir.

Kaliks enjeksiyonu sonucunda *G. mellonella* mitotik indeksinde de anlamlı bir azalma olmuştur. Bu azalmanın nedeni kaliks sıvısının hemosit hücre döngüsünü bozması olabilir. Daha önce (Teramoto ve Tanaka, 2004) *Cotesia kariyai* ile yapılan çalışmada; bu türün PDV'lerin zehir enjeksiyonu ile birlikte *Pseudaletia separata* hemositlerinde mitozu durdurduğunu bulunmuştur. Bu türde mitozun durmasının PDV'lerin hücre döngüsünü baskılayan humoral plazma faktörü (Hematopoez İnhibisyon Faktörü –HIF) veya faktörleri meydana getirmesi olabileceği öngörülmüştür. Bir başka çalışmada (Ohnishi ve ark, 1995) mitozun durdurulmasında sitokin benzeri gelişim durdurucu peptidin hemositlerin mitoz geçirmesini engellemiş olabileceği yorumu yapılmıştır. Bizim mitotik indeks bulgularımızda da benzeri bir durum olabilir.

Enkapsülasyon tepkisinin baskılanması başarılı parazitlenme için elzemdir. Bunun sağlanabilmesi için parazitoid yumurtaları ile birlikte kaliks sıvısı ve zehir enjeksiyonu yapmaktadır. Daha önce de bahsedildiği gibi bu sıvıların etkileri türden türe değişiklik göstermektedir. Hemosit sayısında meydana gelen anlamlı düşüşler dolayısı ile enkapsülasyonda da bir düşüşe neden olmuştur. Bunun yanında kaliks sıvısının hemosit; özellikle plazmatositlerin, yayılma davranışları üzerine etkisinin olduğu da bilinmektedir (Davies ve Vinson, 1988; Wago ve Tanaka, 1989; Beck ve ark, 2000, Richards ve Parkinson,

2000). Bu durumda serine proteaz inhibitörlerinin (serpin) etkili olabileceği yönünde bulgular vardır (Beck ve ark, 2000). Çalışmamızda kullandığımız *P. turionellae* kaliks sıvısının da benzeri bir etkisi olabilir. Nitekim *P. turionellae* zehirinin enkapsülasyonu baskılamada etkili olduğu ortaya konmuştur (Er, 2011). Elde ettiğimiz bulgular değerlendirildiğinde *P. turionellae* kaliks sıvısının enkapsülasyon tepkisini baskıladığı görüldü.

Beck ve ark. (2000) çalışmalarında süperparazitlemenin melanizasyonu ötelediğini, bunun kaynağının kaliks sıvısının içerdiği VLP'ler olduğunu bulmuşlardır. Parazitoid *P. turionellae* bu tip VLP ve PDV yapılarından yoksun olsa da kaliks sıvısının içeriği melanizasyonu engelliyor olabilir.

Kaliks enjeksiyonu sonrasında hemositlerde ve mitotik indeksde azalmanın gözlenmesiyle apoptotik indeksde görülen azalma bir bütünlük gösterdi. Bazı çalışmalar; türden türe değişiklik göstermekle birlikte, kaliks sıvısının apoptosisi tetiklediğini göstermektedir (Wago ve Tanaka, 1989; Strand ve Pech, 1995; Teramoto ve Tanaka, 2004; Yu ve ark., 2007; Er ve ark, 2010). Çalışmamızın sonuçları da bu literatür bilgisini desteklemektedir. Kaliks enjeksiyonu ile apoptosis oluşmasının nedeni; hücre içerisinde apoptosis sürecini düzenleyen genlerin aktif olması olabileceği gibi, hücre içerisinde meydana gelen biyokimyasal süreçlerin etkilenmesinden kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızın tüm sonuçları birlikte değerlendirildiğinde IAA'nın *G. mellonella* larvalarının hemosit sayısını arttırdığı; bunun yanında enkapsülasyon-melanizasyon tepkileri ile apoptotik indeks ve mitotik indeksi değiştirmede göstermiştir. Benzer sonuçlar IAA'nın *P. turionellae* larvası üzerine etkilerinde de görülmektedir. Hem in vivo hem de in vitro deney sonuçları IAA'nın genel olarak bu türleri olumlu etkilediği ve bazı özellikler bakımından ise herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Kaliks sıvısının etkilerinin incelendiği deney sonuçları değerlendirildiğinde hemosit sayısında, mitotik indekste ve enkapsülasyon-melanizasyon tepkilerinde yüksek dozlarda önemli azalma; apoptotik indeksde önemli bir artış görülmektedir. Bu sonuçlar literatürle uyum içerisinde ve Er (2011) çalışmasında *P. turionellae* zehirinin etkisini destekler niteliktedir. Bu sonuçlar *P. turionellae* kaliks sıvısının, zehirinin etkisini arttırıcı özellikte olduğunu göstermektedir. Kaliks sıvısı ile alakalı yapılan denemelerde 0,5 ve 1 DEK dozlarında örneklerin 24 saat sürecinde %50'den fazla oranda öldükleri gözlemlenmiştir. Diğer kaliks dozlarından 0,1 DEK kontrol gruplarına göre önemli bir fark görülmedi; ancak

0,25 DEK dozunda ise bağışıklık tepkilerinin baskılandığı görüldü. Bu durum parazitoid türün her parazitleme sürecinde en fazla 5 pupayı parazitlediği gözlemimizle desteklenmektedir. Her parazitlenmede kaliks içeriğinin %20'sini enjekte ettiği düşünülebilir.

Çalışmamızda ortaya koyduğumuz sonuçların biyokimyasal olarak da incelenerek detaylandırılması; bağışıklık tepkilerinin hangi yollarla baskılandığının ortaya konması açısından önemlidir.

## KAYNAKLAR

- Ağaoğlu S., Certel M., Sarıca M., Eser V., Kılınçer N., Ayanoğlu F., Arslan N., Artık N., Basım H., Bircan R., Boydak M., Çağlar Y., Çelik N., Çetiner S., Demir İ., Erdoğan K., Ergüz O., Karakuş Ü., Kuran M., Özçelik A., Torun M., Akman N., Çakmak İ., Kanber R., Erganiş O., Küsmenoğlu İ., 2003. TÜBİTAK Vizyon 2023 Bilim ve Teknoloji Öngörüsü Projesi Tarım ve Gıda Paneli Son Rapor, TÜBİTAK, Ankara, s 55.
- Abd El-Aziz N., Awad H.H., 2010. Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections, *Micron*, 41: 203-209.
- Ahmad M., Arif M.I., Attique M.R., 1997. "Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan, *Bull. Ent. Res.*, 87: 343-347.
- Akai H., Sato S., 1971. An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*, *J. Insect Physiol.*, 17: 1665-1676.
- Altuntaş H., 2011. "Farklı Dozlarda Konağa Verilen Gibberellik Asit (GA<sub>3</sub>)'ün Konak *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ve Parazitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Hemolenf Kimyası ve Hemositlerine Etkisi", Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, Eskişehir, s. 147.
- Altuntaş H., Kılıç A.Y., Uçkan F., Ergin E., 2012. Effects of Gibberellic Acid on Hemocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), *Environmental Entomology*, 41: 688-696.
- Andow D.A., Ragsdale D.W., Nyvall R.F., 1997. Ecological Interactions and Biological Control, Westview Press, Colorado, pp. 334.
- Anggraeni T., Ratcliffe N. A., 1991. Studies on cell-cell co-operation during phagocytosis by purified haemocyte populations of the wax moth, *Galleria mellonella*, *J. Insect Physiol.*, 37(6): 453-460.
- Asgari S., 2006. Venom Proteins From Polydnavirus-Producing Endoparasitoids: Their Role in Host-Parasite Interactions, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 61: 146-156.

- Asgari S., Hellers M., Schmidt O., 1996. Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene, *J. Gen. Virol.*, 77: 2653-2662.
- Asgari S., Schmidt O., Theopold U., 1997. A Polydnavirus-Encoded Protein of an Endoparasitoid Wasp is an Immune Suppressor, *J. Gen. Virol.*, 78: 3061-3070.
- Asgari S., Schmidt O. 2003. Is cell surface calreticulin involved in phagocytosis by insect hemocytes, *J. Insect Physiol.*, 49: 545-550.
- Ashida M., Ochiai M., Niki T., 1988. "Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of silkworm *Bombyx mori*, *Tissue Cell.*, 20: 599- 610.
- Beaulaton J., 1979. Hemocytes and hemocytogenesis in silkworms, *Biochimie.*, 61: 157- 164.
- Beck M., Theopold U., Schmidt O., 2000. Evidence for serine protease inhibitor activity in the ovarian calyx fluid of the endoparasitoid *Venturia canescens*, *J. Insect Physiol.*, 46: 1275-1283.
- Beckage N.E., 1998. Modulation of immune responses to parasitoids by polydnaviruses, *Parasitol.*, 116: 57–64.
- Beroza M., 1970. Chemicals controlling insect behavior, Academic Press, New York, pp 170.
- Bertuzzi A., Mingrone G., Gandolfi A., Greco A.V., Ringoir S., Vanholder R., 1997. Binding of indole-3-acetic acid to human serum albumin and competition with l-tryptophan, *Clin. Chim. Acta.*, 265: 183-192.
- Boman H.G., Faye I., Gudmundsson G.H., Lee J.Y., Lidholm D.A., 1991. Cell free immunity in Cecropia. A model system for antibacterial proteins, *Eur J Biochem*, 201: 23-31.
- Brehelin M., Zachary D., 1986. Insect haemocytes: a new classification to rule out controversy, In: *Immunity in Invertebrates* (Ed: Brehelin, M.), Springer Verlag, Berlin, 36-48.
- Brey P.T., Lee W.J., Yamakawa M., Koizumi Y., Perrot S., 1993. Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasions and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 6275-6279.

- Bronskill J.F., 1961. A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae), *J. Lep. Soc.*, 15: 102-104.
- Brown D.A., Yang N., Ray S.D., 2014. Apoptosis, In: *Encyclopedia of Toxicology*, 3. Edition, Academic Press, 1: 287-294.
- Büyükgüzel K., 2001a. DNA gyrase inhibitors: Novobiocin enhances the survival of *Pimpla turionellae* (Hym., Ichneumonidae) larvae reared on an artificial diet but other antibiotics do not, *J. Appl. Ent.*, 125: 583-587.
- Büyükgüzel K., 2001b. Positive Effects of Some Gyrase Inhibitors on Survival and Development of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) Larvae Reared on an Artificial Diet, *J. Econ. Entomol.*, 94(1): 21-26.
- Büyükgüzel K., Yazgan Ş., 2002. Effects of antimicrobial agents on survival and development of larvae of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) reared on an artificial diet, *T. J. Zool.* 26: 111-119.
- Büyükgüzel K., 2006. Malathion-induced oxidative stress in a parasitoid wasp: effect on adult emergence, longevity, fecundity, ve oxidative ve antioxidative response of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *J. Econ. Entomol.* 99: 1225-1234.
- Büyükgüzel E., Tunaz H., Stanley D., Büyükgüzel K., 2007. Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection, *Journal of Insect Physiology*, 53: 99–105
- Büyükgüzel E., Hyršl P., Büyükgüzel K., 2010. Eicosanoids mediate hemolymph oxidative and antioxidative response in larvae of *Galleria mellonella* L., *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A 156: 176–183
- Cendoroglo M., Jaber B., Balakrishnan L., Perianayagam V.S., King M., Pereira B.J.G., 1999. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10: 93-100.
- Cerenius L., Soderhall K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates, *Immunological Reviews*, 198: 116-126.
- Chapman, R.F. 1998. Circulatory system, blood and immune systems. In *The Insects. Structure and Function*. Cambridge University Press, pp. 94-131.

- Chiara F., Rasola A., 2007. Apoptosis and Disease: Unbalancing the Survival Equilibrium, *New Developments in Cell Apoptosis Research*, Nova Science Publishers, New York, pp 1-52.
- Clarke P.G.H., 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol.*, 181: 195-213.
- Clarke T.E., Clem R.J., 2003. Insect Defences Against Virus Infection: The Role of Apoptosis, *Int. Rev. of Imm.*, 22: 401-424.
- Clem R.J., Frechhimer M., Miller K.L., 1991. Prevention of Apoptosis by a Baculovirus Gene During Infection of Insect Cells, *Science*, 254: 1388-1390.
- Cook S.M., McArthur J.D., 2013. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens, *Virulence* 4: 350–353.
- Costa S.C.P., Ribeiro C., Girard P.A., Zumbihl R., Brehelin M., 2005. Modes of phagocytosis of Gram- positive and Gram- negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes, *J. Insect Physiol.*, 51: 39-46.
- Cox C., 1996. Insecticide Factsheet. Cypermethrin, *Journal of Pesticide Reform*, 16: 15-20.
- Çakır Ş., Yamanel Ş., 2005. Böceklerde İnsektisitlere Direnç, *Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6: 21-29.
- Çelik D., 2014. Konağa verilen indol-3-asetik asitin konak *Achoria grisella* Fabricus, 1794 (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae) hemositlerine etksi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-50.
- Çelik İ., Tüllüce Y., Özok N., 2002. Effects of indoleacetic acid and kinetin on lipid peroxidation levels in various rat tissues, *T. J. Biology*, 26: 193-196.
- Daffre S., Kylsten P., Samakovlis C., Hultmark D., 1994. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract, *Molecular & General Genetics*, 242: 152–162.
- Davies D.H., Strand M.R., Vinson S.B., 1987. “Changes in differential hemocyte count and in vitro behaviour of plasmatocytes from host *Heliothis virescens* caused by *Campoletis sonorensis* polydnavirus”. *J. Insect Physiol.*, 33: 143–153.

- Davies D.H., Vinson S.B. 1988. Interference With Function of Plasmatocytes of *Heliothis virescens* in vivo by Calyx Fluid of the Parasitoid *Campoletis sonorensis*, *Cell Tissue Res*, 251: 467-475.
- Delen N., Durmuşoğlu E., Güncan A., Güngör N., Turgut C., Burçak, A., 2005. Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. 6. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, 3-7 Ocak 2005, Ankara.
- Delen N., Kınay P., Yıldız F., Yıldız M., Altınok H., Uçkun Z., 2010. Türkiye Tarımında Kimyasal Savaşımın Durumu ve Entegre Savaşım, 7. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, 11-15 Ocak 2010, Ankara.
- Demir E., Eseceli H., 2013. Arı Hastalıkları ve Zararlıları, Beekeeping European Enviromental Sustainability “Bees” Projesi ( LdV 2010-1- TR1-LEO05-16698) kapsamında basılan kitapçık.
- Doutt R. L., 1959. The Biology of Parasitic Hymenoptera, *Ann. Rev. Ent.*, 4: 161-182.
- Dover B.A., Davies D.H., Strand M.R., Gray R.S., 1987. Ecdysteroid-Titre Reduction and Developmental Arrest of Last-Instar *Heliothis virescens* Larvae by Calyx Fluid From The Parasitoid *Campoletis sonorensis*, *J. Insect Physiol*, 33: 333-338.
- Dover B.A., Menon A., Brown R.C., Strand M. R., 1995. Suppression of Juvenile Hormone Esterase in *Heliothis virescens* by *Microplitis demolitor* calyx fluid, *J. Insct Physiol*, 40: 809-817.
- Durmus Y., Büyükgüzel E., Terzi B., Tunaz H., Stanley D., Büyükgüzel K., 2008. Eicosanoids mediate melanotic nodulation reactions to viral infection in larvae of the parasitic wasp, *Pimpla turionellae*, *Journal of Insect Physiology* 54: 17–24.
- Ecevit O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, No:27, Samsun, 5-46.
- Edge J.M., Benedict J.H., Carroll J.P., Reading H.K., 2001. Bollgard Cotton: An assesment of global economic, environmental and social benefits, *The Journal of Cotton Science*, 5: 121-136.



- Edson K.M., Vinson S.B., Stolts D.B., Summers M. D., 1981. Virus in a Parasitoid Wasp: Suppression of the Cellular Immune Response in the Parasitoid's Host, *Science*, 211: 582-583.
- Elad Y., Shtienberg D., 1995. *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration, *Integrated Pest Management Reviews*, 1: 15-29.
- Er A., Uçkan F., Rivers D.B., Ergin E., Sak O., 2010. Effects of Parasitization and Envenomation by the Endoparasitic Wasp *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) on Hemocyte Numbers, Morphology, and Viability of Its Host *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Ann.Ent. Soc. A.*, 103: 273-282.
- Er A., 2011. Endoparazitoid *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera; Ichneumonidae) Zehiri ve Parazitlenmesinin Konak Hemositlerine Etkileri, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, Balıkesir, s. 135.
- Erol T., Kılınçer N., 1986. Bazı insektisitlerin pupa asalağı *Pimpla turionellae* L. (Hym: Ichneumonidae)' ye etkileri üzerine araştırmalar, *Türkiye 1. Biyolojik Mücadele Kongresi*, Adana, 123-137.
- Eguchi D., Iwabuchi K., 2006. A new cell line from the wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralididae) *in vitro*, *Cell. Dev. Biol.*, 42: 1-3
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., 2015. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses, *Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, Academic Press: pp 255-267.
- Feldhaar H., Gross R. 2008. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists, *Microbes and infection*, 10: 1082-1088.
- Fenimore P.G., 1984. Plant Pests and Their Control, London, 280 p.
- Furukawa S., Abe M., Usuda K. ve Ogawa I., 2004. Indole-3-acetic acid induces microencephaly in rat fetuses, *Toxicol. Pathol.*, 32: 659-667.
- Gandhe A.S., Janardhan G., Nagaraju J., 2007. Immune upregulation of novel antibacterial proteins from silkworms (Lepidoptera) that resemble lysozymes but lack muramidase activity, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 655–666.

- Glatz R.V., Asgari S., Schmidt O., 2004. Evolution of polydnviruses as insect immune suppressors, *Trends in Microbiol.* 12: 545-554.
- Granados R.R., Guoxun L., Blissard G. W., 2007. Insect cell culture and biotechnology, *Virologica Sinica*, 22: 83-95.
- Greathead D. J., Waage J.K., 1983. Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries, *World Bank Technical Paper*, Number 11, The World Bank, Washington, D.C., U.S.A. pp. 44.
- Gupta A.P., 1985. Cellular Elements in the Hemolymph. In: Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology, ed. Kerkut, G.A., L.I. Gilbert., Pergamon Press, New York, 3:401-451.
- Gupta P., Ferkovich S.M., 1998. Interaction of calyx fluid and venom from *Micropilitis croceipes* (Braconidae) on developmental disruption of the natural host, *Helicoverpa zea*, and two atypical hosts, *Galleria mellonella* and *Spodoptera exigua*, Parasitoid-host interactions at the physiological and molecular level, *J. Insect Phys*, 44: 713-719.
- Gülel A., 1982. Studies on the biology of the *Dibrachys boarmiae* (Warker) (Hym.: Pteromalidae) Parasitic on *Galleria mellonella* (L.), *Z. Ang. Ent.*, 94: 138-14.
- Gürlük S., Turan Ö., 2008. Dünya Dıda Kirizi: Nedenleri ve Etkileri, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22: 63-74.
- Hajek A.E., 2004. Natural Enemies: An introduction to biological Control, Cambridge University Press, USA, 105-356.
- Hall, M., Scottn, T., Sugumaran, M., Soderhallt, K., Law, J.H. 1995. Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: Purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 92, p. 7764-7768.
- Hamerski M.R., Hall R.W., 1988. Laboratory Rearing of *Tetrastichus gallerucae* (Hym.: Eulophidae), an Egg Parasitoid of the Elm Leaf Beetle (Col. Chrysomelidae), *J. Econ. Ent.*, 81: 1503-1505.
- Harris M.K., 1983. Integrated pest management of pecans, *Ann. Rev. Entomol.*, 28: 291.

- Hasnain S.E., Taneja T.K., Sah K.N., Mohan M., Pathak N., Sahdev S., Athar M., Totey S.M., Begum R., 1999. In vitro cultured *Spodoptera frugiperda* insect cells: Model for oxidative stress-induced apoptosis, *J. Biosci*, 24 (1): 13-19.
- Hillocks R.J., 1995. Integrated management of insect pests, diseases and weeds of cotton in Africa, *Integrated Pest Management Reviews*, 1: 31-47.
- Hoffmann J.A., Zachary D., Hoffmann D., Porte A., 1979. Insect hemocytes: postembryonic development and differentiation : hemopoietic tissues and their functions in some insects, In : *Insect hemocytes*, Gupta Ed., Cambridge University Press 22-66
- Hoffmann J.A., Reichhart J.M., 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective, *Nature Immunology*, 3: 121–126.
- Jiravanichpaisal P., Lee B., Soderhall K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization, *Immunobiology*, 211: 213–236.
- Jones J.C., 1968. Changes in the Hemocyte Picture of *Galleria mellonella* (Linnaeus). *Biological Bulletin*, 132 (2):p. 211-221
- Jones J.C., 1970. Hematopoiesis in insects, In: *Regulation of hematopoiesis*, (Ed: Gordon, A.S.), *Appleton Press*, New York, 7-65.
- John J.A., Blogg C.D., Murray F.J., Schwetz B.A., Gehring P.J., 1979. Teratogenic Effects of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid in Mice and Rats, *Teratology*, 19: 321-326.
- Kansu Y.A., Uğur A., 1984. *Pimpla turionellae* (L.) (Hym., Ichneumonidae) ile Konukçusu Bazı Lepidopter Pupaları Arasındaki Biyolojik İlişkiler üzerinde Araştırmalar. *Doğa Bilim Dergisi D2*, 8: 160-173.
- Karadeniz A., Kaya B., Savaş B., Topçuğlu Ş.F., 2011. Effects of two plant growth regulators, indole-3-acetic acid and  $\beta$ -naphthoxyacetic acid, on genotoxicity in *Drosophila* SMART assay and on proliferation and viability of HEK293 cells from the perspective of carcinogenesis, *Toxicology and Industrial Health*, 27(9) 840 - 848.

- Kaur R., Rup P.J., 2000. Evaluation of Regulatory Influence of Four Plant Growth Regulators on the Reproductive Potential and Longevity of Melon Fruit Fly (*Bactrocera cucurbitae*), *Phytoparasitica*, 30: 224-230.
- Kayış T., Emre İ., 2012. Ağır Metal Stresinin *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae)'nin Protein ve Glikojen Sentezine Etkileri, *Ekoloji* 21, 83, 61-67.
- Kim G.S., Jeon S.E., Park J.K., 2004. Oxidation of indole-3-acetic acid by horseradish peroxidase induces apoptosis in G361 human melanoma cells, *Cellular Signalling*, 16: 81-88.
- Kim G.S., Kim Y., 2010. Up-regulation of circulating hemocyte population in response to bacterial challenge is mediated by octopamine and 5-hydroxytryptamine via Rac1 signal in *Spodoptera exigua*, *J. Insect Physiol.*, 56: 559-566.
- Kitano H., 1982. Effect of the venom of the gregarious parasitoid *Apanteles glomeratus* on its hemocyte encapsulation by the host, *Pieris*, *J. Invertebr. Pathol.*, 40: 61-67.
- Kitano H., 1986. The Role of *Apanteles glomeratus* Venom in the Defensive Response of Its Host, *Pieris rapae craccivora* *J. Insect Physiol.*, 32: 369-375.
- Kitano H., Nakatsuji N., 1978. Resistance of *Apanteles* Eggs to the Haemocytic Encapsulation by Their Habitual Host, *Pieris*, *J. Insect Physiol.*, 24: 261-271.
- Kosmider B., Zyner E., Osiecka R., Ochocki J., 2004. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP, *Mutation Research*, 563: 61-70
- Kylsten P., Kimbrell D.A., Daffre S., Samakovlis Ch., Hulmark D., 1992. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands, *Mol. Gen.*, 232: 335.
- Lavine M.D., Strand M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1295–1309.
- Le N.T., Asgari S., Amaya K., Tan F.F., Beckage N.E., 2003. Persistence and expression of *Cotesia congregata* polydnavirus in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *J. Insect Physiol.*, 49: 533-543.

- Lee C.Y., Yap H.H., Chong N.L. 1996. Insecticide resistance and synergism in field collected German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) in Peninsular Malaysia, *Bull. Ent. Res.*, 86: 675-682,
- Lemaitre B., Hoffmann J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*, *Annu. Rev. Immunol.*, 25: 697-743.
- Levin D. M., 2007. An integrin required for the encapsulation immune response in the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae), Kansas State University, College of Agriculture, Department of Entomology, Manhattan, Kansas. 1-125.
- Liu F., Yang H., Peng J-X, Hong H-Z, 2012. Cytochrome c and insect cell apoptosis. *Insect Science* 19: 30-40
- Lins P.G., Valle C.R., Pugine S.M.P., Oliveira D.L., Ferreira M.S.L., Costa E.J.X., De Melo M.P. 2006. Effect of indole acetic acid administration on the neutrophil functions and oxidative stress from neutrophil, mesenteric lymph node and liver. *Life Sciences* 78 (6): 564 – 570
- Luckhart S., Webb B., 1996. Interactions of a Wasp Ovarian Protein and Polydnavirus in Host Immune Suppression, *Dev. Comp. Immun.*, 20: 1-21.
- Lynn D. E., 1996. Development and characterization of insect cell lines, *Cytotechnology* 20: 3-11.
- Lynn D. E., 2002. Methods for Maintaining Insect Cell Cultures, *Journal of Insect Science*, 2: 1-9.
- Malthus T., 1798. An Essay on the Principle of Population, St. Paul's Church-Yard, London, 1-126. (Reprinted 1998, Electronic Scholarly Publishing Project)
- Marmaras J.V., Lampropoulou M., 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity, *Cell. Sig.*, 21: 186-195.
- McDonald R.E., Greany P.D., Shaw P.E., Schroeder W.J., Hatton T.T., Wilson C.W., 1988. Use of gibberellic acid for Caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa*) control in grapefruit, In: *Proceedings of the Sixth International Citrus Congress*, R. Goren and K. Mendel [eds.], *Balaban Publications*, Rehovot, Israel. 1147-1152.

- Melo M.R., Curi T.C.P., Miyasaka C.K., Palanch A.C., Curi C.P., 1998. Effect of indole acetic acid on oxygen metabolism in cultured rat neutrophil, *Gen Pharmac.*, 4: 573-578.
- Meylaers K., Freitak D., Schoofs L., 2007. Immunocompetence of *Galleria mellonella*: Sex- and stage-specific differences and the physiological cost of mounting an immune response during metamorphosis, *Journal of Insect Physiology*, 53: 146–156
- Michalak I., Chojnacka K., 2014. Biocides, In: *Encyclopedia of Toxicology* (3. Edition) Ed. Philip Wexler, Academic Press, Vol I, 461-464.
- Mickel L.G., 1978. Plant Growth Regulators, Controlling biological behavior with chemicals, *Chem. Eng. News.*, 56: 18.
- Montagna C.M., Anguiano O.L., Gauna L.E., De D'angelo, A.M.P., 1999. Resistance to pyrethroids and DDT in a field-mixed population of Argentinean black flies (Diptera: Simuliidae), *J. Econ. Entomol.*, 92: 1243-1245.
- Mukherjee K., Altınçiçek B., Hain T., Domann E., Vilcinskis A., Chakraborty T., 2010. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis, *App. Env. Mic.*, 76: 310-317.
- Mullett H., Ratcliffe N.A., Rowley A.F., 1993. Analysis of Immune Defences of the Wax Moth, *Galleria mellonella*, with Anti-haemocytic Monoclonal Antibodies, *J. Insect Physiol.*, 39(10): 897-902.
- Murhammer D.W., 2007. Useful tips, widely used techniques, and quantifying cell metabolic behavior, *Methods Mol Biol.*, 388: 3-22.
- Nappi, A., Poirié, M., Carton Y., 2009. The Role of Melanization and Cytotoxic By-Products in the Cellular Immune Responses of *Drosophila* Against Parasitic Wasps, *Advances in Parasitology*, 70: 99-121.
- Narayanan K., 2004. Insect defense: Its impact on microbial control of insect pests, *Current Science*, 86: 800-813.
- Obrycki J. J., Tauber M. J., Tauber C. A., 1985. *Perilitus coccinellae* (Hym.: Braconidae): Parasitization and Development in Relation to Host-stage Attacked, *Ann. Ent. Soc. Am.*, 78: 852-854.

- Ohnishi, A., Hayakawa, Y., Matsuda, Y., Kwon, K.-W., Takahashi, T.A., Sekiguchi, S., 1995. Growth-blocking peptide titer during larval development of parasitized and cold-stressed armyworm. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 1121–1127.
- Öncüer C., 2000. Tarımsal zararlılarla savaş yöntemleri ve ilaçları, Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, 13, Aydın, 379s.
- Özmen M., Topçuoğlu Ş.F., Bozcuk S., Bozcuk N.A., 1995. Effects of Abscisic Acid and Gibberellic Acid on Sexual Differentiation and Some Physiological Parameters of Laboratory Mice, *Tr. J. of Biology*, 19: 357-364.
- Park S.Y., Kim C.H., Jeong W.H., Lee J.H., Seo S.J., Han Y.S., Lee I.H., 2005. Effects of two hemolymph proteins on humoral defense reactions in the wax moth, *Galleria mellonella*, *Developmental and Comparative Immunology*, 29: 43–51
- Paulson G.S., Hull L.A., Biddinger D.J., 2005. Effect of a plant growth regulator prohexadione-calcium on insect pests of apple and pear, *J. Econ. Entomol.* 98: 423-431.
- Pech L.L., Strand M.R., 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes, *J. Cell Science.* 109: 2053- 2060.
- Pech L.L., Strand, M.R., 2000. Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells, *J. Insect Physiol.*, 46: 1565-1473.
- Pellizzato F., 2014. Environmental Risk Assessment, Pesticides and Biocides, In: *Encyclopedia of Toxicology* (3. Edition) Ed. Philip Wexler, Academic Press, Vol 2, 402-406.
- Peter C., David B.V., 1990. “Biology of *Apanteles machaeralis* Wilkinson (Hym.: Braconidae) a Parasite of *Diaphania indica* (Saunders) (Lep.: Pyralidae), *Proc. Indian Acad. Sci (Anim. Sci.)*, 99: 353-362.
- Prescott S.C., Breed R.S., 1910. The determination of the number of body cells in milk by a direct method, *American Journal of Public Hygiene*, 663-664.
- Phukan M., Hazarika L.K., Barooah M., Puzari K.C., Kalita S., 2008. Interaction of *Dicladispa armigera* (Coleoptera: Chrysomelidae) haemocytes with *Beauveria bassiana*, *Int. J. Trop. Insect Sci.*, 28: 88-97.

- Quickle D.L., 2015. The Braconid and Ichneumonid Parasitoid Wasps: Biology, Systematics, Evolution and Ecology, JohnWiley & Sons, Ltd, West Sussex, UK, 1-681.
- Ramadan M.M., Wong T.T.Y., Messing R.H., 1995. "Reproductive biology of *Biosteres vandenboschi* (Hym.: Braconidae), a Parasitoid of Early-Instar Oriental Fruit Fly, *Ann. Ent. Soc. Am.*, 88: 189-195.
- Ratcliffe N.A., Rowley A.F., 1979. Role of insect hemocytes against biological agents In: *Insect hemocytes: development, forms, functions, and techniques*. A.P. Gupta, Ed., Cambridge University Press, pp. 31-414.
- Ratcliffe N.A., Rowley A.F., Fitzgerald S.W., Rhodes C.P., 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances, *Int. Rev. Cytol.*, 97: 186–350.
- Ribeiro C., Simoes N., Brehelin M., 1996. Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions. *in vivo* and *in vitro* studies, *J Insect Physiol.*, 42: 815-822.
- Ribeiro S., Sousa J. P., Nogueira A.J.A., Soares A. M.V.M., 2001. Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49: 131-138.
- Ribeiro B.M., Guedes R.N.C., Oliveira E.E., Santos J.P., 2003. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), *Journal of Stored Products Research*, 39: 21-31.
- Ribeiro C., Brehelin M., 2006. Insect haemocytes: What type of cell is that?, *J Insect Physiol.*, 52: 417-429.
- Richards E.H., Dani M.P., 2008. Biochemical isolation of an insect haemocyte anti-aggregation protein from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*, and identification of its gene, *J. Insect Physiol.*, 54: 1041-1049
- Richards E.H., Edwards J.P. 2002. Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, disrupts the cytoskeleton of host haemocytes and suppresses encapsulation *in vivo*, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 49: 108–124.



- Richards E.H., Parkinson N.M., 2000. Venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* adversely affects the morphology, viability, and immune function of hemocytes from larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*, *J. Invertebr. Pathol.*, 76: 33-42.
- Rizki R.M., Rizki T.M., 1990. Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8388–8392.
- Rivers D.B., Ruggiero L., Hayes M., 2002. The ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) differentially affects cells mediating the immune response of its flesh fly host, *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae), *J. Insect Physiol.*, 48: 1053-1064.
- Rivers D. B., Ergin, E., Uçkan, F., 2007. Cell death in the host-parasitoid relationship, *In: New Developments in Cell Apoptosis Research*. (Ed: Alan, J. C.), Chapter 3, Nova Science Publishers, Inc., 6080 Jericho Turnpike Suite 207, COMMACK, NY 11725, U.S.A. p. 69-96.
- Rosen D., 1985. Biological Control. In: *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*, ed. Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., 12, Pergamon Press, New York, p. 413-464,
- Rosales C., 2011. Phagocytosis, a cellular immune response in insects, *Invertebrate Survival Journal*, 8: 109-131.
- Rosetto M., Manetti A. G., Giordano P. C., Marri L., Amons R., Baldari C. T., Marchini D., Dallai R., 1996. Molecular characterization of ceratotoxin c, a novel antibacterial female-specific peptide of the ceratotoxin family from the medfly *Ceratitidis capitata*, *Eur. J. Biochem.*, 241: 330.
- Rowley A.F., Ratcliffe N.A., 1981. Insects, In: *Invertebrate Blood Cells*, (Ed: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F.), Vol 2, Academic Press, London, 421-488.
- Sak O., Uçkan F., Ergin E., 2006. Effects of cypermethrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Belg. J. Zool.*, 136: 53-58.
- Sak O., Ergin E., Uçkan F., Rivers D.B., Er A., 2011. Changes in the hemolymph total protein of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) after parasitism and

- envenomation by *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Turk. J. Biol.* 35: 425-432
- Schmit A.R., Ratcliffe N.A., 1977. The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae, *J. Insect Physiol.*, 23: 175–184.
- Schmidt O., Theopold U., Strand M. 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by Hymenopteran endoparasitoids, *BioEssays*, 23: 344-351.
- Shelby K.S., Webb, A.B., 1999. Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity, *J. Insect Physiol.*, 45: 507-514.
- Sierpińska A., 1998. Towards an integrated management of *Dendrolimus pini* L.”, Proceedings: Population Dynamics, Impacts, and Integrated Management of Forest Defoliating Insects, *USDA Forest Service and General Technical Report NE-247*, 129-142.
- Silva M.T.B., Costa E.C., Boss A., 2003. Control of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with insect growth regulators, *Cienc. Rural* 33: 601-605.
- Simmonds M.S.J., Manlove J.D., Blaney W.W., Khambay B.P.S. 2002. Effects of selected botanical insecticides on the behaviour and mortality of the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* and the parasitoid *Encarsia formosa*, *Entomol. Exp. Appl.*, 102: 39-47.
- Smaghe G., Goodman C.L., Stanley D., 2009. Insect cell culture and applications to research and pest management, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 45: 93-105
- Soderlund D.M., Knipple D.C., 1999. Knockdown resistance to DDT and pyrethroids in the house fly (Diptera: Muscidae): from genetic trait to molecular mechanism, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 92: 909-915.
- Soller M., Lanzrein B., 1995. Polydnavirus and Venom of the Egg-Larval Parasitoid *Chelonus inanitus* (Braconidae) Induce Developmental Arrest in the Prepupa of its Host *Spodoptera littoralis* (Noctuidae). *J. Insect Physiol.*, 42: 471-481.
- Stanley D., Miller J., Tunaz H., 2009. Eicosanoid Actions in Insect Immunity. *J. Innate Immun.* 1: p.282–290

- Stettler P., Trenczek T., Wyler T., Pfister-Wilhelm R., Lanzrein B., 1998. Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*, *J. Insect Physiol.*, 44: 817–831.
- Stoltz D.B., Guzo D., 1986. Apparent hemocytic transformations associated with parasitoid-induced inhibition of immunity in *Malacosoma disstria* larvae, *J. Insect Physiol.*, 32: 377–388.
- Stoltz D.B., Vinson S.B. 1987. Viruses and Parasitism In Insects, *Advances in Virus Research*, 24: 125-171.
- Strand M.D., 2008. The insect cellular immune response, *Insect Science*, 15: 1-14.
- Strand M.D., Dover B.A., 1991. Developmental disruption of *Pseudoplusia includens* and *Heliothis virescens* larvae by the calyx fluid and venom of *Microplitis demolitor*, *Arch. Insect. Biochem. Physiol*, 18: 131-145.
- Strand M.R., Noda T., 1991. Alterations in the hemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by *Microplitis demolitor*, *J. Insect Physiol*, 37: 839-350.
- Strand M.R., Pech L.L. 1995a. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships, *Annu. Rev. Entomol.*, 40: 31–56.
- Strand M.R., Pech L.L. 1995b. *Microplitis demolitor* polydnavirus induces apoptosis of a specific haemocyte morphotype in *Pseudoplusia includens*, *J. Gen. Virol.*, 76: 283–291.
- Strand M.R., Dover B.A. 1991. Developmental disruption of *Pseudoplusia includens* and *Heliothis virescens* larvae by the calyx fluid and venom from *Microplitis demolitor*, *Archives of Insect Biochem. and Phys.*, 18: 131-145.
- Sung H.H., Kao W.Y., Su Y.J., 2003a. Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, *Aquatic Toxicology*, 64: 25-37.
- Sung H.H., Lin S.C., Chen W.L., Ting Y.Y., Chao W.L. 2003b. Influence of Timsen™ on *Vibrio* populations of culture pond water and hepatopancreas and on the hemocytic activity of tiger shrimp, *Aquaculture*, 219: 123-133.

- Suzuki M., Tanaka T., 2006. Virus-like particles in venom of *Meteorus pulchricornis* induce host hemocyte apoptosis, *J Insect Physiol* 52: 602–613.
- Şengonca Ç., Peters G., 1993. Biology and effectiveness of *Apanteles rubecula* Marsh. (Hym., Braconidae), a solitary larval parasitoid of *Pieris rapae* (L.) (Lep., Pieridae), *J. Appl. Ent.*, 115: 85-89.
- Tanaka T., 1987a. Effect of the venom of the endoparasitoid, *Apanateles kariyai* Watanabe, on the cellular defence reaction of the host, *Pseudaletia separata* Walker, *J. Insect Physiol.* 33: 413–420.
- Tanaka T., 1987b. Morphological changes in haemocytes of the host, *Pseudaletia separata*, parasitized by *Microplitis mediator* or *Apanteles kariyai*, *Dev. Comp. Immunol.* 11: 57–67.
- Tanaka T. 1987c. Morphology and Functions of Calyx Fluid Filaments in the Reproductive Tracts of Endoparasitoid, *Microplitis mediator* [Hym: Braconidae], *Entomophaga*, 32: 9-17.
- Takada Y., Kawamura S., Tanaka T., 2001. Effects of various insecticides on the development of the egg parasitoid *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *J. Econ. Entomol.*, 94: 1340-1343.
- Theopold U., Li D., Fabbri M., Scherfer C., Schmidt O., 2002. The coagulation of insect hemolymph, *Cell Mol. Life Sci.*, 59: 363-672.
- Theopold U., Schmidt O., Söderhall K., Dushay M. S., 2004. Coagulation in arthropods: defense, wound closer and healing, *Trends Immunol.*, 25: 289-294.
- Tepass U., Fessler L.I., Aziz A., Hartenstein V., 1994. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*, *Development*, 120: 1829-1837.
- Teramoto T., Tanaka T., 2004. Mechanism of reduction in the number of the circulating hemocytes in the *Pseudaletia separata* host parasitized by *Cotesia kariyai*, *J Insect Physiol.* 50: 1103–1111.
- Tiryaki O., Canhilal R., Horuz S. 2010. Tarım İlaçları Kullanımı ve Riskleri, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26: 154-169.

- Tucker D. J., 1976. The effects of far-red light on the hormonal control of side shoot growth in the tomato, *Ann. Bot.*, 40: 1033-1042.
- Turnbull M.W., Martin, S.B., Webb, B.A., 2004. Quantitative analysis of hemocyte morphological abnormalities associated with *Campoletis sonorensis* parasitization, *J. Insect Sci.*, 4: 11-26.
- Tutkun E., Boşgelmez A., 2003. Bal Arısı Zararlıları ve Hastalıkları Teşhis ve Tedavi Yöntemleri, Bizim Büro Basımevi. Ankara, 1-365.
- Uçkan F., Gülel A., 1990. Endoparazitoid *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae) dişilerinde zehir aparatının yapısı ve zehirinin başlıca kimyasal grubunun tayini, X. Ulusal Biyoloji Kongresi, Erzurum, 73-83.
- Uçkan F., Hepçorman Şengül S., Sak O., ve Korkmaz M., 2007. Effects of 5-Aza-2\_-deoxycytidine on biological parameters of the larval endoparasitoid *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae), and on its host, *Achoria grisella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 100: 265-269.
- Uçkan F., Er A., Ergin E., 2010. Levels of encapsulation and melanization in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) parasitized and envenomated by *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *J. Appl. Entomol.*, 134: 718-726.
- Uçkan F., Sak O., 2010. Cytotoxic Effect of Cypermethrin on *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) Larval Hemocytes, *Ekoloji* 19, 75, 20-26.
- Uçkan F., Haftacı İ., Ergin E., 2011. Effects of indol-3-acetic acid on biological parameters of the larval Endoparasitoid *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae), *Annals of the Entomological Society of America*, 104: 77-82.
- Uçkan F., Soydabaş H.K., Özbek R., 2014. Effect Of Indol-3 Acetic Acid On The Biochemical Parameters Of *Achoria grisella* Hemolymph and *Apanteles galleriae* Larva, *Pak. J. Biotechnol.*, 11 (2): 163-171
- Uçkan F., Özbek R., Ergin E., 2015. Effects of Indol-3-Acetic Acid on the biology of *Galleria mellonella* and its endoparasitoid *Pimpla turionellae*, *Belg. J. Zool.*, 145 (1): 49-58.

- Vaux D.L., Strasser A., 1996. The Molecular Biology of Apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 2239-2244.
- Vilmos P., Kurucz É., 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol Lett.* 62: 59–66.
- Vural N., 2005. Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73, Ankara, 659s.
- Wago, H., Tanaka, T. 1989. Synergistic effects of calyx fluid and venom of *Apanteles kariyai* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae) on the granular cells of *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae), *Zool. Sci.*, 6, 691-696.
- Walters J.B., Ratcliffe N.A. 1983. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: fate of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* nodules, *J. Ins. Phys.*, 29 (5): 417-424.
- Webb, B.A., Luckhart S., 1994. Evidence for an early immunosuppressive role for related *Campoletis sonorensis* venom and ovarian proteins in *Heliothis virescens*, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 26: 147–163.
- Wells M.L., Mcpherson R.M., Ruberson J.R., Herzog G.A., 2001. Coccinellids in cotton: population response to pesticide application and feeding response to cotton aphids (Homoptera: Aphididae), *Environ. Entomol.*, 30: 785-793.
- Wharton R.A., 1993. Bionomics of the Braconidae, *Annu. Rev. Ent.*, 38: 121-143,
- Wiesner A., 1991. Induction of immunity by latex beads and by hemolymph transfer in *Galleria mellonella*, *Dev. Comp. Imm.*, 15: 241-250.
- Wiesner A., 1992. Characteristics of inert beads provoking humoral immune responses in *Galleria mellonella* larvae, *J. Ins. Phys.*, 38: 533-541.
- Wiesner A., Wittwer D., Götz P. 1996. A Small Phagocytosis Stimulating Factor is Released by and Acts on Phagocytosing *Galleria mellonella* Haemocytes In Vitro, *J. Ins. Phys.*, 42: 829-835.
- Wu G., Yi Y., 2015. Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 167: 131–139.

- Xu J., Shelton A.M., Cheng X., 2001a. Comparison of *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and *Microplitis plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) as biological control agents of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): field parasitism, insecticide susceptibility, and host-searching, *J. Econ. Entomol.*, 94: 14-20.
- Xu J., Shelton A.M., Cheng X., 2001b. Variation in susceptibility of *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) to permethrin, *J. Econ. Entomol.*, 94: 541-546.
- Yamashita M., Iwabuchi K., 2001. Bombyx mori prohemocyte division and differentiation in individual microcultures, *J. Insect Physiol.*, 47: 325-331.
- Yeşilada E., Bozcuk A.N., 1995. *Drosophila melanogaster*'in Yumurta Verimi Üzerine ABA ve Kinetin'in Etkisi, *Tr. J. of Biology*, 19: 37-44,
- Yeşilada E., 2000. The Effect of Kinetin, Gibberellic Acid and Indole Acetic Acid on EMS-Induced Somatic Mutation and Recombination in *Drosophila melanogaster*, *T. J. Bio.*, 24, 279-284.
- Yılmaz H.R., Yüksel E., 2005. İndol-3-asetik asit'in üçüncü nesil farelerin kemik iliği hücrelerinde mitotik indeks üzerine etkileri, *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*, 12: 46-49.
- Yu R-X., Chen Y-F, Chen X-X, Huang F., Lou Y-G, Liu, S., 2007. Effects of venom/calyx fluid from the endoparasitic wasp *Cotesia plutellae* on the hemocytes of its host *Plutella xylostella* in vitro", *J. Ins. Phys.*; 53: 22-29.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Serhat KAYA

Doğum Yeri: Erzurum

Doğum Tarihi: 24.03.1979

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### a) Yayınlar:

Dülger B., Tok C.V., Kaya S. and Sevinç M., 2007, “Antimicrobial Activity in the Skin Secretion of *Hyla arborea* (Linnaeus, 1758)”, *Russian Journal of Herpetology*; 14 (2): 117-120.

Tok C. V., Tosunoğlu M., Gül Ç., Yiğini B., Türkakın M., Saruhan G., Kaya S., 2006, “Erythrocyte count and size in some Colubrids (Reptilia: Ophidia) from Turkey”, *Russian Journal of Herpetology*. 13 (2): 97-100.

#### b) Bildiriler:

Eskin A., Nurulloğlu U.Z., Kaya S., 2014, “Effects of Silver Nanoparticles on Hemocytes of *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)”, 3th Balkan Scientific Conference on Biology, May 30th – June 1st, 2014, Plovdiv, BULGARIA, 64 p.

Kaya S. ve Uçkan F, 2014, "Indol-3-Asetik Asit'in *Galleria mellonella*'nin Enkapsülasyon Tepkilerine Etkisi" 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.

Kaya S. ve Uçkan F, 2013, “Indol-3-Asetik Asit'in Büyük Balmumu Güvesinin (*Galleria mellonella*, L. Lepidoptera: Pyralidae) Hemosit Sayısına Etkisi”, 1. Ulusal Zooloji Kongresi, Niğde.



Kaya S., Tok C.V., Gül Ç., Tosunoğlu M., 2004, “Çanakkale Civarının Herpetofaunası”. XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi (21-24 Haziran), Adana.

Gül Ç., Tosunoğlu M., Kaya S., Tok C.V., 2004, “Türkiye'deki Bazı Kaplumbağa Türlerinde Hematolojik İncelemeler”. XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi (21-24 Haziran), Adana.

c) Katıldığı Projeler:

Türkiye *Emys orbicularis*, *Mauremys caspica* ve *Mauremys rivulata* Tatlı su kaplumbağası türlerinin sistematik revizyonu, ekolojileri ve popülasyon durumları.

TBAG-2402 (103T189) TÜBİTAK

onağa Verilen İndol-3-asetik asitin Konak *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ve Parazitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Biyolojisi ve Hemositlerine Etkisi. Kocaeli Üniversitesi BAP Birimi

## **İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi 2002- (Devam Ediyor)

## **İLETİŞİM**

E-posta: serhatkaya@comu.edu.tr