

PARAZİTOİT *Bracon hebetor* SAY
(HYMENOPTERA: BRACONİDAE)'UN
KONAK *Galleria mellonella* L.
(LEPIDOPTERA: PYRALİDAE)
LARVALARININ HEMOLENİNDEKİ
AMİNO ASİTLER ÜZERİNE ETKİSİ

Özgür VARER İŞİTAN
DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ

Bu Doktora Tez Çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi PYO.FEN.1904.09.001' nolu Proje ile Desteklenmiştir.

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PARAZİTOİT *Bracon hebetor* SAY (HYMENOPTERA: BRACONİDAE)'UN
KONAK *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALİDAE)
LARVALARININ HEMOLENİNDEKİ AMİNO ASİTLER ÜZERİNE ETKİSİ**

Özgür VARER IŞITAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKADEMİK DANIŞMAN
Prof. Dr. Adem GÜLEL**

SAMSUN-2011

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 14/10/ 2011 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Adem GÜLEL 

Üye : Prof. Dr. Veysel KARTAL 

Üye : Prof. Dr. Halil KORKMAZ 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Eylem AKMAN GÜNDÜZ 

ONAY :

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

....../....../2011

Prof. Dr. Hasan GÜMÜŞ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**PARAZİTOİT *Bracon hebetor* SAY (HYMENOPTERA: BRACONİDAE)'UN
KONAK *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA:PYRALİDAE)
LARVALARININ HEMOLENFİNDEKİ AMİNO ASİTLER ÜZERİNE ETKİSİ**

ÖZ

Parazitoit *Bracon hebetor* tarafından paralize edilen ve/veya parazitlenen konak *Galleria mellonella* larvalarının hemolenfindeki serbest amino asitlerin miktarlarındaki ve toplam protein miktarındaki değişimler incelendi. Parazitoit ve konak kültürleri laboratuvarında $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, 65 ± 5 bağıl nem ve 16:8 (A:K) fotoperyot şartlarında kuruldu ve devam ettirildi. Amino asit analizlerinde kullanılan konak hemolenf örnekleri iki grup larvadan alındı. Birinci grup sadece dişi parazitoitler tarafından paralize edilen fakat üzerlerine yumurta bırakılmayan konak larvalarından (P1), ikinci grup paralize edilen ve üzerlerinde parazitoit larvaları gelişmeye başlayan konak larvalarından (P2) oluşturuldu. P1 grubundan paralize olmalarından sonra altışar saat ara ile 72. saate kadar hemolenf örnekleri alındı. P2 grubundan parazitoit larval hayatının başlamasından itibaren 24 saat aralıklarla 72. saate kadar hemolenf örnekleri alındı. Kontrol grubunu paralize olmamış konak larvaları oluşturdu. Hemolenfdeki amino asit analizleri HPLC ile, toplam protein analizi Lowry metoduna göre yapıldı.

İncelenen tüm hemolenf örneklerinde 17 serbest amino asit tespit edildi. Bunlardan konsantrasyonu en fazla olan amino asit prolindi. Paralize olan larvaların (P1) hemolenfindeki prolin, fenilalanin ve theronin miktarının arttığı, serin, alanin ve asparajin miktarının belirgin bir şekilde azaldığı, valin, lösin, izolösin, histidin, triptofan, lizin, tirozin, metiyonin, arjinin ve glisin+glutamin miktarlarının önemli derecede değişmediği belirlendi. Paralize olduktan sonra üzerinde parazitoit larvaları gelişmeye başlayan konak larvalarında (P2), prolin, fenilalanin ve tirozin miktarlarının arttığı, glisin+glutamin, arjinin, asparajin ve lizin miktarının azaldığı, valin, histidin, lösin, izolösin, triptofan, metiyonin, alanin, serin ve treonin miktarlarında önemli bir değişim olmadığı tespit edildi. Kontrol grubu larvaların hemolenfinde ve incelenen diğer hemolenf örneklerinde aspartat ve glutamat tespit edilemedi. Hemolenfdeki toplam protein miktarının paralizasyondan ve parazitlenmeden önemli derecede etkilenmediği belirlendi.

Anahtar Sözcükler: *Bracon hebetor*, *Galleria mellonella*, amino asit, protein, paralizasyon, parazitizm

EFFECT OF PARASITOID *Bracon hebetor* SAY (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) ON AMINO ACIDS IN HEMOLYMPH OF HOST *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) LARVAE

ABSTRACT

Changes in free amino acids and total protein amounts in hemolymph of *Galleria mellonella* larvae paralyzed and/or parasitized by parasitoid *Bracon hebetor* were investigated. The successive stock cultures of parasitoid and host were carried on laboratory at $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5\%$ RH and 16:8 (L:D) photoperiod conditions. Host hemolymph samples used in amino acid analysis were collected from two groups of larva. In the first group, host larvae were only paralyzed by female parasitoids without laying eggs on their body (P1). In the second group, host larvae not only paralyzed by female parasitoids but also eggs were laid on their body (P2). Hemolymph samples from P1 group were collected at six hours intervals, of P2 group from the beginning of larval period at 24 hours intervals, up to 72 hours. Hemolymph samples obtained from unparalyzed host larvae were used as control group. Amino acid analysis were carried out with HPLC and total protein analysis were done according to the method of Lowry.

In all analysed hemolymph samples 17 free amino acids were determined. Among the 17 amino acids, proline has the highest concentration in all samples. In paralyzed (P1) larvae, it has been determined that percentages of proline, phenylalanine and threonine were increased whereas serine, alanine and asparagine were obviously decreased but valine, leucine, isoleucine, histidine, tryptophan, lysine, tyrosine, methionine, arginine and glycine+glutamine percentages were not changed significantly. In parasitized (P2) hosts, it has been confirmed that percentage of proline, phenylalanine, tyrosine were increased whereas glycine+glutamine, arginine, asparagine, lysine were decreased but there was no change in percentages of valine, histidine, leucine, isoleucine, tryptophan, methionine, alanine, serine and threonine. Aspartate and glutamate was not detected in hemolymph of the control group of larvae and examined other hemolymph samples. Total protein amounts in hemolymph were effected with neither paralysis nor parasitization.

Key Words: *Bracon hebetor*, *Galleria mellonella*, amino acid, protein, paralysis, parasitism

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde yardımcı olan, çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen, fikirleriyle çalışmalarına yön veren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Adem GÜLEL'e teşekkür ederim.

Tez izleme komitemde bulunan ve çalışmalarım süresince beni yönlendiren hocalarım Sayın Prof. Dr. Veysel KARTAL ve Sayın Prof. Dr. Halil KORKMAZ'a,

Amino asit analizlerinde HPLC'nın kullanılmasına izin veren, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi yetkililerine, HPLC analizleri sırasında bana destek veren sayın Doç. Dr. Olga SAK, Yrd. Doç. Dr. Serdar SAK, Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN, Doç. Dr. Ekrem ERGİN ve Arş. Grv. Hülya ALTUNTAŞ'a

Çalışmalarım sırasında tez projeme destek veren Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na,

Her türlü desteklerinden dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Eylem AKMAN GÜNDÜZ'e, Biyoloji Bölümü öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine, şuanda görev yaptığım SASKİ İçme Suyu Arıtma Tesisi Daire Başkanı Hamdi ÇEKİÇ ve çalışma arkadaşlarıma, destek ve teşviklerini esirgemeyen sevgili annem ve babama, sabırlarından dolayı eşim ve biricik oğluma teşekkür ederim.

Özgür VARER İŞİTAN

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	6
2.1. Parazitoitler	6
2.1.1. <i>Bracon hebetor</i>	9
2.2. Konak Hemolenfi	10
2.2.1. Protein	12
2.2.2. Amino Asitler	14
2.3. Parazitizm	16
2.4. Gelişen Parazitoidin Etkisi	18
2.5. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi	21
2. 6. Lambert-Beer kanunu	23
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	24
3.1. Konak Kültürlerinin Kurulması	24
3.2. Parazitoit Kültürlerinin Kurulması	25
3.3. Hemolenf Örneklerinin Alınması	25
3.3.1. Paralize Olan (P1) Konak Larvalarından Hemolenf Örneklerinin Alınması	25
3.3.2. Parazitlenmiş ve Üzerinde Parazitoit Larvaları Gelişen Konaklardan (P2) Hemolenf Örneklerinin Alınması	26
3.4. HPLC Tekniği ile Amino Asit Analizi	27
3.4.1. Analizlerde Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	27
3.4.2. Örneklerin HPLC’de Analiz için Hazırlanması ve Fenilisotiyosiyanat ile Türevlendirme	28
3.4.3. Kromatografik Prosedür	29
3.5. Elde Edilen Kromatogramların Değerlendirilmesi	30
3.6. Toplam Protein Analizi	30
3.7. Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	31
4. BULGULAR	32
4.1. Standart Amino Asitlere Ait Bulgular	32
4.2. Paralize Olan Konak Larvalarından Alınan Hemolenf Örneklerine Ait Bulgular	32
4.2.1. Amino Asit Analizi ile İlgili Bulgular	32
4.2.1.1. Paralizasyondan Sonra Miktarlarında Önemli Değişiklikler Olan Amino Asitler	39
4.2.1.2. Paralizasyondan Sonra Miktarlarında Önemli Değişiklikler Olmayan Amino Asitler	42
4.2.2. Toplam Protein Analizi ile İlgili Bulgular	48
4.3. Parazitlenmiş ve Üzerinde Parazitoit Larvaları Gelişen Konaklardan Alınan Hemolenf Örneklerine Ait Bulgular	49
4.3.1. Amino Asit Analizi ile İlgili Bulgular	49
4.3.1.1. Parazitlendikten Sonra Miktarlarında Önemli Değişiklikler Olan Amino Asitler	49
4.3.1.2. Parazitlendikten Sonra Miktarlarında Önemli Değişiklikler Olmayan Amino Asitler	57
4.3.2. Toplam Protein Analizi ile İlgili Bulgular	62
5. TARTIŞMA	63
5.1. Paralizasyon ve parazitlenmenin konak hemolenfindeki serbest amino asitler üzerine etkisi	67

5.2. Paralizasyon ve parazitlenmenin konak hemolenfindeki toplam protein miktarına etkisi	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
7. KAYNAKLAR	76
8. ÖZGEÇMİŞ	87

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

Ala: Alanin

Arg: Arjinin

Asn: Asparajin

Asp: Aspartat

Gln/Gly: Glutamin/Glisin

Glu: Glutamat

His: Histidin

HPLC: Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi

Ile: İzolösin

Leu: Lösin

Lys: Lizin

Met: Metiyonin

Phe: Fenilalanin

PITC: Fenilisotiyosiyanat

Pro: Prolin

P1 Grubu: Paralize olan konak larvaları

P2 Grubu: Parazitlenmiş ve üzerinde parazitoit larvaları gelişen konak larvaları

Ser: Serin

TEA: Trietilamin

Thr: Treonin

Trp: Triptofan

Try: Tirozin

Val: Valin

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Yüksek basınç sıvı kromatografi	22
Şekil 2.2. PITC ile amino asit türevlendirme reaksiyonu	23
Şekil 3.1. <i>Bracon hebetor</i> erginlerinde dişi (a) ve erkek (b) bireyin ventralden, <i>G. mellonella</i> 'da ergin bireyin (c) ve olgun larvanın (d) dorsalden görünüşü	25
Şekil 3.2. Standart protein grafiği	30
Şekil 4.1. Standart amino asitler karışımının kromatogramı	33
Şekil 4.2. Parazitlenmemiş konak, <i>G. mellonella</i> , larvasının hemolenfindeki serbest amino asitlere ait kromatogram	34
Şekil 4.3. Paralizasyondan yirmi dört saat sonra konak, <i>G. mellonella</i> , larvasının hemolenfindeki serbest amino asitlere ait kromatogram	35
Şekil 4.4. Paralizasyondan kırk sekiz saat sonra konak, <i>G. mellonella</i> , larvasının hemolenfindeki serbest amino asitlere ait kromatogram	36
Şekil 4.5. Paralizasyondan yetmiş iki saat sonra konak, <i>G. mellonella</i> , larvasının hemolenfindeki serbest amino asitlere ait kromatogram	37
Şekil 4.6. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki prolin yüzdesinin değişimi	40
Şekil 4.7. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki serin yüzdesinin değişimi	40
Şekil 4.8. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki alanin yüzdesinin değişimi	41
Şekil 4.9. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki fenilalanin yüzdesinin değişimi	41
Şekil 4.10. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki asparajin yüzdesinin değişimi	42
Şekil 4.11. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki treonin yüzdesinin değişimi	42
Şekil 4.12. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki valin yüzdesinin değişimi	43
Şekil 4.13. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki lösin yüzdesinin değişimi	43
Şekil 4.14. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki izolösin yüzdesinin değişimi	44

Şekil 4.15. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki histidin yüzdesinin değişimi	45
Şekil 4.16. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki triptofan yüzdesinin değişimi	45
Şekil 4.17. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki lizin yüzdesinin değişimi	46
Şekil 4.18. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki tirozin yüzdesinin değişimi	46
Şekil 4.19. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki metiyonin yüzdesinin değişimi	47
Şekil 4.20. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki arjinin yüzdesinin değişimi	47
Şekil 4.21. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki toplam glutamin+glisin yüzdesinin değişimi	48
Şekil 4.22. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak <i>G. mellonella</i> hemolenfindeki toplam protein miktarındaki değişimler	48
Şekil 4.23. Parazitlendikten 24 saat sonra konak <i>G. mellonella</i> larvasının hemolenfindeki amino asitlere ait kromatogram	51
Şekil 4.24. Parazitlendikten 48 saat sonra konak <i>G. mellonella</i> larvasının hemolenfindeki amino asitlere ait kromatogram	52
Şekil 4.25. Parazitlendikten 72 saat sonra konak <i>G. mellonella</i> larvasının hemolenfindeki amino asitlere ait kromatogram	53
Şekil 4.26. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki prolin yüzdesinin değişimi	54
Şekil 4.27. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki glutamin+glisin yüzdesinin değişimi	54
Şekil 4.28. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki arjinin yüzdesinin değişimi	55
Şekil 4.29. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki asparajin yüzdesinin değişimi	55
Şekil 4.30. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki lizin yüzdesinin değişimi	56
Şekil 4.31. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak	

hemolenfindeki fenilalanin yüzdesinin değişimi	56
Şekil 4.32. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak	
hemolenfindeki tirozin yüzdesinin değişimi	57
Şekil 4.33. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak	
hemolenfindeki valin yüzdesinin değişimi	58
Şekil 4.34. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak	
hemolenfindeki histidin yüzdesinin değişimi	58
Şekil 4.35. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak	
hemolenfindeki lösin yüzdesinin değişimi	59
Şekil 4.36. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak	
hemolenfindeki izolösin yüzdesinin değişimi	59
Şekil 4.37. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak	
hemolenfindeki triptofan yüzdesinin değişimi	60
Şekil 4.38. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak	
hemolenfindeki metiyonin yüzdesinin değişimi	60
Şekil 4.39. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak	
hemolenfindeki alanin yüzdesinin değişimi	61
Şekil 4.40. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak	
hemolenfindeki serin yüzdesinin değişimi	61
Şekil 4.41. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak	
hemolenfindeki theronin yüzdesinin değişimi	62
Şekil 4.42. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak <i>G. mellonella</i>	
larvalarının hemolenfindeki toplam protein miktarındaki değişimler	62

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1. Analizlerde kullanılan kimyasallar	27
Çizelge 3.2. Amino asitlerin ayrımında uygulanan gradiyent programı	29
Çizelge 4.1. Standart amino asitlere ait alıkonma zamanları ve alan değerleri	32
Çizelge 4.2. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak <i>G. mellonella</i> larvasının hemolenfindeki serbest amino asitlerin yüzde değerleri	38
Çizelge 4.3. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak <i>G. mellonella</i> hemolenfinde serbest amino asitlerin yüzde değerleri	50

1. GİRİŞ:

Parazitoit-konak ilişkisi canlılar arasındaki değişik ikili yaşam şekillerinin bir tipini oluşturur. Bu ikili ilişkide parazitoit böcek, bir konak üzerinde veya içinde ergin öncesi gelişimini tamamlar ve sonunda konağı öldürür (Brodeur ve Boivin, 2004; Hance ve ark., 2007). Konak, parazitoit larvaları için uygun gelişme ortamını ve besin kaynağını oluştururken (Vinson ve Iwantsch, 1980; Ueno ve Ueno, 2007), parazitoidin konağa sağladığı bir yarar yoktur. Bu nedenle konak tür, parazitoit tür olmasa da varlığını sürdürebilir fakat parazitoit tür konak olmadan varlığını sürdüremez. Konaklar varlıklarını sürdürmek için parazitoitlere zorunlu olarak bağımlı olmadıkları için, ikili ilişkilerinin evrimsel gelişimi sırasında parazitoitlerine karşı çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Gross, 1993; Thomas ve Blanford, 2003; Renault ve ark., 2005). Buna karşılık parazitoitler de ergin öncesi gelişimlerinde zorunlu olarak konağa bağımlı olduklarından, evrimsel süreç içerisinde konağın savunma mekanizmalarını etkisiz hale getirmek için konak savunma tepkisini baskılayan (Lu ve ark., 2006), metabolizmasını ve gelişimini (Song ve ark., 2008) düzenleyen çeşitli stratejilere sahip olmuşlardır (Vinson, 1990; Schopf ve Nussbaumer, 1996; Côté ve ark., 2005; Schmidt ve ark., 2005). Bu stratejiler, konakla-parazitoidin etkileşim derecesine (Côté ve ark., 2005), parazitoidin idiyobiyont (ovipozisyondan sonra konağın gelişimine izin vermeyen), koinobiyont (ovipozisyondan sonra konağın gelişimine izin veren) (Harvey ve ark., 1999), soliter veya gregar olmasına bağlı olarak değişik türlerde büyük oranda değişiklik gösterir (Nakamatsu ve ark., 2001). Soliter parazitoitlerde larvalar sadece konaklarıyla, gregar olanlarda ise larvalar hem konaklarıyla hem de besin için beraber gelişim gösterdikleri diğer larvalarla mücadele ederler (Nakamatsu ve ark., 2001). Ektoparazitoit türler yumurtalarını konaklarının üzerine ya da yakınına bırakırlar. Bunların konaklarına enjekte ettikleri ve çoğunlukla zehir olarak tanımlanan maddeler, genellikle felçleştirici (paralitik) etkiye sahip olup konağın beslenme ve gelişiminin durmasına neden olur (Doury ve ark., 1997). Buna karşılık endoparazitoit türlerin konaklarına enjekte ettikleri zehir olarak tanımlanan maddeleri, çoğunlukla konakların bir süre beslenme ve gelişimine izin verirler. Endoparazitoitler konak içine yumurta bırakmadan önce veya yumurta bırakma sırasında konağa bıraktıkları kimyasallar sayesinde yumurtalarının ve bunlardan çıkacak larvalarının zarar görmesini önleyecek şekilde konağın savunma (immün) tepkisini

baskılar, konağı iyi bir besin kaynağı haline getirmek için konak metabolizmasında değişimlere yol açarlar (Quicke, 1997).

Parazitoitlerin, konak kimyasını, fizyolojisini ve hormonal durumunu etkileyebildiği ve konakta meydana gelen bu değişikliklerin parazitoidin larval gelişiminde ve hatta ergin döneminde önemli etkiler yaptığı bir çok araştırmacı tarafından tespit edilmiştir (Bischof ve Ortel, 1996; Alleyne ve ark., 1997; Alleyne ve Beckage, 1997; Bernstein ve ark., 2002; Nakamatsu ve Tanaka, 2003; Beckage ve Gelman, 2004; Nurulloğlu ve ark., 2004; Kaeslin ve ark., 2005; Rath ve Sinha, 2005; Ergin ve ark., 2006).

Parazitoitlerin konakta neden olduğu metabolik değişikliklerin ana nedeni, konağı, larvalarının gelişim döneminde besinsel açıdan uygun hale getirmeye yöneliktir (Alleyne ve ark., 1997; Doury ve ark., 1997; Brodeur ve Boivin, 2004; Côté ve ark., 2005; Salvador ve Côté, 2008). Konakta türe göre değişen parazitoid kaynaklı değişimlerin ya da patolojik anormalliklerin birçok nedeni olabilir. Bunlar arasında, yumurtlamadan önce veya yumurtlama sırasında konağa enjekte edilen parazitoid zehri, ovaryum proteinleri ve dişi parazitoidin kaliks sıvısında bulunan ve yumurtlama sırasında yumurtalarla birlikte konak içine transfer edilen simbiyotik virüsler (örn. Polidnavirüsler) ve parazitoid embriyosunu saran serozal zardan ayrılan ve yumurtanın açılmasından sonra konak hemosölünün içine dağılan teratositler sayılabilir (Pennacchio ve ark., 1994; Alleyne ve ark., 1997; Zhang ve ark., 1997; Nakamatsu ve ark., 2001; Beckage ve Gelman, 2004; Nurulloğlu ve ark., 2004; Côté ve ark., 2005; Kaeslin ve ark., 2005; Moreau ve Guillot, 2005; Richards ve ark., 2005; Schmidt ve ark., 2005; Côté ve ark., 2007; Song ve ark., 2008).

Braconid endoparazitoitlerin konak fizyolojisine etkisi ile ilgili bir çok çalışma vardır (Thompson ve ark., 1990; Bischof ve Ortel, 1996; Nakamatsu ve ark., 2001; Côté ve Vinson, 2004; Nakamatsu ve Tanaka, 2004; Salvador ve Côté, 2008). *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) ile yapılan çalışmada konak hemolenfindeki karbohidrat, lipit ve protein miktarlarının, konakta gelişen endoparazitoit *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae) larva sayısı ile ilişkili olduğu, konak içerisinde gelişen parazitoid larvalarının sayısı arttığı zaman, konaktaki yağ doku ve trehaloz miktarının larval gelişim süresine bağlı olarak azaldığı tayin edilmiştir (Nakamatsu ve Tanaka, 2004).

Nakamatsu ve ark. (2001) *C. kariyai* tarafından parazitlenmiş *P. separata* larvalarının hemolenfindeki protein konsantrasyonunda meydana gelen değişimleri, parazitlenmemiş sadece *C. kariyai* kaliks sıvısı ve zehiri enjekte edilmiş konaklardaki değişimlerle karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak parazitlenmemiş fakat kaliks sıvısı ve zehir enjekte edilmiş larvaların hemolenfindeki protein konsantrasyonunun, önce düştüğünü fakat enjeksiyondan 9-10 gün sonra kontrolle aynı seviyeye ulaştığını, buna karşılık parazitlenmiş konakların protein konsantrasyonunun önemli derecede düştüğünü ve bir daha artmadığını tespit etmişlerdir.

Salvador ve Cönsoli (2008), endoparazitoit *C. flavipes* tarafından parazitlenen *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvalarının hemolenfinde parazitlenmeden hemen sonra belirli konak proteinlerinin ekspresyonunda ve parazitizme özel proteinlerin sentezinde bir artış olduğunu, buna karşın parazitlenmiş larvalardaki toplam protein konsantrasyonunda azalma meydana geldiğini belirlemişlerdir. Thompson ve ark. (1990) *C. congregata* tarafından parazitlenmiş *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) larvalarının hemolenfinde serbest amino asit seviyesinin düştüğünü tespit etmişlerdir.

Bischof ve Ortel (1996) *Glyptapanteles liparidis* (Hymenoptera: Braconidae) tarafından parazitlenen *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvalarının vücut dokularında toplam protein miktarının düştüğünü, hemolenfdeki toplam protein konsantrasyonunun yaklaşık olarak iki katına çıktığını, hemolenfindeki toplam amino asit miktarında azalma olmasına rağmen, parazitlenmenin her amino asitin miktarına etkisinin farklı olduğunu bu nedenle bazı amino asitlerin miktarının arttığını, bazılarının azaldığını, bazılarında ise önemli bir değişimin olmadığını ifade etmişlerdir. Söz konusu çalışmada parazitlenen larvalarda alanin ve histidinin miktarlarının önemli bir değişme göstermediği, sistein ve valin miktarlarının önemli ölçüde azaldığı buna karşılık izolösin, ornitin, asparajin ve glutamin miktarlarının arttığı belirtilmiştir.

Toxoneuron nigriceps (Hymenoptera: Braconidae) tarafından parazitlenen *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarında, parazitoidin embriyonik gelişimi sırasında konak hemolenfindeki toplam serbest amino asit miktarının önemli derecede etkilendiği, serbest amino asitlerden lizin, valin, treonin, arjinin, asparajin, izolösin ve fenilalaninin, parazitlenmeden iki saat sonra önemli derecede azaldığı, parazitlenmiş konaktaki toplam amino asit konsantrasyonunun embriyonik gelişimin süresine bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada parazitlenmeden sonraki

ilk 10-12. saatlerde konağın hemolenfindeki prolin, glisin, serin, histidin ve asparajinin arttığı, treoninin ise azaldığı ifade edilmiştir (Cônsoi ve Vinson, 2004).

Endoparazitlerin aksine, ektoparazit türlerin konaklarının protein ve amino asit profilleri üzerine etkileri hakkındaki bilgiler çok sınırlıdır (Quistad ve ark., 1994; Doury ve ark., 1997; Altuntaş ve ark., 2010). Deneysel olarak ektoparazit *Euplectrus plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) zehiri enjekte edilen veya doğrudan doğruya parazit tarafından parazitlenen *P. separata* larvalarında hemolenf ve yağ dokudaki protein miktarındaki değişimler karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Parazitlenmiş veya deneysel olarak zehir enjekte edilmiş larvaların hemolenfindeki protein konsantrasyonunun yavaş yavaş arttığı, yağ dokudaki protein konsantrasyonunda önemli bir değişimin olmadığı, parazit larvalarının protein konsantrasyonunun konağın parazitlenmesinden sonraki 7. günde maksimum seviyeye ulaştığı ve daha sonra azaldığı tespit edilmiştir (Nakamatsu ve Tanaka, 2003).

Ektoparazit *Bracon hebetor* Say 1836 (Hymenoptera: Braconidae) zehiri, birçok Lepidopter larvasında etkilidir (Quistad ve ark., 1994). *Bracon hebetor* zehirinin *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarında oksijen tüketiminde önemli bir azalmaya neden olduğu, oksijen tüketimindeki azalmanın, zehir solusyonu enjekte edilerek paralizlenen larvalardan daha fazla olduğu, parazitlenen ve zehir solusyonu enjekte edilen larvalardaki farkın ergin parazitlerin enjekte ettikleri zehirde ek faktörlerin bulunmasından kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Waller, 1965).

Hartzer ve ark. (2005) *B. hebetor* erginlerinin ve larvalarının *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarında hem fizyolojik hem de immünolojik düzeyde değişimlere neden olabildiklerini göstermişlerdir. Dişi zehirinin konak larvalarında fizyolojik olarak neden olduğu en göze çarpan durum konağın paralize olmasıdır. Bu paralizis hali sinir kas kontrolünün kaybından ortaya çıkar. Dişi *B. hebetor* zehrinin konak larvalarında immünolojik düzeyde neden olduğu önemli bir durum, konak hemolenfindeki fenoloksidaz aktivitesini artırmasıdır. Fenoloksidaz aktivitesindeki artışın, konakta mikrobiyal enfeksiyonu baskılamaya yardımcı olarak konak larvasının besin değerini koruduğu ileri sürülmüştür. Dişi zehirinin aksine konakta gelişmekte olan parazit larvaları, konağın fenoloksidaz aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır. Parazit larvalarının gelişimi süresince fenoloksidaz aktivitesinin düştüğü ve bu düşüşün parazit larvaları tarafından konağa salgılanan bir immün baskılayıcıdan kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Hartzer ve ark., 2005).

Baker ve Fabrick (2000), *B. hebetor* tarafından parazitlenen *P. interpunctella* larvalarının hemolenf proteinlerinde parazitlenmeyi takip eden 72 saat içinde kalitatif ve kantitatif bir değişimin olmadığını tespit etmişlerdir. Buna karşılık Altuntaş ve ark. (2010), *B. hebetor* tarafından parazitlenen *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarının hemolenfindeki bazı proteinlerin miktarının parazitlenmeden 24 ve 48 saat sonra giderek azaldığını bazılarının arttığını ileri sürmüşlerdir.

Galleria mellonella kovan ürünlerine zarar veren bir türdür (Gülel, 1982), dolayısıyla bal arıları için önemli bir zararlıdır (Coşkun ve ark., 2006). Bu türün larvaları bal arıları tarafından üretilen bal, polen ve bal mumu ile beslenirler (Coşkun ve ark., 2006). Soğuğa maruz bırakılan bu zararlının hemolenfindeki serbest primer amino asit kompozisyonundaki değişimler Hanzal ve Jegerov (1991) tarafından incelenmiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak 30°C de yetiştirilen larvalar, yedi gün boyunca 15°C’de, yedi gün boyunca 10°C’de, beşer gün boyunca sırasıyla 15, 10, 5 ve 0°C de ve üç saat 0°C da tutulan larvalar kullanılmış, sıcaklık düştükçe larvadaki toplam amino asit içeriğinin devamlı arttığı, buna karşılık her amino asitin miktarındaki değişimin amino asit çeşidine ve düşük sıcaklığa maruz kalma süresine bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir (Hanzal ve Jegerov, 1991).

Bracon hebetor ile ilgili yaptığımız literatür araştırmasında konak çeşitlerinin ve evresinin, parazitoidin ergin öncesi gelişim süresine (Gündüz ve Gülel, 2005), verimine (Gülbüz ve Aksoylar, 2006), ergin hayat uzunluğuna (Gündüz ve Gülel, 2004), ölüm oranına, farklı eşeylerin gelişim hızına ve vücut büyüklüğüne (Milonas, 2005), toplam protein, lipid ve glikojen miktarına (Gündüz ve ark., 2008) etkilerinin yeteri kadar araştırıldığı tespit edilmiştir. Buna karşılık söz konusu parazitoidin, konak hemolenfine olan etkisiyle ilgili çalışmaların daha çok konak protein miktarı (Baker ve Fabrick, 2000; Altuntaş ve ark., 2010) ve bazı enzimler üzerine yoğunlaştığı (Hartzer ve ark., 2005), parazitlenmeden sonra geçen sürenin ve gelişmekte olan parazitoit larvalarının konak hemolenfindeki amino asitlerinin çeşit ve miktarına etkisinin ele alınmadığı görülmüştür. Bu nedenle bu çalışmada böceklerdeki amino asit metabolizmasıyla ilgili bulgulara, parazitoit-konak besinsel ilişkilerinin ve parazitoit-konak etkileşimlerinin değerlendirilmesine katkıda bulunmak için, parazitlenmeden sonra geçen süreye ve parazitoit larval gelişimine bağlı olarak konak hemolenfindeki toplam protein miktarı ile amino asitlerinin çeşit ve miktarında ortaya çıkan değişikliklerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Parazitoitler

Parazitoitler bir konak üzerinde veya içinde ergin öncesi gelişimlerini tamamlayan ve sonunda konağı öldüren, ergin evrede serbest olarak yaşayan böceklerdir (Thompson ve Lee, 1993; Godfray, 1994; Takasu ve ark., 1997). Parazitoitler, Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Trichoptera, Neuroptera ve Strepsiptera takımlarına ait olabilir. Fakat parazitoit türlerinin %80'i Hymenoptera takımında yer alır (Quicke, 1997; Brodeur ve Boivin, 2004; Pennacchio ve Strand, 2006).

Tüm parazitoitler holometabol olup, yaşam döngülerinde, yumurta, larva, pup ve ergin evresi olmak üzere dört evre bulunur. Yumurtadan çıkan parazitoit larvası, konak üzerinde veya içinde konağın hemolenf ve organları ile beslenerek gelişir, sonunda pup olur ve ergin olarak çıkar (Godfray, 1994; Quicke, 1997).

Parazitoitler değişik özellikleri dikkate alınarak;

1-Yumurtalarını bıraktıkları konağın evresine göre yumurta, larva, prepup, pup ya da ergin parazitoitleri olarak,

2-Yumurtalarını konakta bıraktıkları yere göre ektoparazitoitler (yumurtalarını konağın üzerine veya yanına bırakanlar) ve endoparazitoitler (yumurtalarını konağın içine bırakanlar) olarak (Vinson, 1990; Godfray, 1994; Quicke, 1997; Takasu ve ark., 1997),

3-Yumurta bırakırken konağı etkileme durumlarına göre koinobiont (ovipozisyonundan sonra konağın gelişimine izin veren) ve idiobiont (ovipozisyonundan önce konağı öldüren veya felç eden) parazitoitler olarak (Gross, 1993; Godfray, 1994; Quicke, 1997; Vinson, 1998; Brodeur ve Boivin, 2004),

4-Bir konak üzerinde veya içinde gelişen parazitoit sayısına göre gregar (aynı konakta birden fazla parazitoitin gelişmesi) ve soliter (bir konakta sadece bir parazitoitin gelişmesi) olarak gruplandırılabilirler.

Konak-parazitoit ilişkisinin ortaya çıktığı evrimsel süreç içinde konaklar parazitoitlerine karşı tepkisiz kalmamıştır. Kendilerini parazitleyen parazitoitlere karşı vücutları içinde ve dışında değişik savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Gross, 1993; Thomas ve Blanford, 2003; Renault ve ark., 2005). Konak böceklerin parazitoitlere karşı geliştirdikleri savunma mekanizmalarından birisini antimikrobiyal

peptitlerin / proteinlerin sentezi, fenoloksidaz öncülüğünde bir seri enzimle katalizlenen melanizasyonun tetiklenmesi gibi birkaç olayı kapsayan humoral reaksiyonlar oluşturur (Carton ve Nappi, 1997; Cho ve ark., 1999; Park ve ark., 2005; Abdel-latif ve Hilker, 2008; Asgari ve Rivers, 2011). Böceklerde bilinen antimikrobiyal peptidlere/proteinlere örnek olarak lizozimler, sekropinler ve attasinler verilebilir (Carton ve Nappi, 1997; Chung ve Ourth, 2000; Abdel-latif ve Hilker, 2008). Böcek hemolenfinde düşük seviyede bulunan bu antimikrobiyal proteinlerin miktarlarının bakteriyal enfeksiyondan sonra arttığı tespit edilmiştir (Carton ve Nappi, 1997; Chung ve Ourth, 2000; Park ve ark., 2005). *Galleria mellonella* larvalarının immün tepkisinde, hemolenfte lizozim ve sekropin-benzeri bazı özel moleküllerin belirgin bir şekilde arttığı ifade edilmiştir (Fröblius ve ark., 2000).

Konak böceklerin parazitoitlere karşı geliştirdikleri hücresel savunma mekanizmalarında fagositoz, mikroagregasyon, nodul oluşumu ve kapsülasyon (kapsülleme) önemli rol oynar (Hayakawa, 1994; Cho ve ark., 1999; Park ve ark., 2005; Lu ve ark., 2006; Abdel-latif ve Hilker, 2008). Endoparazitoit türler için tehlike oluşturan kapsülasyon, konak hemolenfinde bulunan hemositler tarafından oluşturulan bir olaydır (Carton ve Nappi, 1997; Lu ve ark., 2006). Kapsülleme olayı, konak içine bırakılan parazitoit yumurtası veya bu yumurtadan çıkan parazitoit larvası yüzeyine hemositlerin yapışmasıyla başlar (Hayakawa, 1994; Cho ve ark., 1999; Schmidt ve ark., 2001; Asgari, 2006; Strand ve Casas, 2007; Uçkan ve ark., 2010). Daha sonra hemositler birbirlerine yapışarak hedef etrafında hücre katmanlarının üst üste oluşturduğu düz bir kapsül veya koza şeklinde bir yapı oluştururlar (Schmidt ve ark., 2001). Kapsül oluştuktan sonra en içte bulunan kapsül hücreleri, tirozin veya dopa gibi fenollerin oksidasyon ve polimerizasyonu sonucu melanize olarak koyulaşıp sertleşirler (Quicke, 1997) ve sonunda kapsüllenmiş organizma ölür (Uçkan ve ark., 2010).

Evrimsel süreç içinde parazitoitler de kendilerine karşı savunma mekanizmaları geliştiren konaklara karşı tepkisiz kalmamış ve konaklarının savunma mekanizmalarını etkisiz hale getirmek için aktif veya pasif savunma stratejileri geliştirmişlerdir (Pennacchio ve ark., 2003; Brodeur ve Boivin, 2004; Abdel-latif ve Hilker, 2008; Asgari ve Rivers, 2011). Parazitoitlerin pasif stratejileri arasında, fonksiyonel bir bağışıklık sisteminin bulunmadığı konak evrelerine yumurta bırakma, konak dışında gelişme, konak bağışıklık hücrelerinin ulaşamayacağı noktalara yumurta bırakma (Pennacchio ve ark., 2003; Pennacchio ve Strand, 2006) ve yabancı olarak tanınmayı

engelleyecek yüzey yapıları geliştirme sayılabilir (Asgari, 2006; Lu ve ark., 2006; Pennacchio ve Strand, 2006). Aktif savunma stratejilerine de konak hemositlerinin apoptozisine neden olma ve konak hemosit fonksiyonunu bozma örnek teşkil eder (Pennacchio ve ark., 2003).

Konağın dış tarafına yumurtalarını bırakan ektoparazitoidlerde yumurtaların konak tarafından kapsüllenme riski yoktur fakat konaktan düşme riski vardır. Ektoparazitoid türlerin dişileri bu riski önlemek için yumurta bırakmadan önce konağı hareketsiz kalacak şekilde felçleştirirler (paralize ederler). Felçleştirmeyi ovipozitörleriyle konağa enjekte ettikleri madde(ler) ile yaparlar (Quistad ve ark., 1994; Asgari, 2006). Böylelikle konağın kendilerine karşı tepkisini önemli derecede önlemiş olurlar. Fakat yumurtadan çıkan ektoparazitoid larvalarının ağızlarından salgıladıkları proteazlar yoluyla konak kutikulasında meydana getirdikleri hasarlar, paralize olan konakta bağışıklık sisteminin birkaç elemanını aktive ederek bir tepkiye neden olabilir (Schmidt ve ark., 2001; Pennacchio ve ark., 2003).

Endoparazitoidler yumurta bırakmadan kısa süre önce veya yumurta bırakmaları sırasında konağa enjekte ettikleri madde(ler) veya virüsler ile konağın bağışıklık sistemini ve kapsül oluşturma şeklindeki savunma mekanizmasını baskılamaya çalışırlar (Carton ve Nappi, 1997; Shelby ve ark., 2000; Schmidt ve ark., 2001; Asgari, 2006; Barandoc ve Kim, 2009; Asgari ve Rivers, 2011). Endoparazitoidlerin konağa enjekte ettikleri madde(ler) veya virüslere, değişik kimyasal kompozisyondaki zehirler, ovaryum proteinleri, yumurta yüzeyi elemanları ve polidnavirüsleri örnek olarak verilebilir (Schmidt ve ark., 2001; Richards ve ark., 2005; Lu ve ark., 2006). Zehirler çoğunlukla protein(ler) içeren kompleks bir karışımdır. Hymenopter parazitoidlerin zehirleri dişi üreme sistemiyle ilişkili özelleşmiş bezlerde üretilir (Asgari, 2006). Konak dokularında replike olan polidnavirüsleri özellikle hemositleri ve yağ dokuyu hedef alarak (Pennacchio ve Strand, 2006; Lee ve Kim, 2008) konakta fizyolojik, immünolojik ve gelişimsel değişikliklere yol açarak endoparazitoidin gelişimine yardımcı olurlar (Asgari, 2006; Barandoc ve Kim, 2009). Bazı polidnavirüs genleri, hemositlerin hücre iskeletinde değişikliğe neden olarak ya da hemosit apoptozisini artırarak immün sistemin baskılanmasına yardımcı olurlar (Lee ve Kim, 2008; Asgari ve Rivers, 2011).

2.1.1. *Bracon hebetor*

Lepidoptera takımının değişik türlerine ait larvaları konak olarak kullanan *B. hebetor*, gregar, idiobiont, bir larval ektoparazitoittir (Benson, 1973; Heimpel ve ark., 1997; Baker ve Fabrick, 2000; Darwish ve ark., 2003). Ergin dişi parazitoitler antenlerindeki kemoreseptörleri sayesinde konak larvalarını bulur. Hem konak hemolenfinden yararlanmak ve hem de konak üzerine yumurtalarını bırakmak için ovipozitorü ile konağın derisini iki-üç kez deler. Bu delme sırasında konak larvasına zehir enjekte eder. Ovipozitörün bir batırma süresi genellikle 2-3 dakika sürer (Dweck ve ark., 2008). Zehirin enjekte edilmesinden birkaç dakika sonra konakta kalp ve bağırsak kaslarının fonksiyona devam ettiği bir felç hali meydana gelir (Vinson ve Iwantsch, 1980; Quistad ve ark., 1994; Moreau ve Guillot, 2005).

Dişi parazitoit, paralize olmuş konak larvası üzerine yumurtalarını bırakır. Dabbağöğlü (2004), 25°C sıcaklıkta *B. hebetor*'un kuluçka süresinin ortalama 32.8 ± 1.4 saat olduğunu belirtmiştir. Yumurtadan çıkan parazitoit larvaları, ağızlarından salgıladıkları proteazlar yoluyla konak kutikulasında açtıkları deliklerden larval gelişim süresince önce konak hemolenfi ile, sonra konak dokuları ile beslenirler (Ueno, 1999; Bezemer ve ark., 2005). Beslenme sayesinde ihtiyaç duydukları bazı kimyasalları, mineral maddeleri, tuzları ve vitaminleri konaktan elde ederler. Konaktan alınan besinin kalite ve kantitesi parazitoidin yaşam döngüsünü önemli derecede etkiler (Jervis ve ark., 1992; Gül ve Gülel, 1995; Sarıkaya ve Gülel, 2004).

Böcekler de diğer canlılar gibi öncelikle ihtiyaç duydukları proteinleri sentezlemek ve kısmen de enerji elde etmek için amino asit kaynaklarına ihtiyaç duyarlar. Böcekler bu ihtiyaçlarını aldıkları besinlerden karşılarlar. Besinler ayrıca enerji elde etmede çoğunlukla öncelikli olarak kullanılan karbohidratları ve lipitleri de sağlarlar. Böceklerin farklı türleri, gerekli enerji ihtiyaçlarını karşılamak için karbohidratların, lipitlerin ve proteinlerin son derece farklı kombinasyonlarını kullanacak şekilde evrimleşmişlerdir. Böceklerin kalitatif ve kantitatif besinsel ihtiyaçları türlere, gelişmeye, böceğin hayat dönemine, büyümeye, üremeye, varsa diyapoz ve göçe bağlı olarak değişebilir. Böcek larvalarında, erken larva evrelerindeki protein ihtiyacı geç evrelere göre daha fazladır. Geç larva evrelerinde, hayatta kalma, üreme ve gelişim için lipitler daha fazla önemli olmaktadır (Genç, 2006). Böceklerde erginler daha fazla karbohidrat ve az miktarda proteinli besinlere ihtiyaç duyarlar (Bauerfeind ve Fischer, 2005). Böceklerin kalitatif ve kantitatif besinsel ihtiyaçları türlere göre de

değişmektedir. Predatör böcekler, karbohidratlarla ilişkili amino asitlere büyük oranda ihtiyaç duyarken, Orthoptera, Coleoptera ve Lepidoptera ordolarına dahil fitofaj türler genellikle, eşit miktarda protein, amino asit ve karbohidratlara gereksinim duyarlar. Floem ile veya hububat ile beslenen türler genellikle yüksek oranda karbohidratlara ihtiyaç duyarlar (Genç, 2006).

Yumurtadan çıkan parazitoit larvasının kullanabileceği tek besin kaynağı konaktır (Ueno, 1999; Bezemer ve ark., 2005; Hausmann ve ark., 2005). Larva konakta beslenerek gelişimini tamamlar ve sonunda erginleşir. Böceklerin bazı türleri ergin evrede beslenmezler. Ergin evrede beslenemeyen türlerde uçuş ve üreme gibi faaliyetler için ihtiyaç duyulan enerjinin büyük bir kısmı genel olarak son larval evrede yağ dokuda depolanan besin rezervlerinden karşılanır (Anand ve Lorenz, 2008). Bunun aksine ergin evrede beslenen türler larval evrede depoladıkları enerji kaynaklarını kullanmak zorunda değildir. Ergin evrede beslenen parazitoit türleri, ovipozitorleri ile konak vücudunda açtıkları deliklerden çıkan konak hemolenfi ile beslenebildikleri gibi (Jervis ve ark., 1992), bal, nektar ve bitki özsuğu gibi konak dışı besinler ile de beslenebilirler (Fadamiro ve Heimpel, 2001; Hausmann ve ark., 2005; Bianchi ve Wäckers, 2008; Wu ve ark., 2008; Wyckhuys ve ark., 2008).

2.2. Konak hemolenfi

Böcek hemolenfi, vücut boşluğunu (hemosolü) dolduran hücre dışı (ekstrasellüler) dolaşım sıvısı olarak tanımlanır. Hemolenfte bulunan hemositler, dorsal kalp ile ilişkili olan perikardiyal hücreler ve yağ doku hücrelerinin oluşturduğu topluluklar hariç, vücut dokuları hemolenf ile direk olarak temas etmezler (Mullins, 1985; Thompson, 2003).

Böcekler için gerekli olan birçok materyalin depolanmasında görev alan hemolenf ayrıca metabolitlerin, çözünmüş besin ve boşaltım maddelerinin, hemositlerin, düzenleyici faktörlerin ve özelleşmiş taşıyıcıların taşınmasında, hidrostatik basınçta, termoregülasyonda, donmadan korunmada ve savunmada da önemli rol oynar (Mullins, 1985). Hemolenfin solut konsantrasyonları böcek türleri arasında oldukça farklıdır. Fakat tüm türlerde tipik olarak hemolenfin fazla miktarda organik fosfat ve amino asit, az miktarda inorganik madde içerdiği tespit edilmiştir (Mullins, 1985).

Karbohidratlar hemen hemen tüm canlılarda enerji ve karbon kaynağı olarak ilk başvuru organik maddelerdir. Bunlar kolaylıkla birbirine dönüştürülebildiklerinden

hayvanlar için esansiyel değildir (Genç, 2006). Böcekler besinleriyle aldıkları karbohidratları monosakkaritlere hidrolize ederek fazlasını trehaloz ya da glikojen olarak depolarlar (Nicolson, 1998; Klowden, 2007; Arrese ve Soulages, 2010). Böcekler glikoneogenezis ile karbohidrat sentezleyebildikleri halde besinlerinde karbohidratlara gereksinim duyarlar (Behmer, 2006). Omurgalılarla karşılaştırıldığında, böcek hemolenfindeki toplam karbohidrat içeriğinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Böcek hemolenfinde bulunan en tipik karbohidrat bir disakkarit olan trehalozdur (α -D-glikoprinozil-[1,1]- α -D-glikoprinozit) (Florkin ve Jeuniaux, 1964; Mullins, 1985; Xu ve ark., 2009). Hemolenfteki trehaloz miktarı gelişim evresine, çevresel ve besinsel şartlara bağlı olarak değişebilmektedir (Thompson, 2003). Örneğin *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae)'nın larva evresinde hemolenfde trehaloz tespit edilememiş, pup evresinde düşük düzeyde ve erginlerde yüksek düzeyde tespit edilmiştir (Evans ve Dethier, 1957). Benzer şekilde, *Celerio euphorbiae* (Lepidoptera: Sphingidae) hemolenfinde trehaloz larval beslenme durduğunda ortaya çıkmıştır (Wyatt, 1961; Mochnacka ve Petryszyn (1959)'den). Trehaloz birçok organizmada karbon ve enerji kaynağı olarak görev alır. Ayrıca çeşitli stres şartları altında trehaloz, proteinleri ve hücrel membranları inaktivasyon ya da denatürasyondan koruyabilir (Xu ve ark., 2009). Birçok böceğin hemolenfinde genellikle düşük seviyelerde glukoz ve glikojen tespit edilmiştir (Florkin ve Jeuniaux, 1964; Mullins, 1985).

Yüksek organizasyonlu hayvanlarda olduğu gibi böceklerde de enerji rezervi olarak kullanılan glikojen, genellikle yağ doku (Strand ve Casas, 2007) ve uçuş kaslarında depolanır. Böceğin besininin kalitatif ve kantitatif özellikleri glikojenin depolanma düzeyini önemli derecede etkiler (Sharma ve Sharma, 1980). Böcek hemolenfinde tespit edilen diğer monosakkaritler arabinoz, fruktoz, fukoz, galaktoz, mannoz, riboz ve disakkaritler sellobiyoz, maltoz ve sukrozdur. Bunlara ilave olarak hemolenfte bazı karbohidratlar veya türevleri de (*N*-asetilgalaktozamin, *N*-asetilglukozamin, β -glikozil-*O*-tirozin, glukoronik asit ve inositol) bulunabilir (Mullins, 1985). Hemolenfte yaygın olarak bulunan trehalozun başlıca sentez bölgesi yağ dokusudur (Thompson, 2003; Strand ve Casas, 2007). Hemolenfte bulunan glukoz yağ doku tarafından trehaloza dönüştürülür veya glukoz yağ dokuda glikojen olarak depolanır (Mullins, 1985).

Hemolenfte %1.5 ve %5.5 arasında bulunan toplam lipit miktarı (Florkin ve Jeuniaux, 1964), kas aktivitesi, gelişim, açlık gibi birçok duruma bağlı olarak değişir

(Mullins, 1985). Böceklerin birçok türünde larval gelişim dönemlerinde, hayatlarının daha sonraki dönemlerindeki aktivitelerde kullanılmak üzere büyük miktarlarda lipid depolanır (Giron ve Casas, 2003). Böceklerde tespit edilen en yaygın yağ asitleri miristik, palmitik, palmitoleik, stearik ve oleik asittir. Bunlardaki yağ asitlerinin miktar ve çeşidi böcekten böceğe değişebilir (Florkin ve Jeuniaux, 1964).

Böcek hemolenfinde bulunan maddelerden bir diğeri metabolitlerdir. Bunlar arasında özellikle trikarboksilik asit döngüsüyle ilişkili olanlar (sitrat, α -ketoglutarat, süksinat, fumarat, malat ve okzaloasetat) (Florkin ve Jeuniaux, 1964; Mullins, 1985), glioksilik, asetoasetik asit, laktat, piruvat ve askorbat (Mullins, 1985) ve organik fosfatlar (α -gliserolfosfat, fosforil-ethanolamin, gliserofosfoethanolamin, fosforilkolin, sorbitol-6-fosfat ve glukoz-6-fosfat) sayılabilir. Hemolenfteki organik fosfatların konsantrasyonları, metamorfoz, diyapoz, anoksia ve düşük sıcaklıklara maruz kalma durumlarında değişebilir (Mullins, 1985).

2.2.1. Protein

Birçok böcek, daha iyi gelişip büyüebilmek için besinlerinde özellikle larva döneminde optimum seviyede proteine ihtiyaç duyar, fakat bu ihtiyaç duyulan miktar farklı türlerde büyük oranda değişim gösterir (Genç, 2006). Besindeki proteinlerin sindirimi sonucu kazanılan amino asitler krebs döngüsü değişik ara ürünlerinin ve çeşitli proteinlerin sentezinde kullanılmaktadır (Cônsole ve Vinson, 2004).

Proteinler canlıdaki organik maddelerin en komplekslerinden olup canlı hayatında çok önemli işlevleri olan maddelerdir (Mullins, 1985). Böcek hemolenfinde, farklı gelişim, fizyolojik ya da immünolojik süreçlerle ilişkili olarak birçok protein bulunur. Hemolenf proteinlerinin, birçok böcek türünde osmotik dengeyi ve optimal turgor basıncını korumada yardımcı olduğu tespit edilmiştir (Atmowidjojo ve ark., 1999).

Holometabol böceklerde hemolenfteki protein miktarı, genellikle her larva evresinde artar, evre sonundaki deri değişimi sırasında azalır (Mullins, 1985). Böceklerde larval hemolenf, metamorfoz ve pupa oluşumu sırasında enerji ve amino asit kaynağı olarak kullanılan proteinlerin depolanmasında kullanılır (Tungjitwitayakul ve ark., 2008). Holometabol böceklerde son larva evresinde, dışarıdan besinin alınmadığı pup evresi için hemolenf proteinlerinin uygun miktarlarda sentezi ve depolanması sağlanır. Larvadaki depo proteinleri yağ dokuda sentezlenir ve hemolenf

içine bırakılırlar. Bu proteinler pup oluşumundan kısa süre önce yağ doku tarafından tekrar absorbe edilir (Taški ve ark., 2004; Tungjitwitayakul ve ark., 2008). Lepidoptera ordosuna dahil türlerle yapılan çalışmalarda, hemolenf proteinlerinin miktarının genellikle larval yaşam boyunca arttığı ve pup evresinin sonunda azaldığı tespit edilerek (Florkin ve Jeuniaux, 1964), larval dönemdeki hemolenfteki protein havuzunun pupal hayat boyunca protein sentezinin kaynağını oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Pup evresinde hemolenfteki proteinler, ergin böcek yapılarının oluşumu için pupun yağ dokusu içinde protein granülleri halinde depolanır ve sonra ergin evrede ihtiyaç durumunda amino asitleri sağlamak için enzimatik yollarla parçalanırlar (González ve ark., 1991; Taški ve ark., 2004; Tungjitwitayakul ve ark., 2008). Böylelikle pupal hemolenf protein havuzu da ergin evredeki protein sentezi için amino asit kaynağı olarak iş görür. Ergin hemolenfinde protein miktarındaki en önemli değişme dişilerin vitellogeninleri üretmeleri, depolamaları sırasında meydana gelir (Mullins, 1985). Böcek yumurtaları büyük oranda protein içerdiklerinden, Lepidoptera ordosunun dişileri yüksek oranda amino asit ihtiyacı duyarlar. Fakat genellikle, şeker bakımından zengin olan ergin besininde amino asitler daha az bulunur (O'Brien ve ark., 2002; Bauerfeind ve Fischer, 2005).

Hemolenfde savunmada, donmaya karşı korunmada, çeşitli maddelerin transportunda iş gören çeşitli proteinler, hemoglobinler, kromoproteinler ve fenoloksidazlar bulunur (Mullins, 1985).

Park ve ark. (2005) *G. mellonella* larvalarında apolipoprotein III (apoLp-III) ve Gm protein-24 olarak adlandırılan iki hemolenf proteinini izole etmişlerdir. Bunlardan apoLp-III lipid transportunu kolaylaştırmak için lipoproteinlerle etkileşir ve profenoloksidaz enzim zincirinin aktivasyonunda iş görür. Ayrıca bu proteinin konformasyonel değişiminin, hemolenfin bakteriyolojik aktivitesinin güçlendirilmesinde ve böcek immün tepkisinin aktivasyonunda bir uyarıcı olabileceği ifade edilmektedir (Park ve ark., 2005; Song ve ark., 2008). Gm protein-24 proteinin de apolipoprotein III gibi profenoloksidaz aktivasyonunda rol oynadığı ve bu faaliyette, apoLp-III'den daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Park ve ark., 2005).

Proteinlerin besin değeri, yapılarında yer alan amino asit içeriğine bağlıdır. Hayvanlar sindirim faaliyetleri sonucu proteinleri amino asitlere hidroliz eder ve daha sonra amino asitleri büyüme ve gelişmeleri için ihtiyaç duydukları spesifik proteinleri sentezlemede kullanırlar. Amino asitler protein sentezinde kullanıldıkları gibi, nöral

iletimde, detoksifikasyonda, enerji üretiminde, çeşitli ara metabolitlerin sağlanmasında ve morfogenetik süreçlerde kullanılırlar (Chang, 2004). Özellikle yağ doku içerisinde gerçekleşen transaminasyonlar sonucu oluşan keto asitlerden yeni amino asitler sentezlenebilir. Bu şekildeki transaminasyonlar, bir böceğin besininin belli amino asitler bakımından yetersiz olması halinde daha önemli olmaktadır (Gillott, 2005). Oluşan keto asitlerden bazıları krebs döngüsüyle oksitlenerek, enerji temininde kullanılırlar ya da karbohidratlara ve yağlara dönüştürülürler (Morgan, 2004).

2.2.2. Amino asitler

Böcekler ihtiyaç duydukları amino asitlerin bir kısmını kendileri sentezleyebilir. Buna karşılık ihtiyaç duyup sentezleyemedikleri ve esansiyel amino asitler olarak tanımlanan amino asitleri direkt olarak besinlerinden alabilirler. Böceklerde esansiyel olan amino asitlerin çeşidi, sayısı ve her amino asite duyulan kantitatif ihtiyaçlar türden türe değişebilir. Aynı türde amino asitlerin konsantrasyonu gelişim evresi, toksinlere maruz kalma, deri değiştirme, metamorfoz, diyapoz, beslenme durumu ve o andaki fizyolojik şartlara göre de değişebilir (Chen, 1966; Mullins, 1985; Hanzal ve Jegorov, 1991; Fields ve ark., 1998; Gillott, 2005, Genç, 2006). Bazı amino asitlere morfogeneziste daha çok ihtiyaç duyulurken bazıları örneğin alanin ve glisin optimal büyüme için daha önemlidir. Örneğin tirozin, kutikül dayanıklılığı için önemliyken, triptofan pigmentlerin sentezinde önemli rol oynar (Behmer, 2006). Böcekler amino asitleri büyüme ve gelişmeleri için gerekli faaliyetlerde, sentezlenecek yeni proteinlerin, enzimlerin, hormon reseptörlerinin, nörotransmitterlerin sentezinde kullanabildikleri gibi morfogenezis, yumurta üretimi ve yumurtaların olgunlaşması gibi faaliyetlerde de kullanabilirler (Genç, 2006; Renault ve ark., 2006; Klowden, 2007).

Böcekleri diğer tüm hayvanlardan farklı kılan biyokimyasal özelliklerden birisi hemolenflerinde yüksek konsantrasyonlarda amino asit bulunmasıdır (Evans ve Crossley, 1974; Colinet ve ark., 2007). Yüksek konsantrasyonda amino asit bulunma durumu aminoasidemi olarak tanımlanır (Florkin ve Jeuniaux, 1964; Mullins, 1985). Böceklerin hemolenfindeki proteinlerde standart amino asitlerin tümünün L-formları yer alır. Ayrıca hemolenfte triptofan ve tirozin türevlerinin (kynurenine, 3-OH-kynurenine, dihidroksifebilalanin), metilsistein, homoarjinin ve hidroksiprolin, D-alanin ve D-serin gibi amino asitlerin bulunabildiği tespit edilmiştir (Mullins, 1985).

Böceklerdeki aminoasidemi, endopterigotlarda ekzopterigotlardan daha belirgindir (Florkin ve Jeuniaux, 1964; Mullins, 1985). Ekzopterigotlar eksternal olarak gelişmiş kanatlara sahiptir, pup evresi olmaksızın ergin hale gelirler. Bu nimfler deri değişim süreci boyunca erginler içerisinde gelişirler. Ekzopterigotlarda ve endopterigotlarda farklı amino asitler çok farklı konsantrasyonlarda bulunabilir (Florkin ve Jeuniaux, 1964). Ekzopterigotlarda çeşitli amino asitlerin hemolenfteki konsantrasyonu 5-70mg/100ml arasında değişim gösterir. Bunlarda glutamik asit+glutamin ve glisinin konsantrasyonu diğerlerine göre biraz daha fazladır. Endopterigotlarda aspartat, asparajin, fenilalanin, lösin ve izolösin genellikle düşük değerlerde, glutamik asit+glutamin ve prolin ise daha yüksek değerde bulunur (Florkin ve Jeuniaux, 1964; Mullins, 1985).

Amino asitlerin, parazitoitlerin büyüme ve gelişimi için başlıca besinler olduğu gösterilmiştir (Gelman ve ark., 2000). Ancak parazitoitlerin embriyonik gelişimlerini başlatmak ve sürdürmek için spesifik amino asit gereksinimleri hakkında bilgi sınırlıdır (Cônsoi ve Vinson, 2004).

Chang (2004)'ın bildirdiğine göre, besinsel olarak amino asitleri esansiyel olanlar ve esansiyel olmayanlar olarak tanımlamak için ilk çalışma Rose (1938) tarafından genç ratlarla yapılmıştır. Rose (1938) amino asitleri birer birer besine ilave ederek veya çıkararak yaptığı beslenme çalışmaları sonucu, besine ilave edilmediği zaman anormalliğe yada büyümenin ve gelişmenin yeteri kadar olmamasına neden olan amino asitleri esansiyel amino asitler, besinden çıkarıldığında normal büyümeyi etkilemeyenleri esansiyel olmayan amino asitler olarak tanımlamıştır. Rose tarafından geliştirilen bu metot kullanılarak, böceklerin 20 amino asite olan ihtiyaçları belirlenmiştir (Chang, 2004).

Chang (2004), *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)'nın larva ve erginlerinin amino asit ihtiyaçlarını araştırmıştır. Yapılan çalışma sonunda bu tür için esansiyel olan 10 amino asitten (arg, ile, leu, lys, his, met, phe, thr, trp, val) sadece birisinin besinden çıkarılması halinde larvaların öldüğü tespit edilmiştir. Sekiz esansiyel olmayan (ala, asp, cys, glu, gly, pro, ser, try) amino asitin bulunmadığı besinle beslenen larvaların yaşadıkları fakat larval gelişimlerinin yavaşladığı gözlenmiştir. Hazırlanan besinden sadece esansiyel olmayan serin çıkarıldığında larval ağırlık kaybı da artmıştır. Glisinsiz besinle beslenen larvalarda ergin çıkış oranı düşmüştür. Erginlerin esansiyel olmayan amino asitleri içermeyen besinle beslenmeleri bunların hayatta kalma sürelerinde,

eşeyssel olgunluğa ulaşmalarında ve yumurtalarının açılma yüzdesinde önemli bir etki yaratmamıştır. Buna karşılık esansiyel amino asitlerden herhangi birinin yokluğunda verimlerinin önemli derecede düştüğü görülerek, yumurta üretimi için esansiyel amino asitlerin mutlaka gerekli olduğu sonucuna varılmıştır (Chang, 2004).

Thompson (1976) idiobiont bir ektoparazitoit olan *Exeristes roborator* (Hymenoptera: Ichneumonidae) ile yaptığı çalışmada arjinin, histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan ve valin amino asitlerinden herhangi birinin eksikliğinde larval gelişimin 3. evreden sonra devam etmediğini ileri sürmüşlerdir. Thompson (1976) *E. roborator*'un %6 amino asit içeren, karbohidrat veya yağ bulunmayan bir besinde larval gelişimini tamamlayabildiğini tespit etmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda spesifik amino asitlere duyulan gereksinimin parazitoit türlerine göre değişebildiği ve genel olarak parazitoitlerin amino asit kompozisyonunun, konaklarının amino asit kompozisyonuyla büyük ölçüde benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Quicke ve Shaw, 2004).

2.3. Parazitizm

Böceklerde metabolik homeostazisi korumada sahip oldukları yağ dokusu, yüksek enerji gerektiren durumlarda yıkılacak olan lipit, glikojen ve proteinlerin sentezini sağlayarak böcek hayatında çok önemli rol oynar (Strand ve Casas, 2007; Anand ve Lorenz, 2008). Parazitizm böcek yağ doku metabolizmasında değişimlere yol açarak konak hemolenfinde biyokimyasal değişikliklere neden olur (Vinson ve Iwantsch, 1980; Alleyne ve Beckage, 1997; Nakamatsu ve Tanaka, 2004; Quicke ve Shaw, 2004; Salvador ve Cónsoli, 2008). Konak hemolenfindeki biyokimyasal değişimler, konak endokrin sistemini değiştirmek (Beckage ve ark., 1987) ve/veya konak immün savunmasını baskılamak suretiyle ortaya çıkabilir (Shelby ve ark., 2000). Konak hemolenfinde ortaya çıkan değişiklik çoğunlukla yumurtlama sırasında, ergin dişi parazitoit tarafından konağa bırakılan ovaryum proteinleri ve/veya zehirleri gibi madde(ler)den veya polidnavirüsler, virüs benzeri partiküller gibi faktör(ler)den kaynaklanır (Shelby ve ark., 2000; Richards ve Edwards, 2001; Lee ve Kim, 2008).

Simbiyotik virüsleri bulunmayan hymenopter parazitoitlerde, konak immün sisteminin baskılanmasında ve konağın düzenlenmesinde rol oynayan başlıca etken zehirdir (Zhang ve ark., 2004; Uçkan ve ark., 2010). Parazitoidin konağa zehir enjekte etmesi, konağın devamlı veya geçici olarak paralyze olmasına, büyümesinin durmasına

(Doury ve ark., 1997; Ergin ve ark., 2006; Uçkan ve ark., 2006) ve immün tepkisini içeren çeşitli fizyolojik değişikliklere neden olur (Richards ve Edwards, 2001; Moreau ve Guillot, 2005; Shim ve ark., 2008). Parazitoit zehirleri aminler, proteinler ve enzimler karışımından ibaret olabilir (Moreau ve Guillot, 2005; Ergin ve ark., 2006; Pennacchio ve Strand, 2006; Uçkan ve ark., 2006; Asgari ve Rivers, 2011). Paralize edici zehirler çoğunlukla konağın merkezi sinir sistemindeki snapslarda veya sinir-kas bağlantılarında etkilidir (Quicke, 1997). Doury ve ark. (1997) Hymenoptera ordosuna dahil türlerin zehirlerinde yaygın olarak bulunan hyaluronidazların, hayvan dokularında hücreler arası bağlantıları oluşturan mukopolisakkaritleri (hyaluronik asit ve chondroitin) hidrolize ederek dokusal bozulmalara, fosfolipazların membran fosfolipitleri ile etkileşime girerek membran boyunca membran etkinliğini bozan deliklerin oluşmasına neden olduklarını ileri sürmüşlerdir.

Parazitoit zehrinin neden olduğu fizyolojik etkiler, endoparazitoit ve ektoparazitoit türlerde farklılık gösterebilir. Ektoparazitoitlerde ergin dişi parazitoidin zehiri konak savunma ve hareket sistemlerini baskılayan en önemli faktördür (Doury ve ark., 1997; Richards ve Edwards, 2001; Moreau ve Guillot, 2005). Bunlarda konağın kalbi uzunca bir süre atmaya devam etse de, gelişimi durur ve bu larvalara yumurta bırakılmasa da sonunda ölürlar (Baker ve Fabrick, 2000; Shim ve ark., 2008). Hareketli bir konak, gelişen parazitoit larvası ve yumurta bırakma esnasında ergin dişiler için tehlike oluşturduğundan (Quicke, 1997; Ergin ve ark., 2006), idiobiont ektoparazitoitler konaklarına enjekte ettikleri zehirleri ile konakta sürekli felç durumunu sağlayarak konak üzerine bırakılan yumurtaların düşmemesini ve bunlardan çıkan larvaların gelişimini güvence altına alırlar (Vinson ve Iwantsch, 1980; Quicke, 1997). Ektoparazitoitlerde zehir, paralyze edici olarak fonksiyon gösterirken, endoparazitoitlerdeki zehrin, özellikle konak fizyolojisini değiştirmeye ilgili farklı bir işlevi vardır (Zhang ve ark., 2004). Koinobiont endoparazitoitler zehirledikleri konaklarını geçici olarak felçleştirirler, daha sonra konaklarının hareket, beslenme ve gelişime bir süre izin verirler (Quicke, 1997; Nakamatsu ve Tanaka, 2003). Bu tip parazitoitlerde konağın besin almaya devam etmesi, parazitoitlerin konaktan alacakları besinsel elemanları artırır (Alleyne ve ark., 1997). Endoparazitoit türlerin birçoğu konaklarının larvalarını yumurtlama alanı olarak kullanırlar. Bunlar, konak larvasının immün ve endokrin sistemlerini nötralize eden ve böylelikle parazitoidin larval gelişimi tamamlanıncaya kadar konağı öldürmeyen fakat büyüme ve gelişiminde gecikmeye

neden olan spesifik zehirlere sahiptir. Bu durum parazitoit için larval konağın erken ölümünden kaynaklanacak olumsuzlukları önlemiş olur (Ergin ve ark., 2006).

Endoparazitoitlerde, konağa enjekte edilen madde ve/veya faktörler konak fizyolojisini ve davranışını etkileyerek konak içinde gelişen parazitoit larvalarına yarar sağlarlar (Doury ve ark., 1997; Richards ve Edwards, 2001; Cònsoli ve ark., 2005; Asgari ve Rivers, 2011). Endoparazitoitlerin aksine ektoparazitoitlerde belirtilen şekilde bir endojen düzenleme olmaz. Ektoparazitoitlerde larvalar, önce direk olarak konak hemolenfi ile sonra dokularıyla beslenir ve ergin olarak çıkıştan önce konağın tamamını veya tamamına yakın kısmını tüketirler (Alleyne ve ark., 1997).

Shim ve ark. (2008) *B. hebetor*'un konağa yumurta bırakmadan önce enjekte ettiği zehir etkisiyle paralize olan konakta, kalp atış oranında zehirlenmeden sonraki 4 güne kadar önemli bir düşüşün olmadığını gözlemişlerdir.

Waller (1965), *B. hebetor* zehirinin *G. mellonella*'nın respirasyon ve sinir kas bağlantısına etkilerini incelemiş ve sonuç olarak *B. hebetor* zehirinin konakta oksijen tüketimini yaklaşık olarak yüzde yirmi düşürdüğünü, lokomotor aktiviteyi durdurduğunu tespit etmiştir. Rath ve Sinha (2005) *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) ve *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae)'nın *Blepharipa zebina* (Diptera: Tachinidae) tarafından parazitlenmiş larvalarında protein miktarının düşmesi nedeniyle daha az ipek üretildiğini ve hemolenfteki amino asit içeriğinin azaldığını belirtmişlerdir.

Bracon hebetor tarafından parazitlenen *E. kuehniella* larvalarının, hemolenfindeki toplam protein miktarının parazitlenmeden 24 ve 48 saat sonra azaldığı, hemolenfte belirlenen proteinlerden bazılarının miktarı azalırken, bazılarının arttığı, parazitlenmenin konak hemolenf proteinleri üzerinde sadece kantitatif yönden düzenleyici etki yaptığı, kalitatif olarak etkili olmadığı öne sürülmüştür (Altuntaş ve ark., 2010). Buna karşılık Beckage ve ark. (1987), *C. congregata* tarafından parazitlenen *M. sexta* larvalarının hemolenfinde, parazitlenmemiş larvalarda gözlenemeyen bir hemolenf polipeptidinin sentezlendiğini tespit ederek parazitizmin protein sentezini kalitatif olarak da tetiklediğini göstermişlerdir.

2.4. Gelişen parazitoidin etkisi

Parazitoit larvalarının besinsel ihtiyaçlarının sağlanması ve devamı için konağı uygun hale getirmeye yönelik potansiyel konak düzenleyicilerden birisi de konakta

gelişimlerini tamamlayan parazitoit larvalardır (Vinson ve ark., 1994; Hochuli ve Lanzrein, 2001; Salvador ve Cönsoli, 2008). Parazitoit larvaları tarafından kontrol edilen düzenleyici faaliyetlerin konakta neden olduğu kimyasal değişimlerin tanımlanmasının, parazitoitin besinsel ihtiyaçları hakkında temel bilgiler sağlayacağı ileri sürülmüştür (Salvador ve Cönsoli, 2008). Parazitoit larvaları tarafından düzenlenen konak faaliyetlerinin çoğu, konağı parazitoitin her larva evresinin besinsel ihtiyaçları için uygun hale getirmeye yöneliktir (Doury ve ark., 1997; Salvador ve Cönsoli, 2008). Endoparazitoitlerde bu düzenleyici faaliyetler ektoparazitoitlere göre daha ileri düzeydedir. Endoparazitoitlerde konağın larvalar için besinsel yönden uygun hale getirilmesinde parazitoit yumurtasından salınan teratositler (Nakamatsu ve Tanaka, 2004) ve parazitoit larvalarından kaynaklanan faktörler önemli rol oynar (Vinson ve ark., 1994; Doury ve ark., 1997; Richards ve Edwards, 2001). Protein biyosentezi ve salınımında görev alan teratositler, ayrıca parazitoit larvalarının konağı besin olarak t ketmelerinde de direk ve indirekt olarak kilit rol oynarlar. Teratositler konak dokularını sindiren enzimleri üreterek, gelişen larva için daha bol ve uygun besin sağlamaktadır (Falabella ve ark., 2000).

Nakamatsu ve Tanaka (2004), endoparazitoit *C. kariyai* tarafından parazitlenen konak *P. separata* da konak hemolenfindeki karbohidrat, lipit ve protein tüketiminin konakta bulunan parazitoit larva sayısına bağlı olarak değiştiğini, çok fazla sayıda parazitoit larvası bulunan konakların hemolenfindeki protein, lipit ve trehaloz konsantrasyonunun az sayıda larva bulunanlardan önemli derecede düşük olduğunu ve az sayıda parazitoit larvası bulunan konaklarda parazitlenmeden sonraki sekizinci günde trehaloz konsantrasyonunun arttığı, daha sonra onuncu gün itibariyle azaldığını tespit etmişlerdir.

Vinson ve ark. (1994) endoparazitoit *Cardiochiles nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae)'in yumurtalarının açılmasıyla ortaya çıkan teratosit ve larvaların, çevrelerine protein saldıkları, teratositlerin kolaylıkla amino asitleri absorbe ettiklerini ve salgıladıkları proteinleri sentezlediklerini, sentezledikleri proteinlerin çoğunu çevreye saldıklarını, bir kısmının salınırken değiştirildiğini, teratositlerin farklı yaşlarda farklı proteinleri salabileceklerini ifade etmişlerdir. Yapılan çalışmada larvaların bazı proteinleri oral yoldan ve bazılarını da anal vezikülleri ile salgıladıkları gösterilmiştir.

Cotesia kariyai'nin kaliks sıvısı ve zehiri enjekte edilen *P. separata* larvalarının hemolenfinde meydana gelen değişimler, parazitlenmiş ve parazitoit larvası bulunan

konaklarla karşılaştırılmıştır. Sadece kaliks sıvısı ve zehir enjekte edilmiş olan konak larvaların hemolenfindeki protein konsantrasyonunun, önce düştüğü fakat enjeksiyondan 9-10 gün sonra kontrolle aynı seviyeye ulaştığı, parazitoit larvası bulunan konakların protein konsantrasyonunun ise önemli derecede düştüğü ve bir daha artmadığı tespit edilmiştir. Parazitlenmiş konaklardaki protein miktarındaki düşüş, parazitoit larvalarının direkt tüketimine bağlanmıştır. Trehaloz miktarının, kaliks sıvısı ve zehir enjekte edilen konakların hemolenfinde artması, parazitlenmiş konaklarda ise büyük oranda azalması, parazitoit larvalarının gelişme için trehalozu önemli bir besin kaynağı olarak kullanmalarına bağlanmıştır (Nakamatsu ve ark. 2001).

Parazitlenmenin *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae)'nın hemosit sayısı, morfolojisi ve yaşayabilirliği üzerinde ters etki yaptığı, fagositoz ve fenoloksidaz aktivitesini içeren konak immün tepkisini baskıladığı tespit edilmiştir (Richards ve Edwards, 2001). Ergin parazitoit zehirinin, bu olaylarda hiç rol oynamıyor ya da küçük bir rol oynuyor gibi görüldüğü, parazitizmden kaynaklanan etkilerin, beslenen ektoparazitoit *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae) larvalarının neden olduğu faktörlerden ve sonradan konak içine verilen faktörlerden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. *Lacanobia oleracea* da parazitizmin plazma protein profilini değiştirdiği, parazitlenen larvalarda parazitlenmemişlerden farklı olarak, 27kDa moleküler ağırlıklı parazitizme-özel bir proteinin tespit edildiği belirtilmiştir (Richards ve Edwards, 2001).

Hochuli ve Lanzrein (2001), *Chelonus inanitus* (Hymenoptera: Braconidae) larvası tarafından salgılanan proteinlerin, polidnavirüs/zehir varlığında konak *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae)'in metamorfuzunu düzenlemede rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. Ektoparazitoit *Eupelmus orientalis* (Crawford) (Hymenoptera: Eupelmidae)'in ilk evre larvalarının tükürük bezlerinden salınan salgılar ile konak *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae)'un larvalarında sürekli felce ve gelişimin durmasına neden olduğu belirtilmiştir (Doury ve ark., 1997). Gündüz ve ark. (2008), *B. hebetor* erginlerindeki protein miktarının konağa ve eşeye bağlı olarak değiştiğini, *G. mellonella*'da yetiştirilen *B. hebetor* dişilerinin, *E. kuehniella* larvalarında yetiştirilenlerden daha fazla protein içerdiklerini, erkek parazitoitlerin protein miktarının konak tipinden etkilenmediğini, ayrıca *G. mellonella*'nın protein bakımından *E. kuehniella*'dan daha zengin olduğunu tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada Gündüz ve Gülel (2010) *B. hebetor* erginlerindeki protein miktarlarının yaşa,

eşeye ve beslenmeye bağlı olarak değiştiğini, dişilerdeki protein miktarının ergin hayatın ilk beş gününde arttığını, daha sonra azalarak onuncu günde ilk günkü seviyeye indiğini fakat erkeklerde önemli bir değişikliğin olmadığını ileri sürmüşlerdir.

2.5. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi (HPLC)

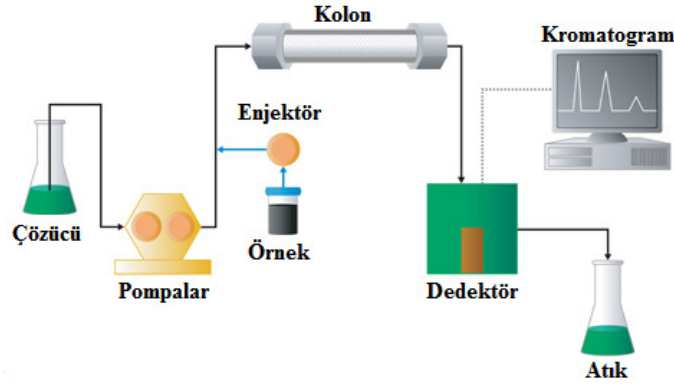
Kromatografi genel anlamda bir karışımı oluşturan maddeleri, iki ayrı (taşıyıcı ve sabit) faz içinden geçirirken bu fazlara değişik ilgilerinden yararlanarak hem nitelik hem de nicelik olarak ayırıştırılması işlemidir (Brown ve ark., 2005).

Modern kromatografide karışımın ayırıştırılmasında iki farklı faz kullanılır, bunlar sabit faz ve taşıyıcı fazlardır. Taşıyıcı faza hareketli faz da denilir. Sabit faz sıvı veya katı, taşıyıcı faz ise sıvı veya gaz olabilir. Taşıyıcı faz gaz ise sistem Gaz Kromatografisi (GC), taşıyıcı faz sıvı ise sistem Sıvı (Likit) Kromatografisi (LC) olarak tanımlanır (Brown ve ark., 2005).

Sıvı kromatografide taşıyıcı fazda çözünmüş olan bileşikler, kolon içerisindeki sabit faz ile etkileşimlere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Bu bileşikler, kolonu değişik zamanlarda terk ederek, birbirlerinden ayrılırlar. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip miktarlarıyla orantılı olarak alıkonma zamanları kaydedilir. Alıkonma zamanı (RT: Retention Time) maddenin enjekte edildiği zaman ile dedektörde tespit edildiği zaman arasında geçen süreyi ifade eder (Brown ve ark., 2005).

Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi (HPLC) aşağıdaki temel birimlerden oluşur (Şekil 2.1):

- Hareketli/Taşıyıcı faz deposu
- Taşıyıcı faz hareket birimi; Pompa(lar)
- Enjeksiyon (örnek yükleme) birimi
- Ayırma birimi; Kolon(lar)
- Ölçüm birimi; Dedektör(ler)
- Yazım birimi; kaydedici, integratör
- Atık deposu



Şekil 2.1. Yüksek basınç sıvı kromatografi
(http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055&locale=en_TR 30.10.2011)

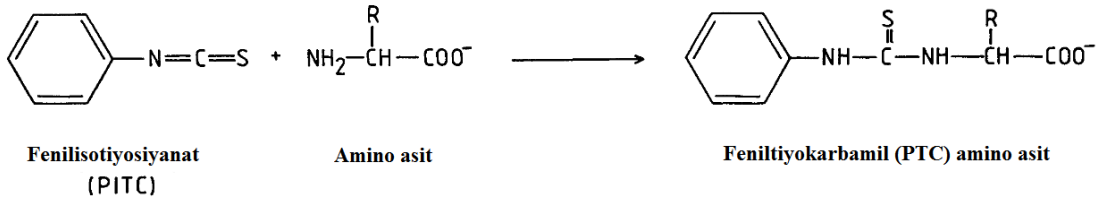
HPLC genelde uçucu olmayan organiklerin tespitinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle amino asitlerin, proteinlerin, nükleik asitlerin, hidrokarbonların, yağ asitlerinin, karbonhidratların, fenollerin, pestisitlerin ve antibiyotiklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Amino asitlerin belirlenmesinde genellikle ninhidrin ile kolon sonrası türevlendirme yapılarak iyon-değişimi kromatografisi kullanılmaktadır, fakat kolon öncesi türevlendirme prosedürlerinin kullanımı ve türevlerin Ters faz (RP) HPLC ile ayrımı çok daha geniş kabul görmektedir. HPLC ile yapılan bu amino asitlerin analizi, spektral özellikleri olmadığından önce bir türevlendirme aşamasını gerektirir. Soğuran veya floresan amino asit türevlerini elde edebilmek için çok miktarda reaktif ve prosedür tanımlanmıştır. Bunlardan en çok kullanılan reaktifler, *orto*-fitalaldehit (OPA), 1-dimetilaminonaftalin-5-sufonil klorid (Dansyl), 6-aminokinolil-*N*-hidroksisüksinimidil karbamat (AQC), fenilisotiyosiyanat (PITC) (Checa-Moreno ve ark., 2008; Gheshlaghi ve ark., 2008), 4-dimetilaminoazobenzen-4'-sulfonil klorid (Dabsyl) ve 9-florenilmetil kloroformat (FMOC)' dır (Checa-Moreno ve ark., 2008).

OPA kullanımı yüksek hassasiyet yeteneği sağlar fakat prolin ile reaksiyon vermemesi (Janssen ve ark., 1986; Checa-Moreno ve ark., 2008), OPA-lizin türevi gibi floresan ürünlerin kararsızlığı ve quencherlere duyarlı olmasından dolayı ölçümde zorluklar gibi dezavantajları vardır. Prolin ve hidroksiprolin olduğu durumlarda miktar belirleme, bu amino asitlerdeki halkaların açılması için özel oksidatif prosedürler gerektirir. Dansyl klorid reaksiyonu özellikle prolin ile çok yavaş gerçekleşir, bu yüzden bu metot yaygın olarak kullanılmaz. Dabsyl türevleriyle de benzer durumlar meydana

gelmektedir. Fmoc metodunun, reaktif girişim dezavantajı vardır (Checa-Moreno ve ark., 2008).

Amino asit analizinde PITC ile kolon öncesi türevlendirme son zamanlarda yaygın olarak kullanılan bir metottur. PITC kullanımı ile bazik koşullar altında serbest amino asitler, ters faz HPLC ile ayrılabilen ve UV ile belirlenebilen feniltiyokarbamil (PTC) türevlerine dönüştürülür (Janssen ve ark., 1986). Bu türevlendirme aşaması hızlıdır ve tüm esansiyel amino asitlerle gerçekleşir. PITC primer ve sekonder aminler ile aynı ölçüde reaksiyon verir (Checa-Moreno ve ark., 2008; Gheshlaghi ve ark., 2008); yani primer amino asitlerle olduğu gibi prolin ile de aynı kromoforu meydana getirir. Sonuç olarak, PITC hem primer hem de sekonder amino asitlerin kolon öncesi türevlendirilmesinde kullanılır (Checa-Moreno ve ark., 2008).



Şekil 2.2. PITC ile amino asit türevlendirme reaksiyonu (Janssen ve ark., 1986)

2. 6. Lambert-Beer kanunu:

Spektrofotometri çözelti içerisindeki çeşitli solidlerin konsantrasyonlarını belirlemede ışık absorpsiyonunun ölçümünü mümkün kılmaktadır. Ölçüm Lambert-Beer yasasına dayanılarak yapılmaktadır. Bu yasaya göre bir çözeltiden geçen ışık miktarı, ışığın çözelti içinde katettiği yol ve çözelti konsantrasyonu ile logaritmik olarak ters orantılı, emilen ışık miktarı ise doğru orantılıdır (Nelson ve Cox, 2005).

$$\text{Transmittans}(T) = I/I_0$$

$$\text{Yüzde Transmittans } (\%T) = 100 T$$

$$\text{Absorbans (optik dansite, O.D.)} = -\log_{10} T$$

$$\text{Absorbans}(A) = \epsilon \cdot c \cdot l$$

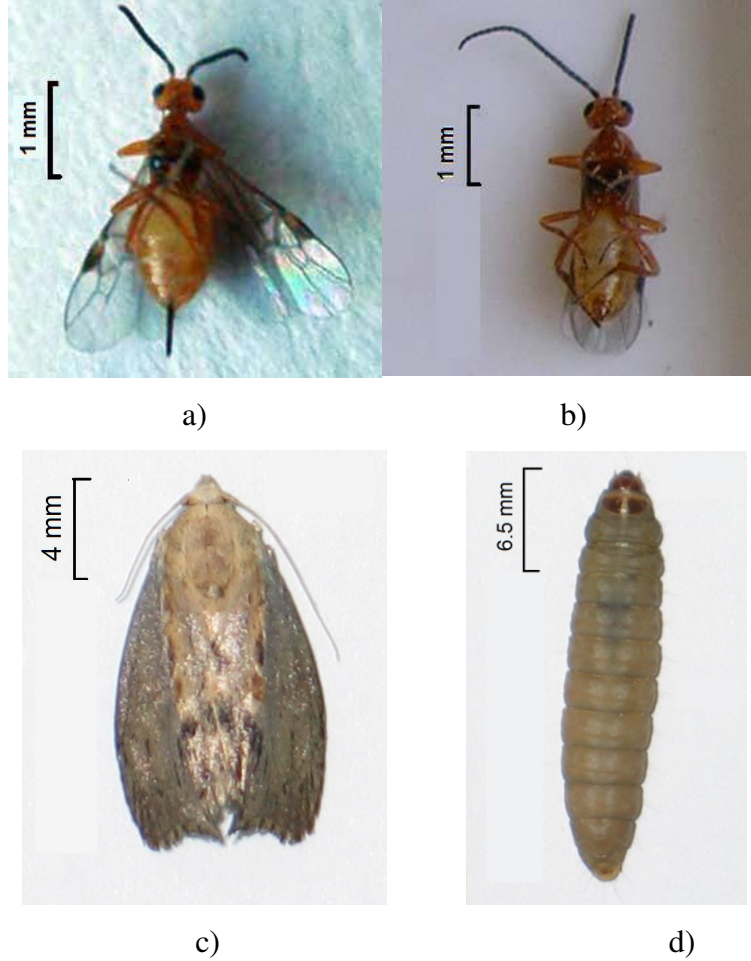
$c \rightarrow$ çözelti konsantrasyonu (mol/L)

$l \rightarrow$ ışığın çözelti içinde kattettiği yol (cm)

$\epsilon \rightarrow$ molar absorpsiyon katsayısı (L/mol/cm)

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

Çalışmada parazitoit olarak gregar, idiobiyont bir ektoparazitoit olan *Bracon hebetor*, konak olarak *Galleria mellonella* kullanıldı. Parazitoit *B. hebetor* erginlerine, konak *G. mellonella* ergin ve larvasına ait resimler Şekil 3.1’de verildi.



Şekil 3.1. *Bracon hebetor* erginlerinde dişi (a) ve erkek (b) bireyin ventralden *G. mellonella*’da ergin bireyin (c) ve olgun larvanın (d) dorsalden görünüşü

3.1. Konak Kültürlerinin Kurulması

Konak olarak kullanılan *G. mellonella*’nın stok kültürleri, OMÜ Ziraat Fakültesi arıcılık enstitüsünden alınan güvelenmiş bal peteklerindeki *G. mellonella* larvalarından elde edilen erginlerle Gül ve Gülel (1995)’in kullandığı yöntemle göre kuruldu. Konak erginleri, içerisinde sterilize edilmiş bal petekleri bulunan ve ağzı hava sirkülasyonunu önlemeyecek şekilde bez ile kapatılmış bir litrelik cam kavanozlara konularak $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ ’de, $65\pm 5\%$ bağıl nem ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık kısaca 16:8 (A:K) fotoperiyottaki laboratuvar şartlarında muhafaza edildi. Bu şekilde hazırlanan kaplarda gelişen konak larvalarının populasyon yoğunluğuna göre gerektiğinde kaplara yeterli

miktarda petek ilave edildi ve daha sonra kültürler bir litrelik kaplardan beş litrelik cam kaplara (kavanozlara) aktarıldı. Denemelerde bu kültürlerden elde edilen ve rastgele seçilen üçüncü nesil son evre larvaları kullanıldı. Konak kültürünün devamını sağlamak için yukarıda belirtilen yol izlenerek belli periyotlarla yeni konak kültürleri kuruldu.

3.2. Parazitoit Kültürlerinin Kurulması

Parazitoit *B. hebetor* stok kültürlerinin kurulmasında Gündüz ve Gülel (2004)'in kullandığı yöntemden yararlanıldı. Kültürler 3.1'de belirtilen laboratuvar şartlarında 10 ml'lik cam tüplere bir dişi ve bir ergin erkek parazitoit ile *G. mellonella*'nın son evre larvası konulmak suretiyle kuruldu. Parazitoit kültürünün devamı için belli aralıklarla yukarıda belirtilen yol izlenerek yeni parazitoit kültürleri hazırlandı. Denemelerde bu kültürlerden elde edilen ve rastgele seçilen parazitoit erginleri kullanıldı.

3.3. Hemolenf Örneklerinin Alınması

Amino asit analizlerinde kullanılacak konak hemolenf örnekleri iki grup larvadan alındı. Bunlardan birinci grubu sadece dişi parazitoitler tarafından paralize edilen fakat üzerlerine yumurta bırakılmayan konak larvaları (P1), ikinci grubu da dişiler tarafından paralize edilen ve üzerlerinde parazitoit larvaları gelişen konak larvaları (P2) oluşturdu. Bu iki grup daha sonra gerektiğinde sırasıyla sadece P1 ve P2 olarak ifade edilecektir. Konak larvalarının paralize edilmesinde veya parazitlenmesinde parazitoidin eşeyssel olgunluğa erişme ve yumurta bırakma yaşı dikkate alınarak, bir günlük ergin parazitoitler kullanıldı.

3.3.1. Paralize Olan (P1) Konak Larvalarından Hemolenf Örneklerinin Alınması

Konak larvalarından hemolenf örneklerinin alınmasında parazitoidin yumurta ve larval evrede geçirdiği maksimum süre dikkate alındı. *Bracon hebetor*'da yumurta açılma süresinin laboratuvar şartlarına bağlı olarak ortalama 24-48 saat (Gül ve Gülel, 1995, Dabbağoglu, 2004) arasında değiştiği göz önüne alınarak, P1 grubu konak larvalarından hemolenf örneklerinin alınmasına paralize oluşlarından (paralizasyondan) sonra 72. saate kadar devam edildi. Paralize olan (P1) konak larvalarından hemolenf örnekleri almak için önce konak larvalarının paralize olmaları sağlandı. Bunun için beş ml'lik bir cam tüp içerisine 0-24 saat yaşlı bir dişi, bir erkek ergin parazitoit, bir tane

son evre konak larvası konularak, gözlem altında konak larvasının dişi parazitoit tarafından paralize edilmesi sağlandı. Bu şekilde dişiler tarafından paralize edilen konak larvaları tüplerden çıkarılıp başka tüplere aktararak, her tüp üzerine paralize oluş (paralizasyon) tarihi ve saati yazıldı. P1 grubu larvalarından hemolenf, larvanın üçüncü ön bacağı koparıp mikropiller tüpler yardımıyla çekerek alındı. Hemolenf alma işlemi belirli saat aralıklarıyla farklı larvalar kullanılarak tekrarlandı. Alınan ve 1,5 ml'lik ependorf tüpüne konulan her hemolenf örneğine, melanizasyonu önlemek için bir fenoloksidaz inhibitörü olan birkaç feniltioüre (1-fenil-2-thiourea) kristali konuldu. Bunu takiben hemolenf örneği, içindeki teratositleri ve konak hemositlerini uzaklaştırmak için, 10000g×5dk 4 °C de santrifüj edildikten sonra analiz edilinceye kadar -80°C' de saklandı. P1 grubu konak larvalarından ilk hemolenf örneği paralize olmalarından altı saat sonra, ikinci örnek 12 saat sonra alındı. Hemolenf örneği alma işine altışar saat ara ile 72. saate kadar devam edildi. Böylelikle P1 grubu larvalardan 12 değişik zamanlı hemolenf örneği alındı. Kontrol grubu oluşturmak için paralize olmamış sağlıklı konak larvalarından hemolenf örneği alındı. Belirli bir zaman dilimi için konak populasyonlarından farklı zamanlarda alınan ve paralize olan konak larvaları kullanılarak, hemolenf örnekleri alma işlemleri üç defa tekrarlandı.

3.3.2. Parazitlenmiş ve Üzerinde Parazitoit Larvaları Gelişen Konaklardan (P2) Hemolenf Örneklerinin Alınması

Parazitlenmiş ve üzerinde parazitoit larvaları gelişen konaklardan (P2) hemolenf örnekleri almak için önce konak larvalarının parazitlenmeleri ve üzerlerinde parazitoit larvalarının gelişimi sağlandı. Bunun için 3.1' deki laboratuvar şartlarında her petri kabına bir dişi bir erkek parazitoit ergini ile bir *G. mellonella* son evre larvası konularak, dişilerin 24 saat boyunca konağı parazitlemesi ve üzerine yumurta bırakması sağlandı. Bu süre sonunda kaptaki dişi parazitoit çıkarılarak yumurtaların açılıp parazitoit larvalarının çıkması beklendi. Parazitoit larvası çıkan petri kaplarının üzerine larvaların çıkış tarihi ve saati kaydedildi.

P2 grubu konak larvalarından hemolenf örneklerinin alınmasına, parazitoidin larval gelişim süresinin en fazla 72 saat (Gül ve Gülel, 1995; Dabbağöğlu, 2004) olduğu dikkate alınarak larval hayatın başlamasından itibaren 24 saat ara ile 72. saate kadar devam edildi. P2 konak larvalarından 3.3.1'de belirtilen şekilde alınan ve daha sonra benzer işlemlere tutulan hemolenf örnekleri analizler yapılincaya kadar -80 C de

saklandı. Belirli bir zaman dilimi için konak populasyonlarından farklı zamanlarda alınan ve parazitlenmiş konak larvaları kullanılarak, hemolenf örnekleri alma işlemleri üç defa tekrarlandı.

3.4. HPLC Tekniği ile Amino Asit Analizi

Hazırlanan hemolenf örneklerinde amino asit analizi, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezinde, HPLC cihazı ile, Uçkan (2009) tarafından modifiye edilen metod kullanılarak yapıldı.

3.4.1. Analizlerde Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Analizlerde kullanılan tüm kimyasal maddeler, analitik veya HPLC’de kullanılabilecek saflıkta temin edildi. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin isimleri, marka ve katalog numaraları Çizelge 3.1’ de verildi.

Çizelge 3.1. Analizlerde kullanılan kimyasallar

Madde adı	Marka	Katalog no		Madde adı	Marka	Katalog no
Metanol	Riedel	34885		Glutamin (Gln)	Sigma	G3126
Trietilamin	Fluka	17924		Histidin (His)	Fluka	43011
Phenyl isothiocyante	Sigma	P1034		Arjinin (Arg)	Fluka	08163
Asetonitril	Merck	100030		Alanin (Ala)	Fluka	55329
Fosforik asit	Fluka	79606		Prolin (Pro)	Fluka	94321
Sodyum asetat	Fluka	71185		Tirozin (Tyr)	Fluka	93829
Glasial asetik asit	Merck	100063		Valin (Val)	Fluka	19515
Aspartik asit (Asp)	Fluka	74392		Metiyonin (Met)	Fluka	50272
Glutamik asit (Glu)	Sigma	G2128		Lösin (Leu)	Fluka	80687
Asparajin (Asn)	Fluka	11149		Fenilalanin (Phe)	Fluka	44026
Serin (Ser)	Fluka	61227		Triptofan (Trp)	Fluka	93659
Glisin (Gly)	Fluka	55097		Lizin (Lys)	Fluka	44208
İzolösin (Ile)	Fluka	50271		Treonin (Thr)	Fluka	69356

Amino asit isimlerinin kısaltmaları Nelson ve Cox (2005)’den alındı.

Analizler için hazırlanan örneklerin türevlendirilmesinde ve çözülmesinde kullanılan çözeltiler:

1. Çözelti: Metanol-Su-TEA(trietilamin) karışımı (2:2:1), 100 mL

2. Çözelti: Metanol-Su-TEA-PITC (Fenilisotiyosiyanat) karışımı (7:1:1:1, v/v) türev reaktifidir, 100 mL

3. Çözelti: %5 Asetonitril içeren 5 mM 100 mL Na₂HPO₄, pH:7,43'e fosforik asit ile ayarlandı

Örneklerin HPLC'de analizi sırasında hareketli fazı oluşturan çözeltiler:

A Çözeltisi: %0,05 TEA (v/v) içeren 0,14 M 500 mL Sodyum asetat tamponu (glasiyel asetik asit ile pH:6,2'ye ayarlandı)

B Çözeltisi: Asetonitril-Su karışımı (60:40) 500 mL

Not: Çözeltiler HPLC'de kullanılabilecek saflıktaki su ile hazırlandı.

3.4.2. Örneklerin HPLC'de Analiz için Hazırlanması ve Fenilisotiyosiyanat ile Türevlendirme

Stoklanan hemolenf örneklerinin HPLC'de analiz işlemleri için sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı;

1-Derin dondurucuda -80°C'da saklanan hemolenf örnekleri derin dondurucudan çıkarılarak eriyene kadar oda sıcaklığında bekletildi.

2-Eriyen hemolenften 4µl alınarak bir ependorf tüpüne konulup üzerine 10µl saf su ve 87µl asetonitril eklendi ve tüpteki karışım pipet ile çekip-bırakarak karıştırıldı.

3-Karışım 8000g'de, oda sıcaklığında (22°C) bir dakika santrifüj edildi.

4-Tüpte oluşan süpernatanttan 95µl alınarak ikinci bir ependorfa konuldu ve bu ikinci tüp de 8000g'de oda sıcaklığında üç dakika santrifüj edildi.

5-Oluşan süpernatanttan bir ependorfa 80µl alınarak tüpün ağzı açık durumda 2 saat 65°C'ye ayarlanmış etüvde tutuldu.

6-Etüvden alınan tüpe 3.4.1'de belirtilen 1 nolu çözeltiden (Metanol-Su-TEA karışımı) 6 µl eklendi ve bu tüp yine ağzı açık halde 10 dakika 65°C'ye ayarlı etüvde tutuldu.

7-On dakika sonra etüvden çıkarılan tüpe 3.4.1. de belirtilen 2 nolu (Metanol-Su-TEA-PITC karışımı)türevlendirme reaktifi çözeltisinden 6 µl eklenip en az iki defa pipetaj yapıldıktan sonra ependorfun ağzı kapatılarak 30 sn özel bir karıştırıcı (vorteks) ile karıştırıldı.

8-Bu tüp önce 20 dk oda sıcaklığında, sonra ağzı açılarak 15 dk 65°C'ye ayarlı etüvde tutuldu.

9-Belirtilen işlemlere tabi tutulan tüpteki karışıma, HPLC aletine enjeksiyondan önce 3.4.1.de belirtilen 3 nolu çözeltiden (%5 Asetonitril içeren 5 mM 100 mL Na₂HPO₄, H₃PO₄ eklenerek pH: 7,43'e ayarlandı) 150 µl ilave edip 15 saniye vorteks ile karıştırarak örnek enjeksiyona hazır hale getirildi.

Standart amino asitlerden katı olan Tyr, Gln, Glu, Asn ve Trp 1M HCl içerisinde 100 mM olacak şekilde çözüldükten sonra, buz dolabında saklanan sıvı haldeki standart amino asitler de oda sıcaklığına getirildikten sonra, her biri için hemolenf örneklerinin hazırlanmasında uygulanan işlemler uygulanarak türevlendirildi ve HPLC' ye yüklendi. Önce türevlendirilmiş 19 standart amino asit tek tek alıkonma süreleri ve kromatogramları, daha sonra bu türevlendirilmiş amino asitlerin karışımı hazırlanarak 19 standart amino asit türevine ait kromatogram elde edildi (Şekil 4.1).

3.4.3. Kromatografik Prosedür

Analizler, 20 µl enjeksiyon bölmesine ve UV Absorbans dedektöre sahip, Agilent 1100 model HPLC cihazı kullanılarak yapıldı. Analizlerde, dolgu maddesi silika, uzunluğu 12.5 cm, partikül büyüklüğü 5 µm, por büyüklüğü 100 Å, por hacmi 1.0 mL/g, yüzey alanı 300 m²/g, iç çapı 4.0 mm olan C18 (ACE-121-1204) kolon kullanıldı. Kolon sıcaklığı 27±1°C ve dalga boyu 254 nm olarak sabitlendi. Mobil faz olarak 3.4.1' de verilen A ve B çözeltilerinden hazırlanan aşağıdaki gradiyent uygulandı (Çizelge 3.2). Belirli bir zaman dilimi için larvalardan farklı zamanlarda alınan her hemolenf örneği tekrarlanabilirlik değerlendirilmesi için üç defa analiz edildi. Üç değer in ortalamasına göre amino asit miktarı değerlendirildi.

Çizelge 3.2. Amino asitlerin ayırımında uygulanan gradiyent programı

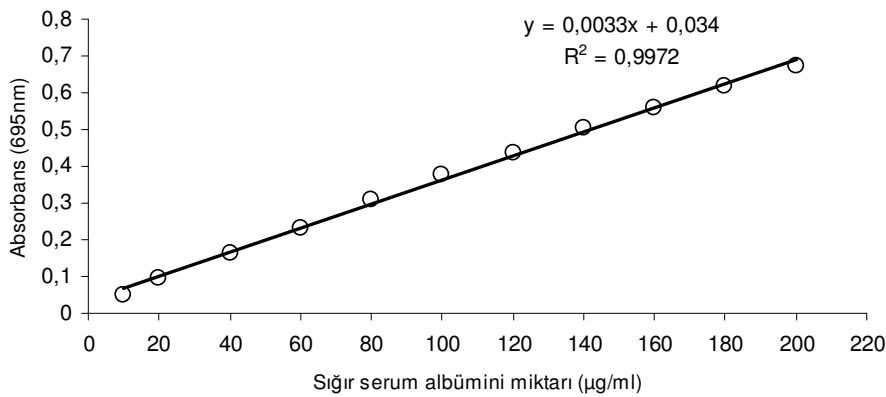
Süre (dk)	Akış Hızı (ml/dk)	% A	%B
0	0.9	90	10
8.0	0.9	90	10
10.0	0.9	70	30
14.0	0.9	70	30
20.0	0.9	52	48
22.0	0.9	0	100
25.0	0.9	0	100
28.0	0.9	90	10
35.0	0.9	90	10

3.5. Elde Edilen Kromatogramların Değerlendirilmesi

3.4.2’de belirtilen şekilde hazırlanan numuneler HPLC cihazında analiz edildikten sonra elde edilen her kromatogramdaki değişik alıkonma zamanları, standart amino asit türevlerine ait kromatogramlardaki ve miksteki alıkonma zamanları ile karşılaştırılarak numunelerdeki amino asitlerinin çeşitleri belirlendi. Bir amino asitin yüzdesi ise, cihazın numunedeki her amino asit için otomatik olarak hesaplayıp verdiği alan değerini o numunede belirlenen tüm amino asitlerin toplam pik alanına oranlayarak hesaplandı.

3.6. Toplam Protein Analizi

3.3.1 ve 3.3.2 de belirtilen konak larvalarından alınan hemolenf örneklerindeki toplam protein miktarını belirlemek için önce protein standart grafiği çizildi. Protein standart grafiği için %0.1’lik Sığır Serum Albumin çözeltisi kullanıldı. Önce stok standart çözelti konsantrasyonunun 1 mg/ml olması sağlandı. Daha sonra stok standart çözeltiden seyreltme yöntemi ile protein konsantrasyonu 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 µg/ml olan standart çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler Lowry metoduna tabi tutularak, spektrofotometrede 695 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okundu. İşlemler her standart çözelti konsantrasyonu için üç kez tekrarlandı. Elde edilen absorbans değerleri ile standart protein grafiği çizildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Standart protein grafiği

Konak larvalarının hemolenfindeki protein analizinde Lowry ve ark. (1951)’nin geliştirdiği yöntem esas alındı. Bunun için daha önceden -80°C’de saklanan örnekler, derin dondurucudan çıkarılarak buzlu ortama alındı. Her bir ependorf tüpünden alınan 3

µl hemolenf 500 kat seyreltilerek, bunlara Lowry yöntemi uygulandı ve spektrofotometrede 695 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Her örnek için üç paralel test tüpü hazırlandı ve bunlara ait ortalama absorbans değerleri, protein standart grafiğinden elde edilen regresyon doğrusu denkleminde (Şekil 3.2) yerine konularak hemolenf örneklerinin toplam protein miktarı mililitrede miligram (mg/ml) cinsinden hesaplandı.

3.7. Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Paralizlenme ve parazitlenmeye bağlı olarak *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki amino asitlerin yüzdelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Bu testten elde edilen sonuçların önem seviyeleri ‘Tukey’ testi kullanılarak değerlendirildi. Değerlendirilmelerde 0.05 güven sınırı esas alındı.

4. BULGULAR

4.1. Standart Amino Asitlere Ait Bulgular

HPLC analizleri sonucu elde edilen fenilisotiyosiyanat ile türevlendirilmiş 19 standart amino asitin alıkonma zamanları ve alan değerleri Çizelge 4.1’de ve bu amino asitlerin karışımına ait kromatogram ise Şekil 4.1’de verilmiştir.

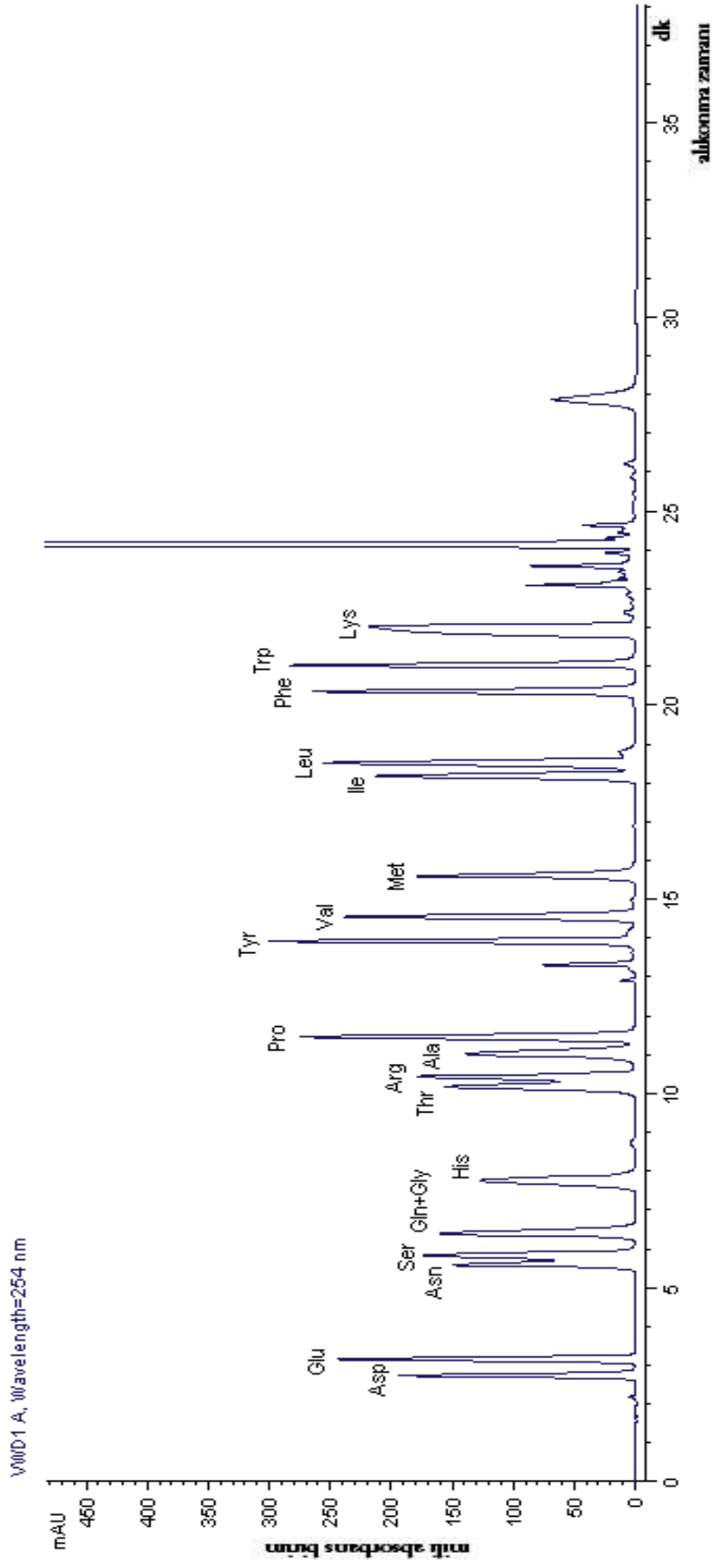
Çizelge 4.1. Standart amino asitlere ait alıkonma zamanları ve alan değerleri

Sıra	Alıkonma Zamanı (dk)	Alan	Amino asit	
1	2.861	1171	Aspartat	Asp
2	3.365	1610.5	Glutamat	Glu
3	5.326	1396.7	Asparajin	Asn
4	5.563	1757.6	Serin	Ser
5	6.187	1743.1	Glutamin/Glisin	Gln/Gly
6	7.524	1697.5	Histidin	His
7	9.91	1528.3	Treonin	Thr
8	10.438	1882.6	Arjinin	Arg
9	10.887	1703.4	Alanin	Ala
10	11.231	2119.8	Prolin	Pro
11	13.736	2079.3	Tirozin	Try
12	14.533	1691.4	Valin	Val
13	15.544	1697.9	Metiyonin	Met
14	18.316	1841.6	İzolösin	Ile
15	18.660	2092.6	Lösin	Leu
16	20.302	1864	Fenilalanin	Phe
17	20.997	1962.2	Triptofan	Trp
18	22.030	3434.5	Lizin	Lys

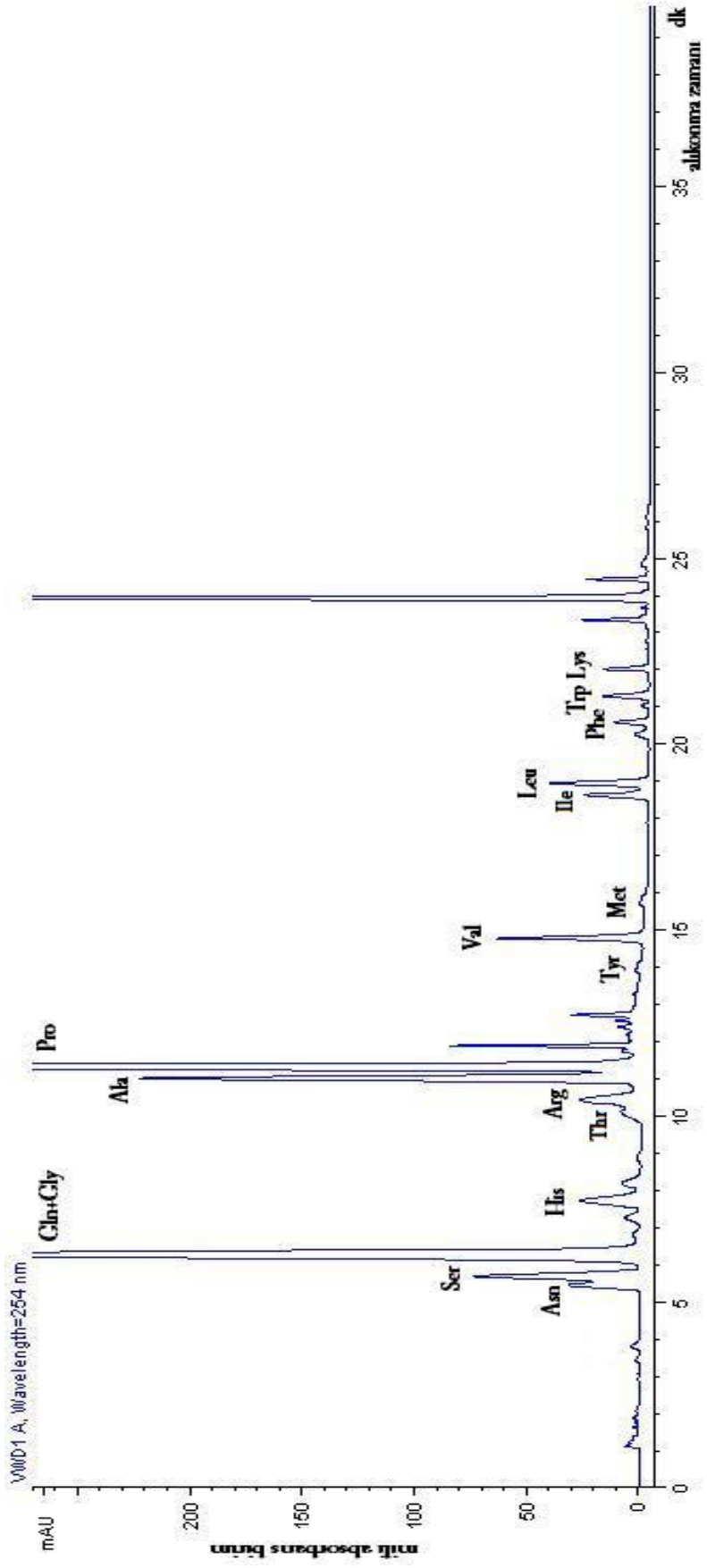
4.2. Paralize Olan Konak Larvalarından Alınan Hemolenf Örneklerine Ait Bulgular

4.2.1. Amino Asit Analizi İle İlgili Bulgular

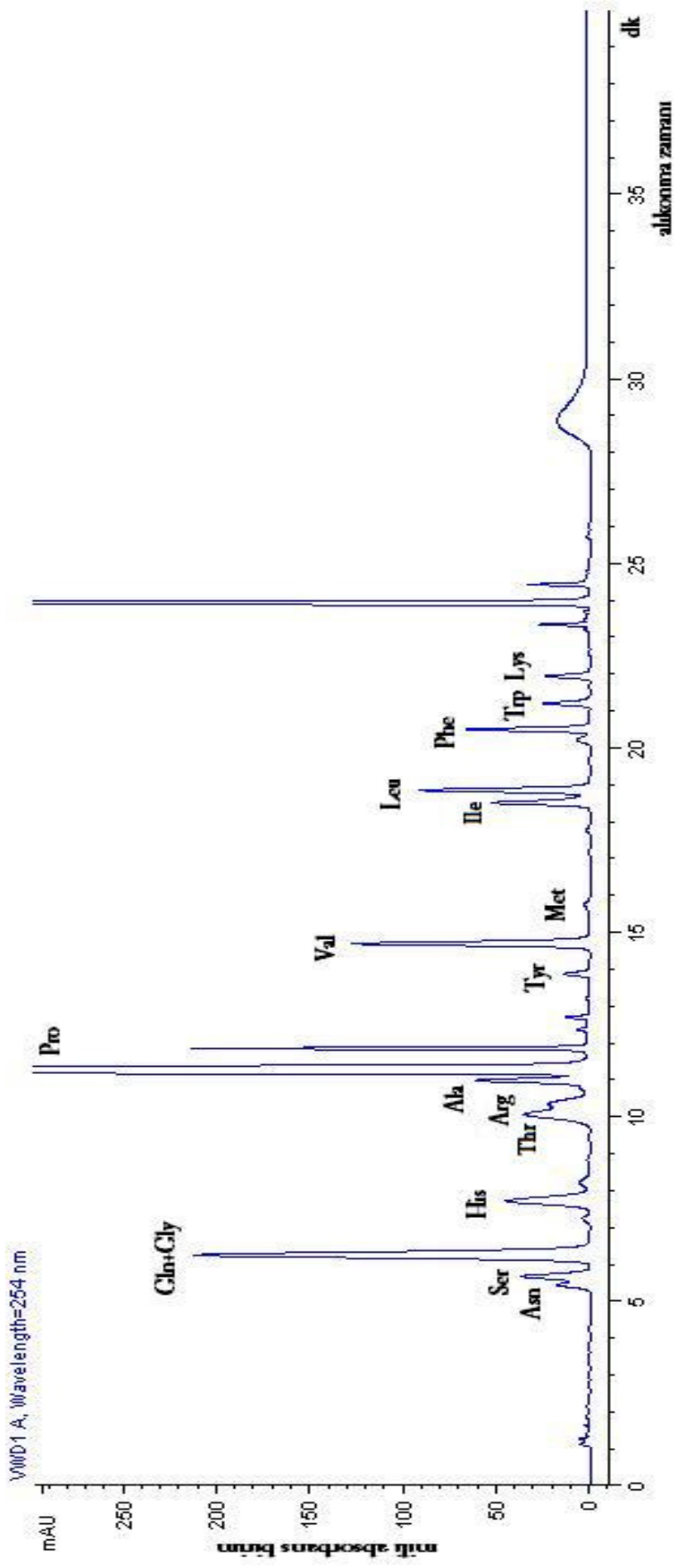
Şekil 4.2’de kontrol grubunu oluşturan parazitlenmemiş konak larvalarının hemolenfindeki serbest amino asitlere ait kromatogram, Çizelge 4.2’de parazitoit tarafından sadece paralize edilen konak larvalarının (P1) hemolenfindeki serbest amino asitlerin yüzdesinde paralize olduktan (paralizasyondan) sonra geçen süreye bağlı olarak ortaya çıkan değişimler ve Şekil 4.3 – 4.5’de analiz edilen hemolenf örneklerine ait bazı kromatogramlar görülmektedir.



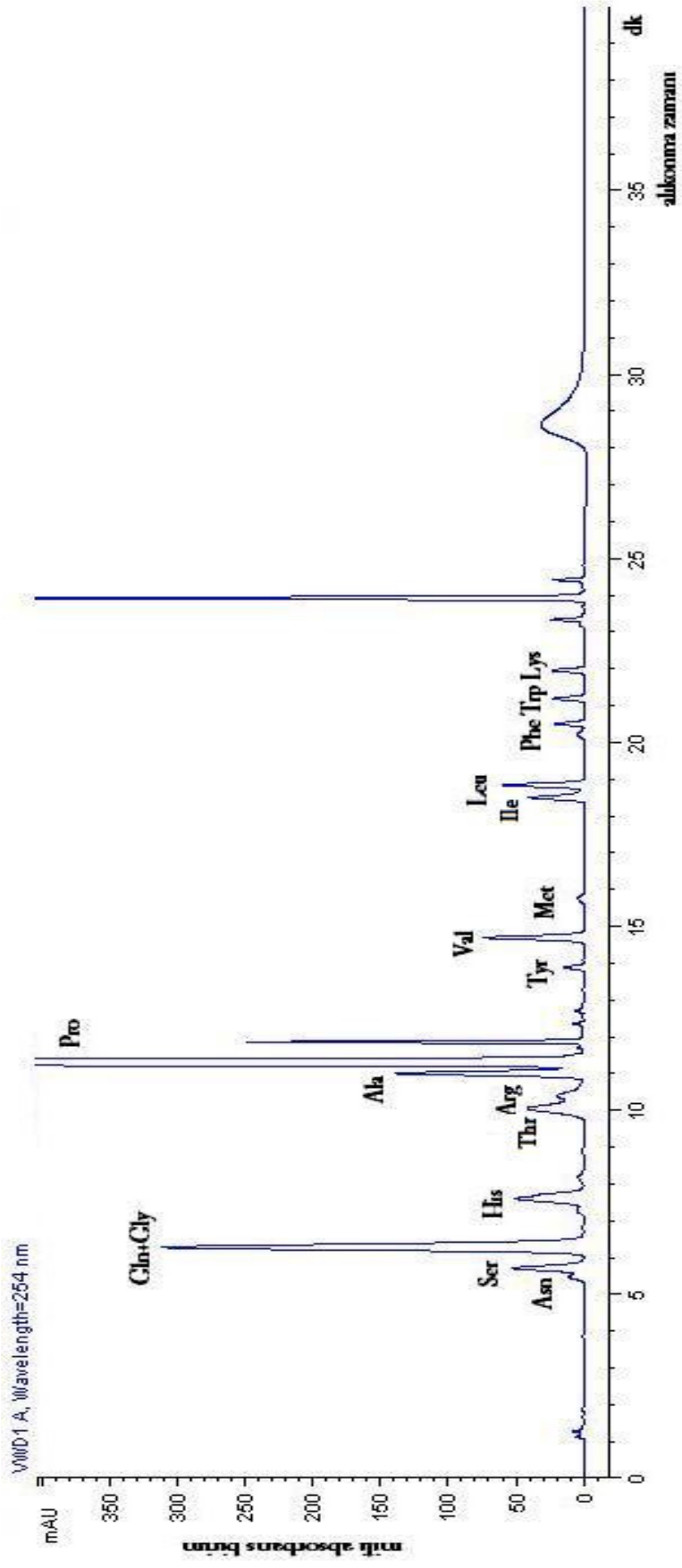
Şekil 4.1. Standart amino asitler karışımının kromatogramı



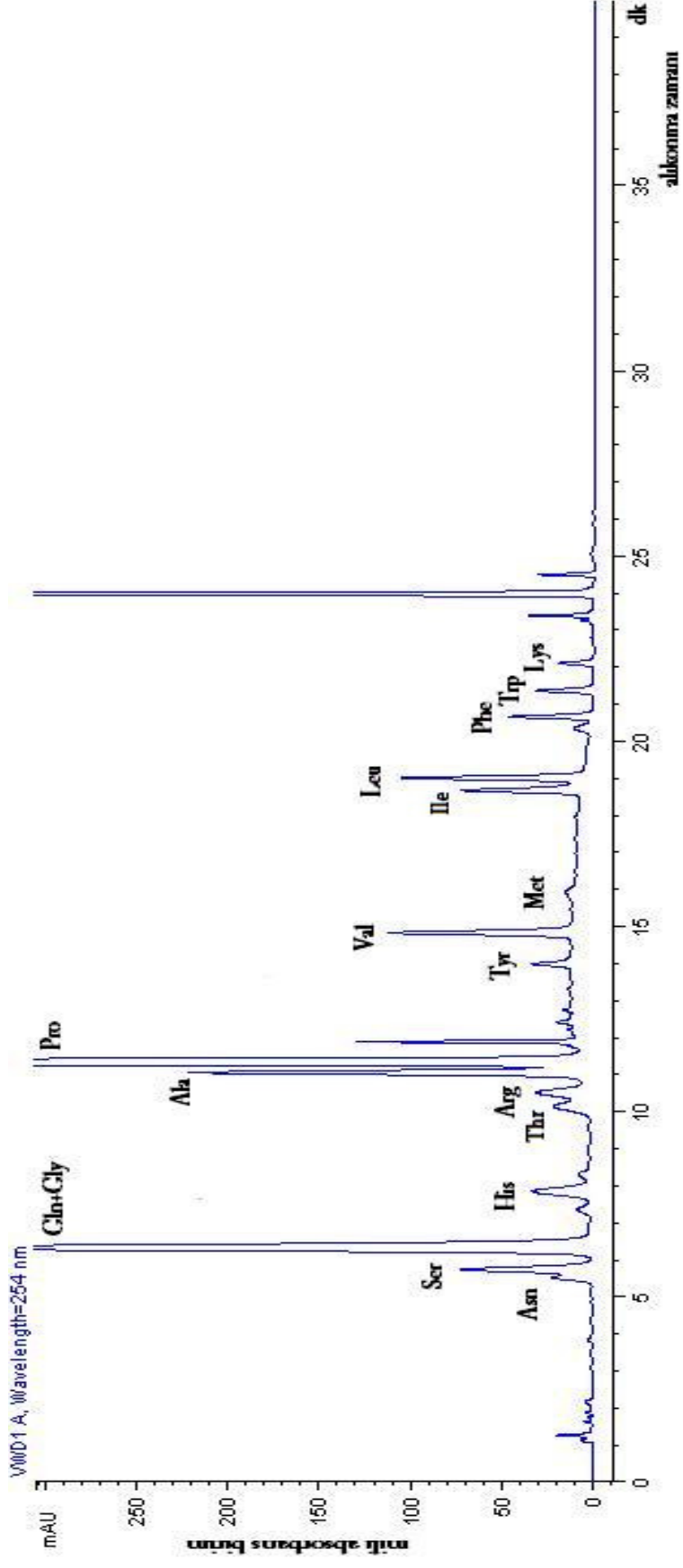
Şekil 4.2. Parazitlenmemiş konak, *G. mellonella*, larvasının hemolenfindeki serbest amino asitlere ait kromatogram



Şekil 4.3. Paralizasyondan yirmi dört saat sonra konak, *G. mellonella*, larvasının hemolenfindeki serbest amino asitlere ait kromatogram



Şekil 4.4. Paralizasyondan kırk sekiz saat sonra konak, *G. mellonella*, larvasının hemolenfindeki serbest amino asitlere ait kromatogram



Şekil 4.5. Paralizasyondan yetmiş iki saat sonra konak, *G. mellonella*, larvasının hemolenfindeki serbest amino asitlere ait kromatogram

Çizelge 4. 2. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak *G. mellonella* larvasının hemolenfindeki serbest amino asitlerin yüzde değerleri

Amino asitler	% Amino asit (Ort±SH)														
	Paralizlendikten sonra geçen süre (Saat)														
Kontrol	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72			
Asn	1.25±0.07 A	0.74±0.09 B	0.57±0.10 B	0.73±0.10 B	0.58±0.08 B	0.62±0.07 B	0.43±0.02 B	0.60±0.08 B	0.43±0.03 B	0.67±0.12 B	0.77±0.13 B	0.80±0.07 B			
Ser	3.04±0.33 A	1.50±0.22 B	1.54±0.28 B	1.57±0.05 B	2.17±0.22 AB	2.28±0.14 AB	1.85±0.15 AB	2.04±0.26 AB	1.74±0.25 AB	2.00±0.50 AB	2.36±0.51 AB	2.78±0.03 AB			
Gln+Gly	17.08±1.82 A	13.85±0.85 A	13.45±1.76 A	12.84±1.71 A	13.87±1.46 A	15.16±1.73 A	12.51±2.69 A	15.04±1.85 A	11.07±0.62 A	13.77±2.58 A	18.11±1.06 A	16.67±1.58 A			
His	2.29±0.45 A	2.24±0.08 A	2.00±0.15 A	2.68±0.12 A	2.48±0.29 A	2.58±0.28 A	2.29±0.21 A	2.66±0.44 A	1.90±0.10 A	2.08±0.11 A	1.82±0.13 A	1.83±0.05 A			
Thr	1.20±0.43 B	1.14±0.31 B	1.04±0.13 B	1.84±0.35 B	0.91±0.10 B	5.54±0.83 A	2.11±0.81 B	2.40±0.68 B	2.28±0.70 B	1.62±0.29 B	1.36±0.05 B	1.86±0.40 B			
Arg	2.34±0.30 A	2.17±0.08 A	2.18±0.11 A	1.65±0.30 A	2.00±0.25 A	2.22±0.26 A	2.49±0.67 A	1.65±0.02 A	1.70±0.11 A	1.56±0.07 A	1.57±0.10 A	1.48±0.31 A			
Ala	7.15±1.06 A	0.61±0.05 F	1.22±0.16 EF	2.03±0.21 DEF	2.78±0.21 CDEF	4.47±0.92 ABCDE	4.81±0.60 ABCD	6.13±0.88 AB	5.67±0.42 ABC	3.52±1.37 BCDEF	4.60±0.34 ABCD	6.72±0.05 AB			
Pro	56.67±1.24 ABC	64.84±0.34 AB	67.36±1.59 A	62.24±1.52 ABC	62.61±2.74 ABC	53.64±3.29 C	62.43±1.03 ABC	57.06±0.83 ABC	62.34±1.29 ABC	60.50±3.85 ABC	54.43±1.97 BC	54.23±3.23 BC			
Try	0.46±0.22 A	0.69±0.23 A	0.59±0.13 A	0.66±0.28 A	0.50±0.25 A	1.07±0.35 A	0.66±0.35 A	0.65±0.15 A	0.67±0.28 A	0.51±0.17 A	0.87±0.39 A	1.22±0.75 A			
Val	2.93±0.41 A	3.83±0.46 A	3.18±0.32 A	4.08±0.31 A	3.46±0.28 A	3.81±0.55 A	3.21±0.15 A	3.54±0.38 A	3.41±0.54 A	3.84±0.49 A	3.84±0.48 A	3.75±0.76 A			
Met	0.24±0.05 A	0.33±0.08 A	0.14±0.03 A	0.32±0.07 A	0.27±0.09 A	0.40±0.10 A	0.34±0.09 A	0.39±0.05 A	0.30±0.10 A	0.32±0.05 A	0.40±0.17 A	0.43±0.11 A			
Ile	1.41±0.16 A	1.92±0.20 A	1.74±0.09 A	2.50±0.70 A	2.24±0.35 A	2.14±0.34 A	2.01±0.24 A	2.24±0.41 A	2.64±0.64 A	2.82±0.73 A	3.01±0.87 A	2.30±0.21 A			
Leu	1.80±0.30 A	2.86±0.33 A	2.34±0.07 A	3.19±0.83 A	3.00±0.35 A	3.19±0.64 A	3.55±0.97 A	2.73±0.42 A	3.20±0.78 A	3.85±0.75 A	3.93±0.85 A	3.12±0.39 A			
Phe	0.69±0.14 B	1.49±0.19 AB	1.22±0.17 AB	1.92±0.02 A	1.53±0.11 AB	1.23±0.20 AB	1.16±0.15 AB	1.24±0.28 AB	1.40±0.34 AB	1.47±0.31 AB	1.35±0.23 AB	1.15±0.15 AB			
Trp	0.75±0.06 A	0.87±0.06 A	0.74±0.01 A	0.86±0.13 A	0.93±0.06 A	0.87±0.12 A	0.84±0.15 A	0.81±0.03 A	0.77±0.06 A	0.98±0.17 A	0.93±0.10 A	0.91±0.02 A			
Lys	0.70±0.15 A	0.91±0.13 A	0.71±0.04 A	0.88±0.13 A	0.67±0.01 A	0.78±0.07 A	0.69±0.13 A	0.81±0.19 A	0.47±0.03 A	0.51±0.07 A	0.65±0.10 A	0.55±0.01 A			

Aynı satırda aynı büyük harf ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemsizdir p>0.05

Çizelge 4.2'den kontrol grubundaki larvaların hemolenf örneklerindeki serbest amino asitlerin yüzde değerlerinin önemli derecede farklı ($p \leq 0.05$) olduğu görülmektedir. Kontrol grubunda en yüksek yüzdeye sahip olan amino asit yüzde 56.67 ile prolin'dir. Prolini, sırasıyla Glutamin+Glisin (17.08), Alanin (7.15), Serin (3.04), Valin (2.93), Arjinin (2.34), Histidin (2.29), Lösin (1.80), İzolösin (1.41), Asparajin (1.25), Theronin (1.20), Triptofan (0.75), Lizin (0.70), Fenilalanin (0.69), Tirozin (0.46) ve Metiyonin (0.24) izlemektedir (Çizelge 4.2). Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak paralize olmuş larvaların hemolenfindeki bazı serbest amino asitlerin yüzde değerleri arasında önemli ($p \leq 0.05$) farklılıkların olduğu, bu farklılıkların amino asit çeşidine göre değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.2) (Şekil 4.6-4.21). Analizlerde kullandığımız prosedür ile kontrol grubu larvaların hemolenfinde ve incelenen diğer hemolenf örneklerinde, Aspartat, Glutamat ve Sistein tespit edilemedi. Çalışmamızda sistein standardının türevlendirilerek HPLC'ye yüklenmesi sonucu diğer standart amino asitlerden farklı olarak üç farklı pik ve alıkonma zamanı gözlemlendi. Bunlardan hangisinin sisteine, hangisinin türevlerine ait olduğuna karar verilemedi. Bu nedenle tesbit edilemeyen üç amino asit tezimizde değerlendirilmedi.

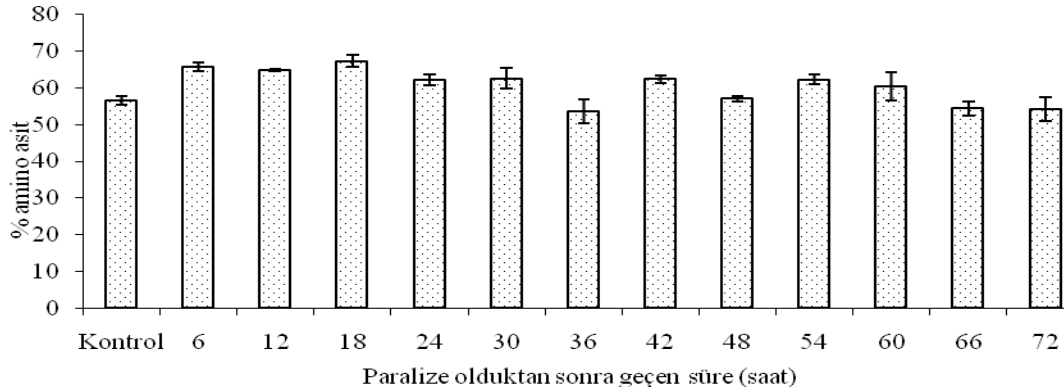
Konak larvalarının hemolenfindeki amino asitler, paralizasyondan sonra geçen sürede, yüzdelерinde ortaya çıkan değişmelerin önemli olup olmadığı dikkate alınarak, iki grup altında değerlendirildi. Birinci grupta paralizasyondan sonra miktarlarında önemli değişiklikler olan amino asitler, ikinci grupta da miktarlarında önemli değişiklikler olmayan amino asitler ele alındı.

4.2.1.1. Paralizasyondan Sonra Miktarlarında Önemli Değişiklikler Olan Amino Asitler

Konak larvalarında paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak, hemolenfdeki miktarlarında önemli değişiklikler olan amino asitler prolin, serin, alanin, fenil alanin, asparajin ve treonin'dir. Bu amino asitlerin yüzdelерinde tespit edilen değişmeler Şekil 4.6- 4.11 ve Çizelge 4.2 de verilmiştir.

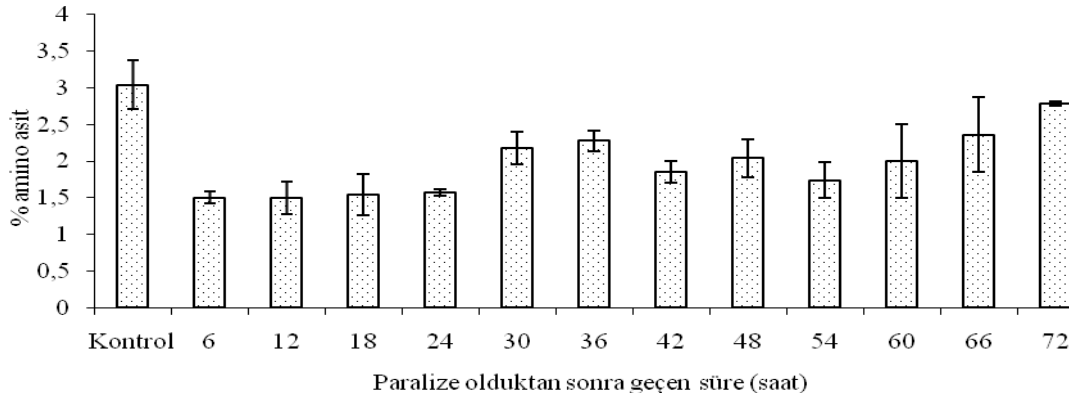
Kontrol grubu larvalarında yüzde 56.67 olarak tespit edilen prolin yüzdesi, paralizasyondan sonraki altıncı saatte yüzde 65.77 olduğu ve daha sonraki saatlerde prolin yüzdesinin az çok değişmeden kaldığı tespit edildi (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.2). Ayrıca Çizelge 4.2'den paralize olan konak larvalarının hemolenfinde, paralizasyondan

sonraki her zaman diliminde, prolin yüzdesinin diğer amino asitlere oranla daha fazla olduğu görülmektedir.



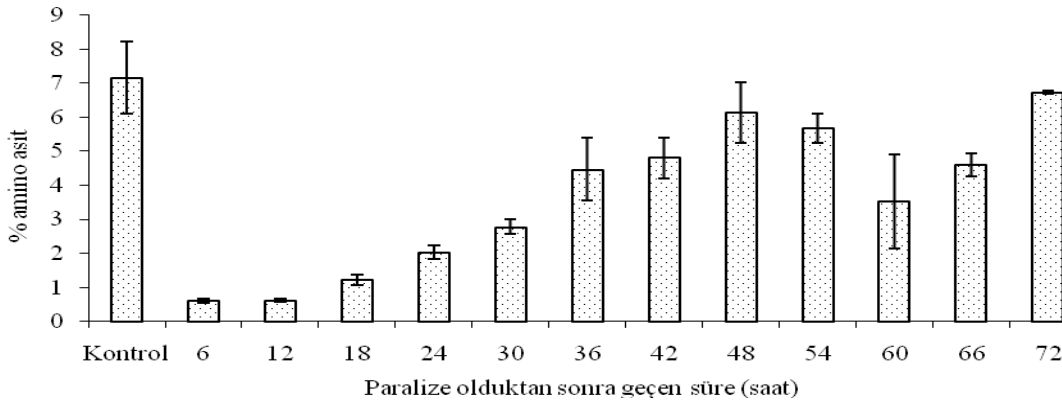
Şekil 4.6. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki prolin yüzdesinin değişimi

Paralize olan konak larvalarında serin yüzdesinin paralizasyondan sonraki ilk 24 saatte hızlı bir düşüş gösterdiği fakat daha sonra genel olarak arttığı tespit edildi (Şekil 4.7). Kontrol grubu larvalarda yüzde 3.04 olarak tayin edilen serin miktarının, paralizasyondan sonraki 24. saatte 1.57'ye düştüğü, daha sonra yavaş yavaş artarak paralizasyonun 30. saatinden sonra kontrol grubundaki değerden farksız ($p > 0.05$) hale geldiği görüldü (Çizelge 4.2).



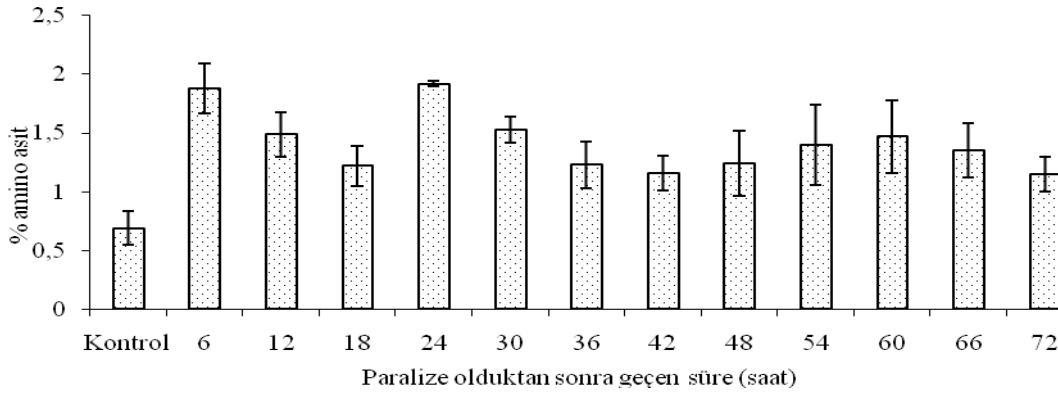
Şekil 4.7. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki serin yüzdesinin değişimi

Kontrol grubuna göre, paralize olan konak larvalarında alanin yüzdesi paralizasyondan sonraki ilk 12 saatte çok hızlı bir düşüş olduğu görüldü (Şekil 4.8). Kontrol grubu larvalarda yüzde 7.15 olarak tayin edilen alanin miktarı, paralizasyondan sonraki 12. saatte 0.61 olarak tespit edildi. Paralize olan konak larvalarında 18. saatten sonra alanin miktarı küçük dalgalanmalar gösterse de genel olarak tekrar yavaş yavaş arttı ve 72. saatte 6.72'ye yükseliş gösterdi (Çizelge 4.2).



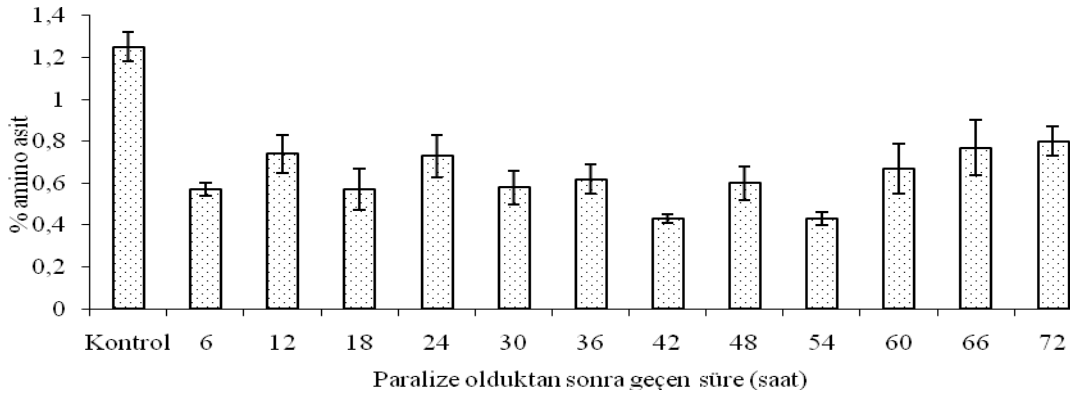
Şekil 4.8. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki alanin yüzdesinin değişimi

Paralizasyonu takiben larvalardaki fenilalanin miktarında kontrol grubundakilere göre önemli ($p \leq 0.05$) bir artış ortaya çıktığı, artış miktarının paralizasyon sonrası geçen zamana göre farklı olduğu görülmektedir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.9). Kontrol grubu larvalarda yüzde 0.69 olarak tayin edilen fenilalanin miktarı, paralizasyondan sonraki 6. saatte 1.88 olarak tespit edildi.



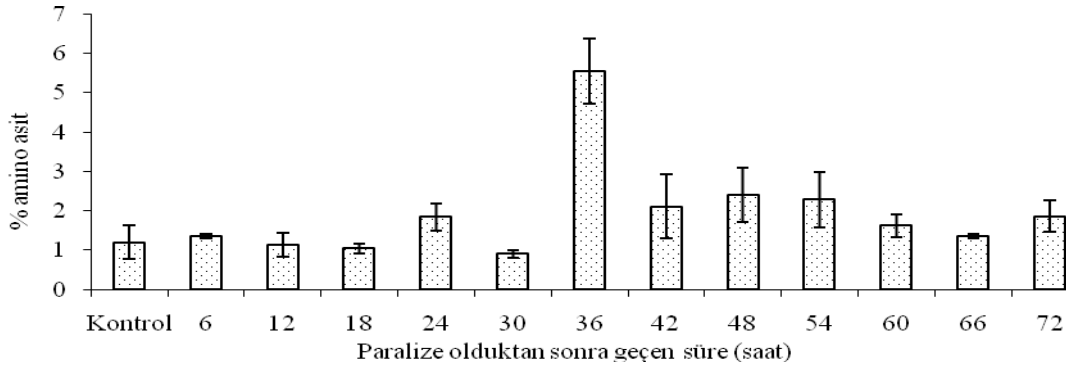
Şekil 4.9. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki fenilalanin yüzdesinin değişimi

Paralize olan konak larvalarındaki asparajin miktarının paralizasyondan sonra azaldığı tespit edildi (Şekil 4.10). Kontrol grubu larvalarda yüzde 1.25 olarak tespit edilen asparajin miktarı, paralizasyondan sonraki 6. saatte 0.57'ye, 24, 36 ve 72. saatlerde sırasıyla 0.70, 0.62 ve 0.80'e azaldığı görüldü (Çizelge 4.2). Kontrol grubu ile paralize olan larvaların asparajin değerleri arasında önemli bir fark olsa da ($p \leq 0.05$) paralizasyondan sonra geçen süredeki asparajin değerleri arasında önemli bir fark görülmedi ($p > 0.05$) (Çizelge 4.2).



Şekil 4.10. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki asparajin yüzdesinin değişimi

Paralize olduktan sonra geçen süreye bağlı olarak genellikle treonin miktarında önemli bir değişiklik ortaya çıkmadı, sadece paralizasyondan sonraki 36. saatte nedeni tam anlaşılmayan anormal bir artış meydana geldi. Paralizasyondan sonraki 36. saat değeri ile diğer değerler arasındaki farklar önemlidir ($P \leq 0.05$) (Şekil 4.11 ve Çizelge 4.2).



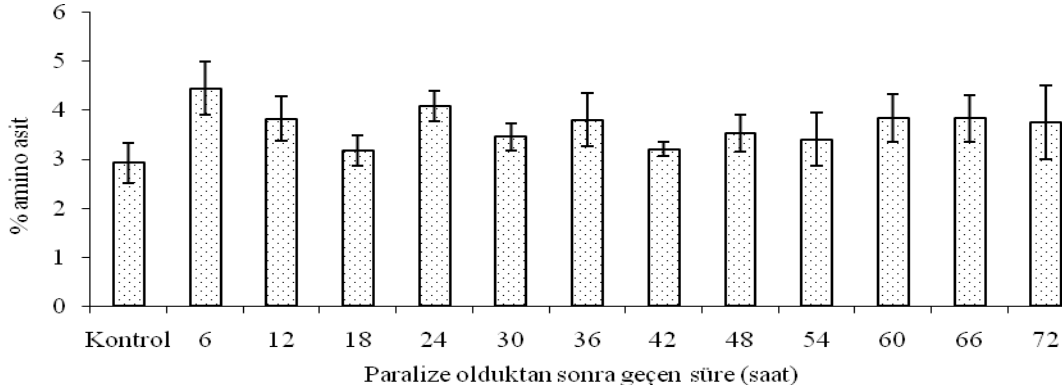
Şekil 4.11. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki treonin yüzdesinin değişimi

4.2.1.2. Paralizasyondan Sonra Miktarlarında Önemli Değişiklikler Olmayan Amino Asitler

Konak larvalarında paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak, hemolenfdeki miktarlarında önemli değişiklikler olmayan amino asitler valin, lösin, izolösin, histidin, triptofan, lizin, tirozin, metiyonin, arjinin ve glisin+glutamindir. Şekil 4.12- 4.21 ve Çizelge 4.2 de bu amino asitlerin yüzdelерinde tespit edilen değişimler

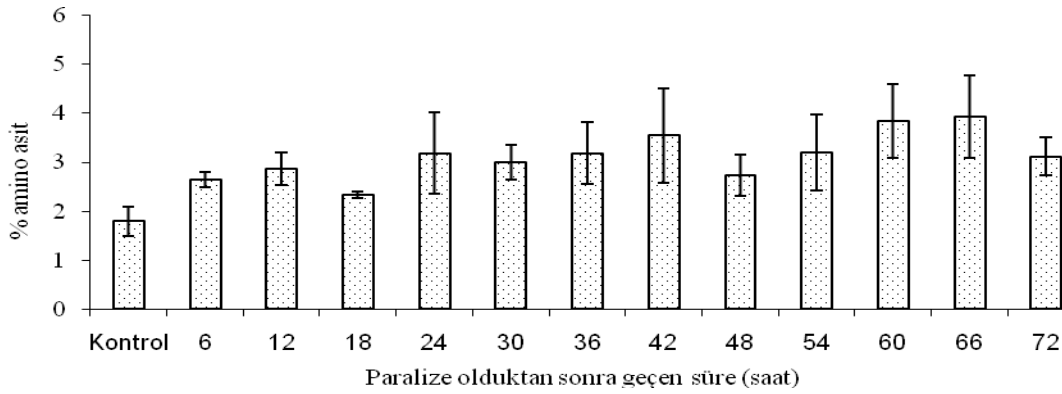
verilmiştir. Şekil 4.12- 4.21 ve Çizelge 4.2’den, paralizasyon sonrası geçen süreye bağlı olarak konak larvalarında bu amino asitlerin her birinin miktarında kendi kontrol gruplarına göre, bazı farklılıkların ortaya çıktığı, fakat bu farklılıkların önemsiz ($p > 0.05$) olduğu görülmektedir.

Valin yüzdesinde paralizasyondan 72 saat sonrasına kadar bir artışın ortaya çıktığı ve bu artışın en fazla paralizasyondan altı saat sonra meydana geldiği tespit edildi (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.2). Kontrol grubunda 2.93 olan valin yüzdesi paralizasyondan altı saat sonra 4.45 oldu. Altıncı saatten sonra valin miktarındaki değişimler altıncı saat değerinden daha az oldu. Kontrol grubuna göre paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak valin miktarlarında ortaya çıkan farklılıklar önemsizdir ($p > 0.05$).



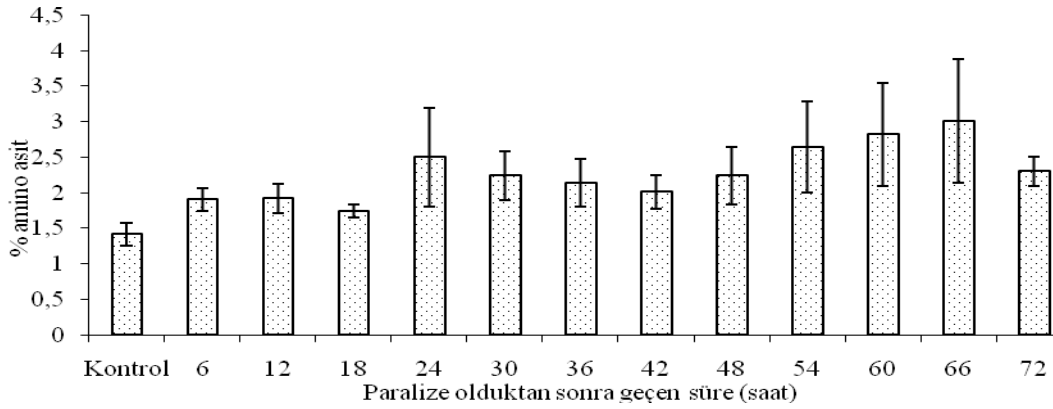
Şekil 4.12. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki valin yüzdesinin değişimi

Paralizasyondan sonra lösin yüzdesinde tespit edilen değişimler Şekil 4.13 ve Çizelge 4.2’de verilmektedir. Şekil 4.13 ve çizelge 4.2’den paralizasyondan 72 saat sonrasına kadar kontrol grubuna göre önemsiz de olsa ($p > 0.05$) lösin yüzdesinde bir artış olduğu görülmektedir. Bu artış paralizasyondan sonraki ilk 12 saatte daha az, fakat paralizasyondan sonraki 24. saatten itibaren daha fazla olduğu belirlendi. Kontrol grubunda 1.80 olan lösin yüzdesi paralizasyondan sonraki 12, 24 ve 72. saatlerde sırası ile 2.86, 3.19 ve 3.12 olarak tespit edildi. Paralizasyondan sonraki lösin miktarları arasında görülen farklılıklar önemsizdir ($p > 0.05$).



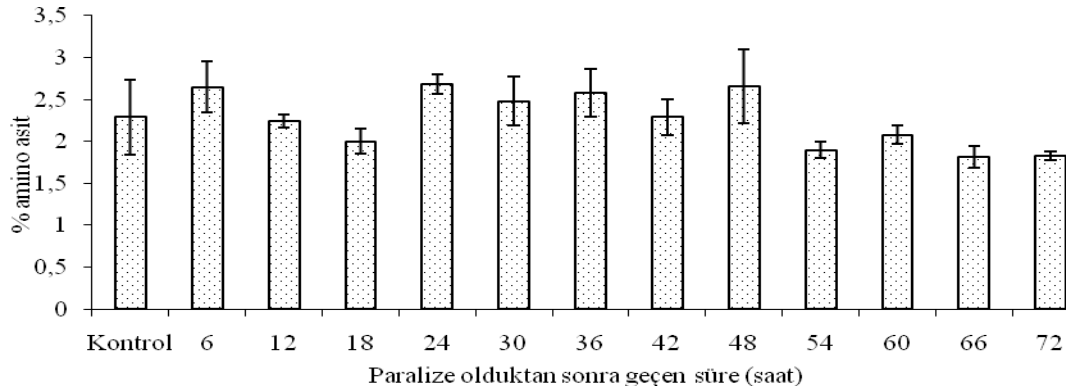
Şekil 4.13. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki lölösün yüzdesinin değişimi

Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak izolösün yüzdelinde tespit edilen değişimler Şekil 4.14 ve Çizelge 4.2 de verilmektedir. İzölösün miktarının paralizasyondan 24 saat sonra arttığı görüldü. Kontrol grubunda 1.41 olan izolösün yüzdesi paralizasyondan sonraki 6. ve 12. saatlerde sırası ile 1.91 ve 1.92 iken, paralizasyondan sonraki 24. saatte 2.50 olmuş ve 72 saat boyunca yaklaşık olarak bu değerini korudu. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak izolösün miktarında bir artış olsa da kontrol grubuna göre bu artış önemsizdir ($p > 0.05$).



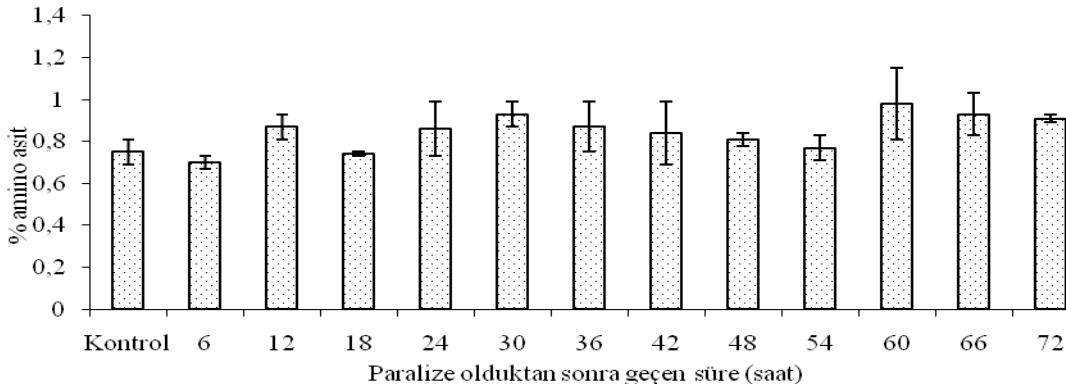
Şekil 4.14. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki izolösün yüzdesinin değişimi

Paralizasyon hemolenfteki histidin yüzdesinde önemli bir değişiklik ortaya çıkarmadı ($p > 0.05$). Kontrol grubunda 2.29 olan histidin yüzdesi, paralizasyondan 12, 24 ve 48 saat sonra sırası ile 2.24, 2.68 ve 2.66 olarak tespit edildi. Paralizasyondan 72 saat sonra histidin miktarı biraz düşmüş gibi görünse de bu düşüş önemli değildir ($p > 0.05$) (Şekil 4.15 ve Çizelge 4.2).



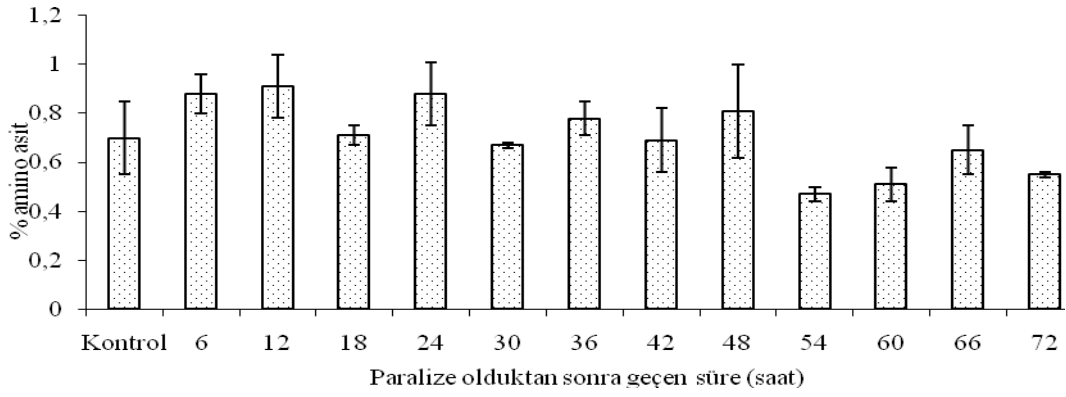
Şekil 4.15. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki histidin yüzdesinin değişimi

Kontrol grubunda 0.75 olan triptofan yüzdesinin, paralizasyondan 12, 24 ve 48 saat sonra sırası ile 0.87, 0.86 ve 0.81 olduğu, bu değerler arasında önemli bir farkın olmadığı ($p > 0.05$) belirlendi. Paralizasyonun 60. saatinden sonra triptofan miktarında biraz artış varmış gibi görünse de bu artışın da önemsiz olduğu ve triptofan yüzdesinde paralizasyondan sonra geçen zamana bağlı olarak önemli farklılık ortaya çıkmadığı tespit edildi (Şekil 4.16 ve Çizelge 4.2).



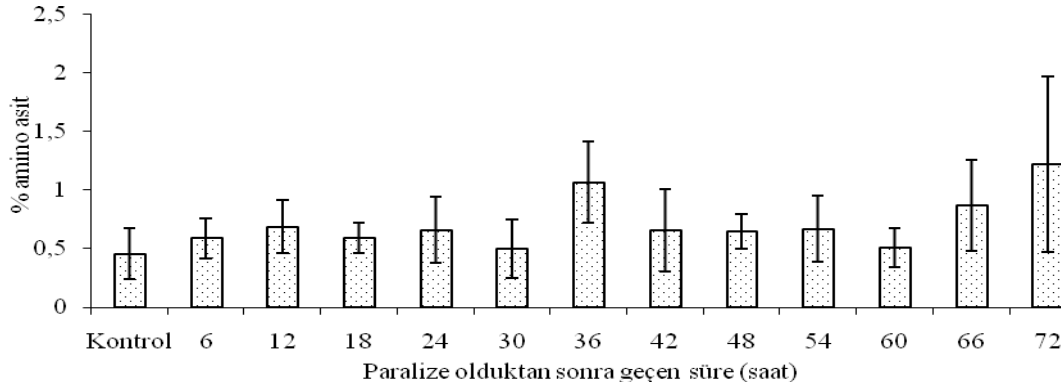
Şekil 4.16. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki triptofan yüzdesinin değişimi

Galleria mellonella kontrol grubu larvalarının hemolenfinde 0.70 olarak tayin edilen lizin yüzdesi paralizasyondan 12, 24 ve 48 saat sonra sırası ile 0.91, 0.88 ve 0.81 olarak belirlendi (Şekil 4.17 ve Çizelge 4.2). Paralizasyonun 54. saatinden sonra lizin miktarı biraz düşmüş gibi görünse de bu düşüşün önemli olmadığı ve paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak lizin miktarında ortaya çıkan farklılıkların önemsiz ($p > 0.05$) olduğu görülmektedir (Çizelge 4.2).



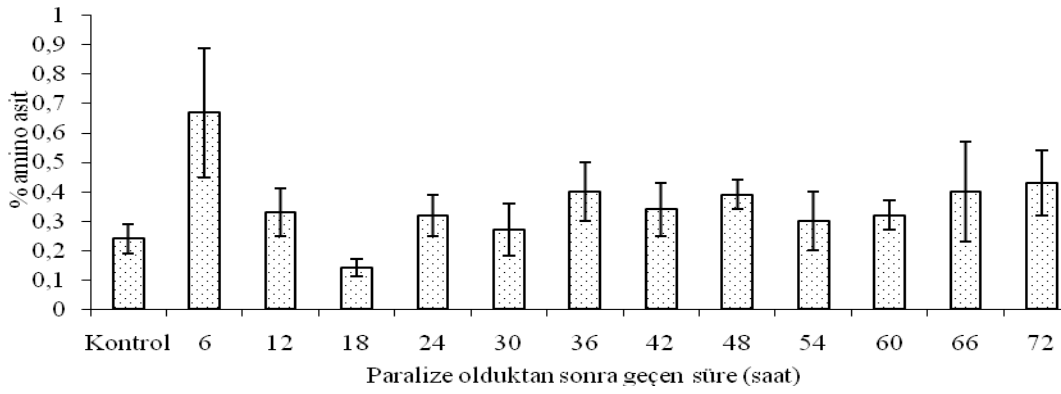
Şekil 4.17. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki lizin yüzdesinin değişimi

Paralizasyon tirozin yüzdesinde de önemli bir değişiklik ortaya çıkarmadı (Şekil 4.18 ve Çizelge 4.2). Kontrol grubunda 0.46 olan tirozin yüzdesi paralizasyondan 12, 24 ve 48 saat sonra sırası ile 0.69, 0.66 ve 0.65 olarak belirlendi. Paralizasyonun 36. ve 72. saatlerinde sırası ile 1.07 ve 1.22 olarak tespit edilen tirozin yüzdelерinde bir artış görölse de bunun önemli bir artış olmadığı ve paralizasyondan sonra geçen sürelerde tirozin miktarında ortaya çıkan farklılıkların önemsiz olduğu görölmektedir ($p > 0.05$) (Çizelge 4.2).



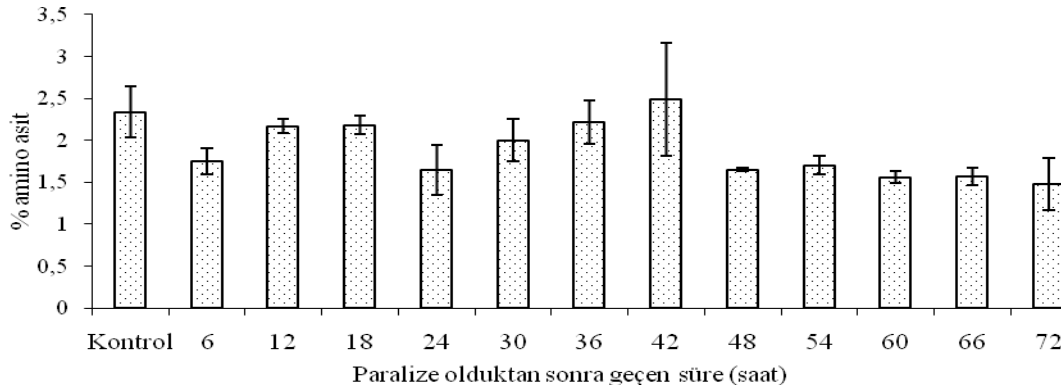
Şekil 4.18. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki tirozin yüzdesinin değişimi

Metiyonin miktarında paralizasyon sonrası geçen zamana bağlı olarak ortaya çıkan değişimler Şekil 4.19 ve Çizelge 4.2’de verilmektedir. Kontrol grubunda 0.24 olan metiyonin yüzdesi paralizasyondan 12, 24 ve 48 saat sonra sırası ile 0.33, 0.32 ve 0.39 olarak tespit edildi. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak metiyonin miktarlarında tespit edilen bu değerler arasındaki farklılıkların önemsiz ($p > 0.05$) olduğu görölmektedir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.19. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki metiyonin yüzdesinin değişimi

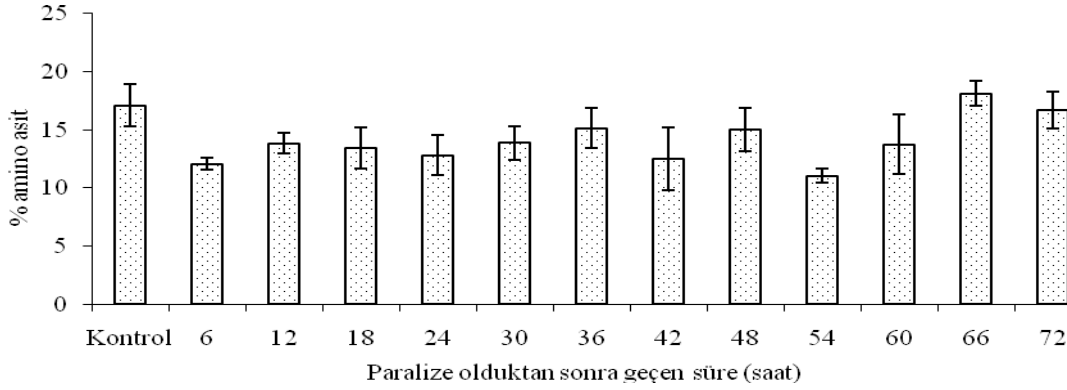
Paralize olan *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki arjinin miktarının paralizasyondan 48 saat sonra düşmeye başladığı görüldü (Şekil 4.20 ve Çizelge 4.2). Kontrol grubunda 2.34 olan arjinin yüzdesi paralizasyondan 48 öncesine kadar büyük bir değişiklik göstermedi fakat 48. saatte 1.65'e, 72. Saatte 1.48'e düştü. İlk bakışta kontrol grubunun arjinin değeri ile paralize olan konak larvalarının arjinin değerleri arasında fark var gibi görölüyorsa da bu farklılıklar önemsizdir ($p > 0.05$) (Çizelge 4.2).



Şekil 4.20. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki arjinin yüzdesinin değişimi

Kullanılan kromatografik prosedür glutamin (Gln) ve glisin (Gls)'in yüzdelarını ayrı ayrı değerlendirme olanağı vermediği için, bu iki amino asitin paralize olan ve olmayan konak larvalarının hemolenfindeki toplam yüzdesi Gln+Gly şeklinde tek yüzde olarak verilmektedir (Şekil 4.21 ve Çizelge 4.2). Çizelge 4.2'den kontrol grubunda 17.08 olan Gln+Gly toplam yüzdesinin paralize olan konak larvalarında bir miktar düştüğü, fakat bu düşüşün önemsiz olduğu ($p > 0.05$), ayrıca paralize olduktan

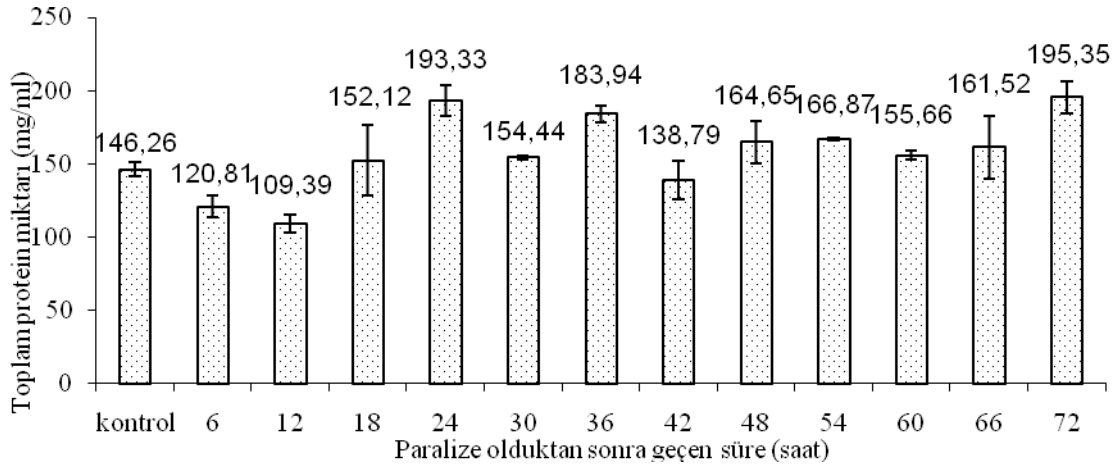
sonra geçen süreye göre hemolenfteki toplam Gln+Gly yüzdeleri farklı olsa da bu farkların önemli olmadığı ($p > 0.05$) görülmektedir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.21. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki toplam glutamin+glisin yüzdesinin değişimi

4.2.2. Toplam Protein Analizi İle İlgili Bulgular

Parazitoit *B. hebetor* tarafından sadece paralize edilen, konak *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki toplam protein miktarında paralize olduktan (paralizasyondan) 72 saat sonrasına kadar ortaya çıkan değişimler Şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.22. Paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak *G. mellonella* hemolenfindeki toplam protein miktarındaki değişimler

Şekil 4.22’den paralizasyondan sonra 18. saat itibariyle konak hemolenfindeki toplam protein miktarında artış olduğu, fakat bu artışın istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) olduğu tespit edildi. Kontrol grubuna ait hemolenf örneklerinde toplam protein

miktarı 146.26 mg/mL iken, paralizasyondan 72 saat sonra alınan hemolenf örneklerinde tespit edilen toplam protein miktarı 195.35 mg/mL oldu.

4.3. Parazitlenmiş ve Üzerinde Parazitoit Larvaları Gelişen Konaklardan Alınan Hemolenf Örneklerine Ait Bulgular

4.3.1. Amino Asit Analizi İle İlgili Bulgular

Materyal ve metotta belirtilen şekilde parazitlenen ve üzerlerinde parazitoit larvaları bulunduran konak larvalarından (P2) 24 saat ara ile 72 saat boyunca alınan hemolenf örneklerindeki serbest amino asitlerin miktarında tespit edilen değişiklikler Çizelge 4.3’de, hemolenf örneklerine ait kromatogramlar Şekil 4.23-4.25’de verilmektedir. Konak larvalarının hemolenfindeki amino asitler, parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak yüzdelerinde ortaya çıkan değişmelerin önemli olup olmadığı dikkate alınarak, iki grup altında değerlendirildi. Birinci grupta parazitlendikten sonra miktarlarında önemli değişiklikler olan amino asitler, ikinci grupta da miktarlarında önemli değişiklikler olmayan amino asitler ele alındı.

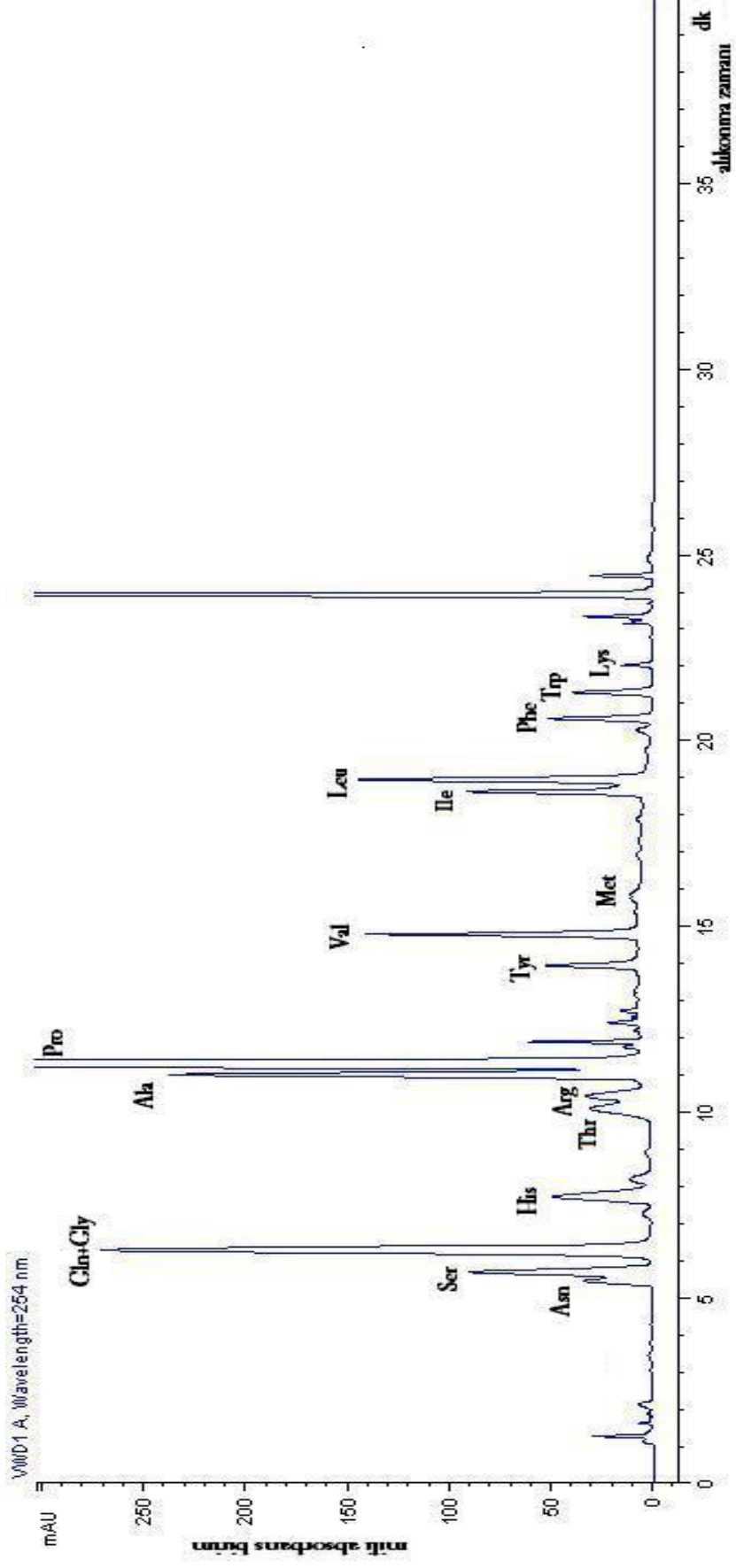
4.3.1.1. Parazitlendikten Sonra Miktarlarında Önemli Değişiklikler Olan Amino Asitler

Konak larvalarında parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak miktarlarında önemli değişiklikler olan amino asitler prolin, glisin+gulutamin, arjinin, asparajin, lizin, fenil alanin ve tirozin’ dir. Şekil 4.26- 4.32 ve Çizelge 4.3’den, kontrol grubuna göre, parazitlenen konak larvalarındaki bu amino asitlerin her birinin miktarında değişik değerlerde de olsa, parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak farklılıklar ortaya çıktığı ve bu farklılıkların önemli ($p \leq 0.05$) olduğu görülmektedir. Şekil 4.26 ve Çizelge 4.3’den, kontrol grubuna göre, parazitlenen konak larvalarındaki prolin yüzdesinde önemli ($p \leq 0.05$) bir artışın meydana geldiği, bu artışın parazitlenme sonrası geçen zamana göre değiştiği, buna karşılık parazitlendikten sonra geçen sürelerdeki toplam prolin yüzdeleri arasında önemli bir farkın olmadığı görülmektedir. Kontrol grubu larvalarında yüzde 56.67 olarak tespit edilen prolin yüzdesi, parazitlendikten sonraki 24. saatte yüzde 66.81, 48 ve 72. saatlerde sırası ile 69.51 ve 64.77 olarak tespit edildi (Çizelge 4.3). Ayrıca Çizelge 4.3’den parazitlenen konak larvalarının hemolenfinde, parazitlenmeden sonraki her zaman diliminde, prolin yüzdesinin diğer amino asitlere oranla daha fazla olduğu görülmektedir.

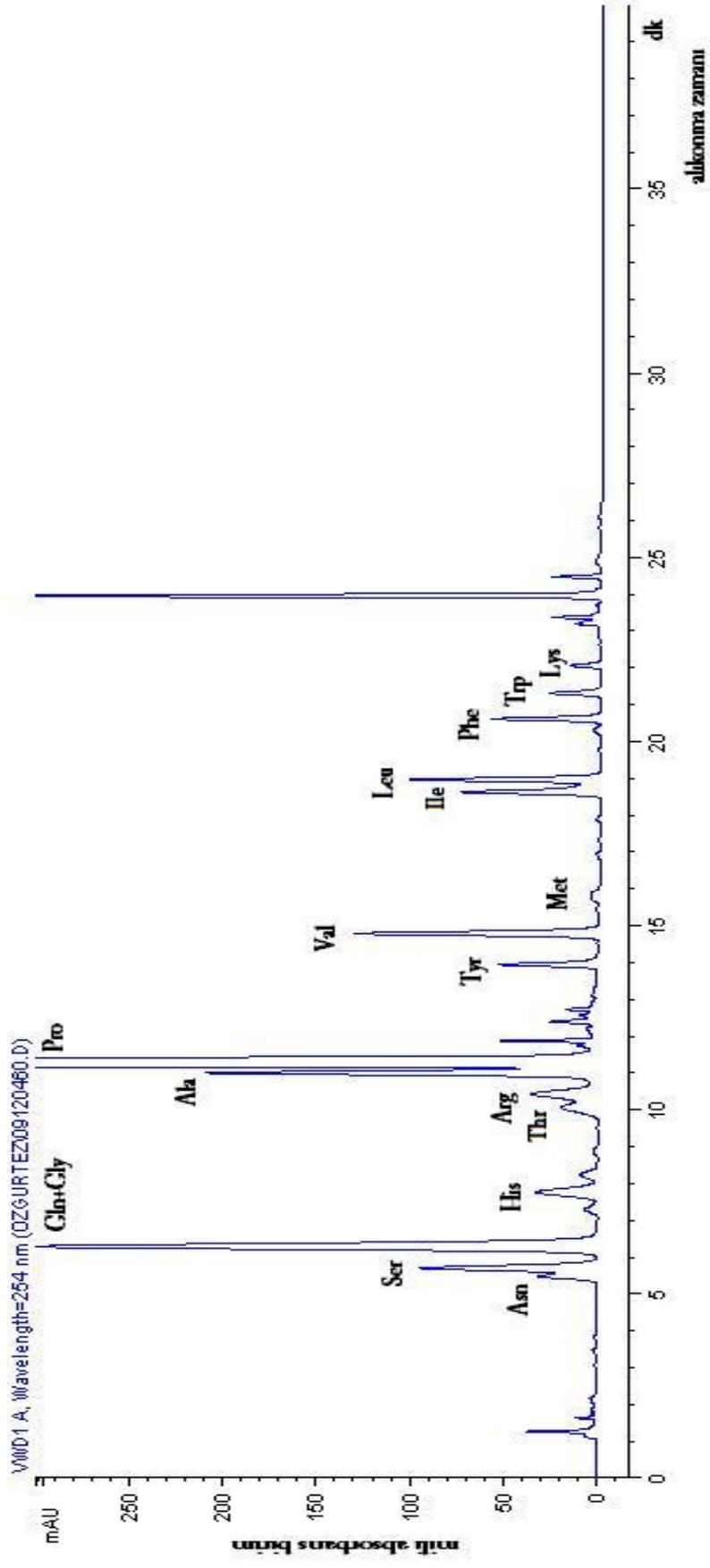
Çizelge 4.3. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak *G. mellonella* hemolenfinde serbest amino asitlerin yüzde değerleri

Amino asitler	% Amino asit (Ort±SH)			
	Parazitlendikten sonra geçen süre (Saat)			
	Kontrol	24	48	72
Asn	1.25±0.07 A	0.78±0.06 B	0.77±0.03 B	1.04±0.13 AB
Ser	3.04±0.33 A	2.57±0.13 A	2.44±0.46 A	3.26±0.07 A
Gln+Gly	17.08±1.82 A	7.98±0.45 B	8.41±0.69 B	8.66±0.36 B
His	2.29±0.45 A	1.70±0.12 A	1.51±0.18 A	1.52±0.02 A
Thr	1.20±0.43 A	1.61±0.13 A	0.98±0.05 A	1.19±0.15 A
Arg	2.34±0.30 A	1.33±0.14 B	1.25±0.14 B	1.26±0.13 B
Ala	7.15±1.06 A	5.49±0.07 A	4.35±0.36 A	5.57±0.72 A
Pro	56.67±1.24 B	66.81±1.96 A	69.51±2.13 A	64.77±0.61 A
Try	0.46±0.22 B	1.37±0.17 A	1.05±0.09 AB	1.64±0.18 A
Val	2.93±0.41 A	3.15±0.36 A	3.16±0.14 A	3.33±0.15 A
Met	0.24±0.05 A	0.33±0.01 A	0.25±0.08 A	0.29±0.08 A
Ile	1.41±0.16 A	2.11±0.33 A	1.90±0.15 A	2.22±0.08 A
Leu	1.80±0.30 A	2.79±0.40 A	2.26±0.29 A	2.91±0.09 A
Phe	0.69±0.14 B	0.97±0.05 AB	1.16±0.07 A	1.33±0.11 A
Trp	0.75±0.06 A	0.70±0.06 A	0.59±0.12 A	0.65±0.02 A
Lys	0.70±0.15 A	0.32±0.03 B	0.39±0.04 AB	0.37±0.02 AB

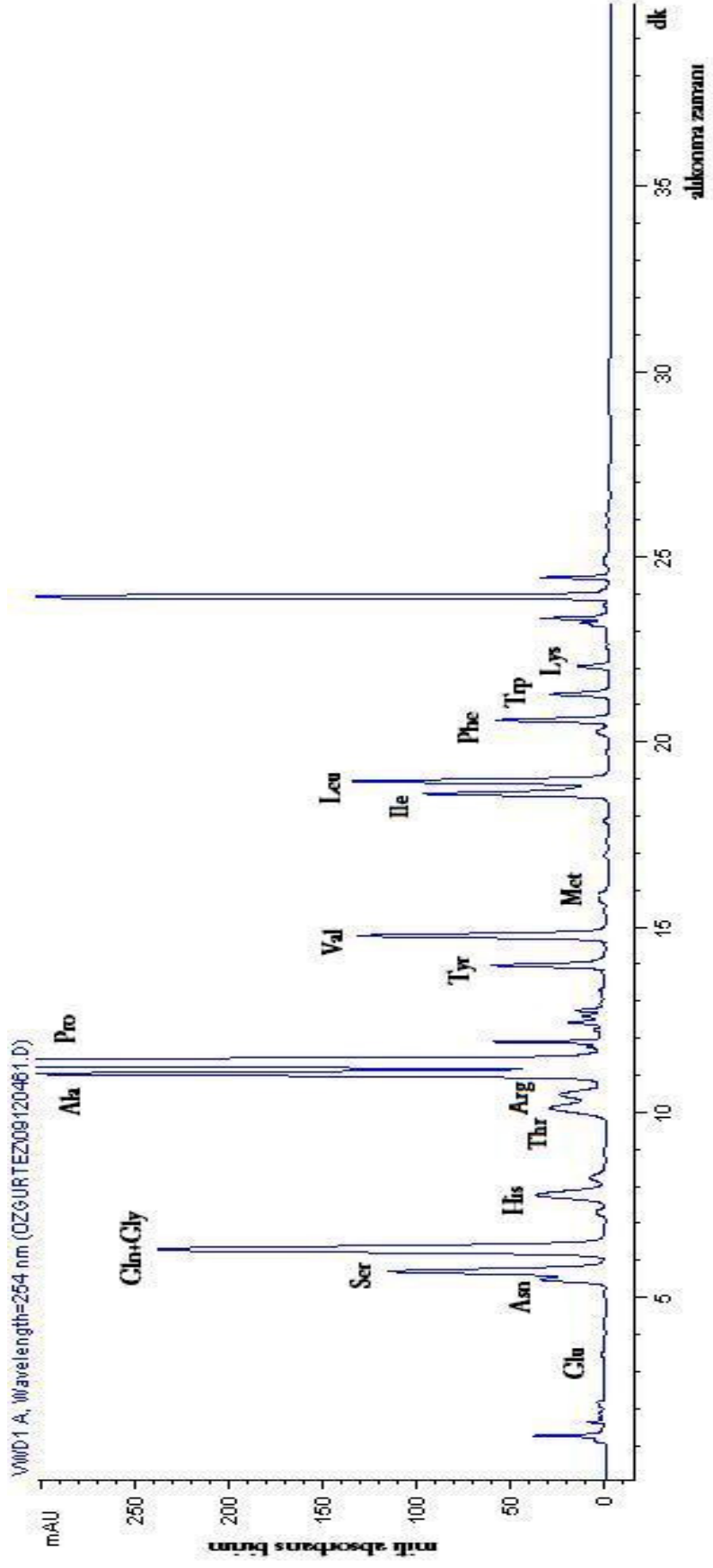
Aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemsizdir p>0.05



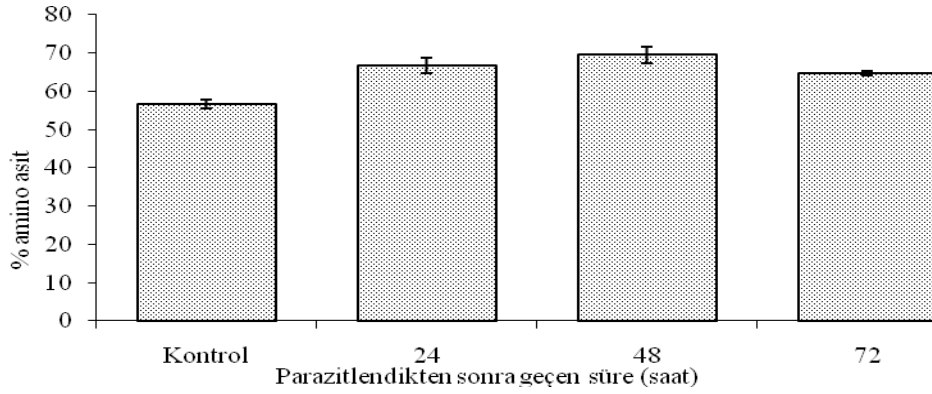
Şekil 4.23. Parazitlendikten 24 saat sonra konak *G. mellonella* larvasının hemolenfindeki amino asitlere ait kromatogram



Şekil 4.24. Parazitlendikten 48 saat sonra konak *G. mellonella* larvasının hemolenfindeki amino asitlere ait kromatogram

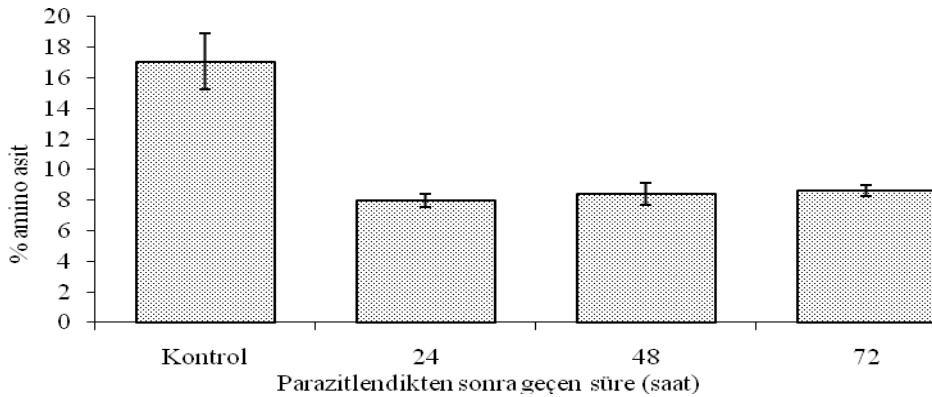


Şekil 4.25. Parazitlendikten 72 saat sonra konak *G. mellonella* larvasının hemolenfindeki amino asitlere ait kromatogram



Şekil 4.26. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki prolin yüzdesinin değişimi

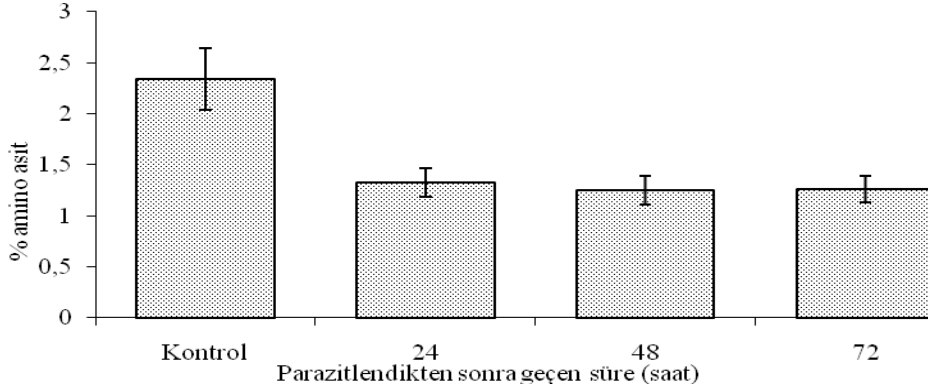
Paralize olan konak larvalarında belirtilen nedenden dolayı, parazitlenen konak larvalarında da glutamin (Gln) ve glisin (Gly)'in yüzdeleri, Gln+Gly şeklinde tek yüzde olarak verilmektedir (Şekil 4.27 ve Çizelge 4.3). Çizelge 4.3'den parazitlenen konak larvalarında kontrol grubuna göre Gln+Gly toplam yüzdesinin önemli derecede düştüğü ve bu düşüşün önemli ($p \leq 0.05$) olduğu görülmektedir. Kontrol grubu larvalarda 17.08 olan Gln+Gly toplam yüzdesinin parazitlenmeden sonraki 24. ve 72. saatlerde sırasıyla 7.98 ve 8.66'ya düştüğü belirlendi. Buna karşılık parazitlendikten sonra geçen sürelerdeki toplam Gln+Gly yüzdeleri arasında önemli bir farkın olmadığı görülmektedir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.27. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki glutamin+glisin yüzdesinin değişimi

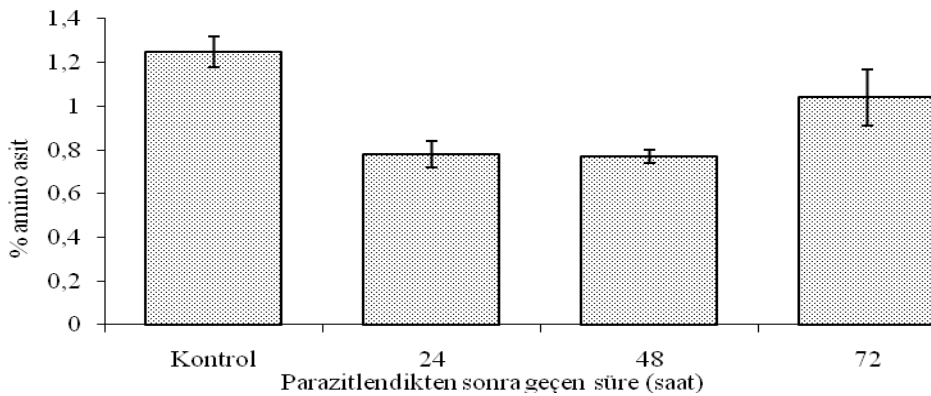
Hemolenfteki arjinin miktarının, konak larvaları parazitlendikten sonra kontrol grubuna göre önemli ($p \leq 0.05$) derecede düştüğü görülmektedir (Şekil 4.28 ve Çizelge 4.3). Kontrol grubunda 2.34 olan arjinin yüzdesi parazitlendikten 24 ve 72 saat sonra

sırasıyla 1.33 ve 1.26'ya düştü. Fakat parazitlendikten sonraki hemolenf arjinin değerleri arasında önemli bir fark yoktur ($p > 0.05$) (Çizelge 4.3).



Şekil 4.28. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki arjinin yüzdesinin değişimi

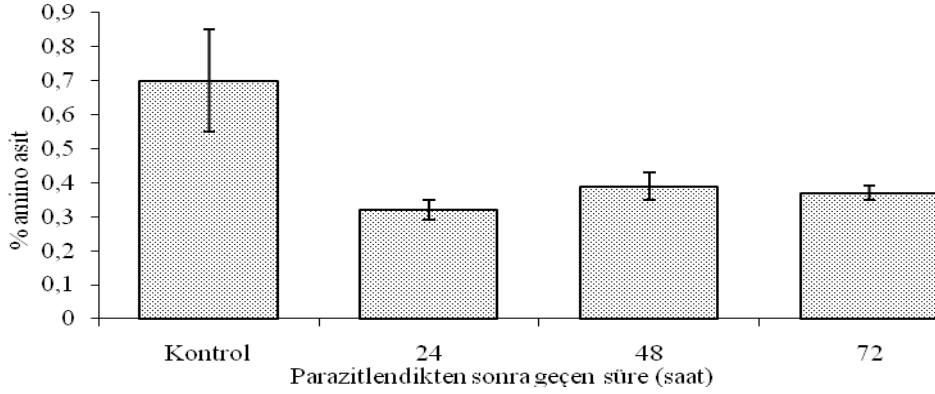
Parazitlenmiş olan *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki asparajin miktarının önemli derecede değişim gösterdiği görülmektedir. Hemolenfindeki asparajin miktarının parazitlendikten sonraki ilk 48 saat içinde kontrol grubuna göre önemli ($p \leq 0.05$) derecede düştüğü daha sonra yükseldiği, fakat parazitlendikten sonraki hemolenf arjinin değerleri arasında önemli bir farkın olmadığı ($p > 0.05$) görülmektedir (Şekil 4.29 ve Çizelge 4.3).



Şekil 4.29. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki asparajin yüzdesinin değişimi

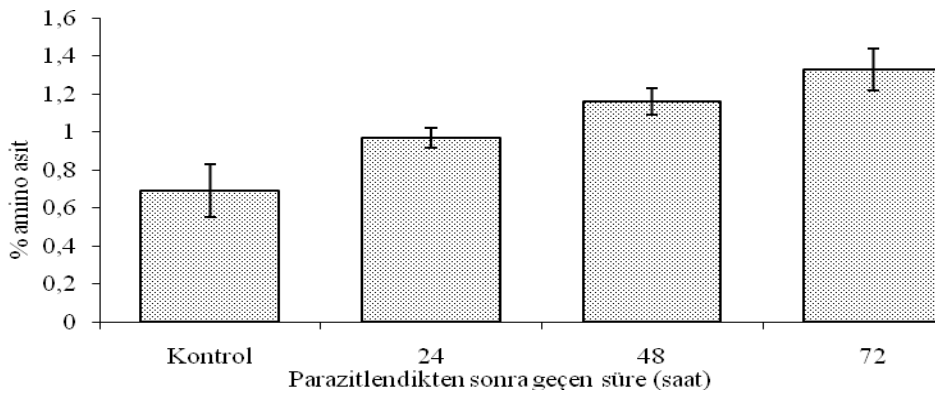
Şekil 4.30 ve Çizelge 4.3'den, kontrol grubuna göre, parazitlenen konak larvalarındaki lizin yüzdesinde önemli ($p \leq 0.05$) bir düşüş meydana geldiği, buna

karşılık parazitlendikten sonraki hemolenf lizin değerleri arasında önemli bir farkın ($p > 0.05$) olmadığı görülmektedir. Kontrol grubu larvalarında yüzde 0.70 olarak tespit edilen lizin yüzdesi, parazitlendikten sonraki 24. saatte yüzde 0.32, 48 ve 72. saatlerde sırası ile 0.39 ve 0.37 olarak belirlendi (Çizelge 4.3).



Şekil 4.30. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki lizin yüzdesinin değişimi

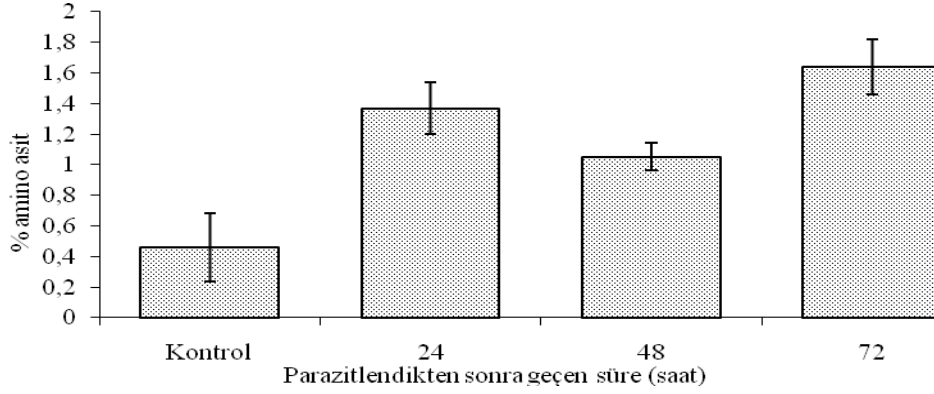
Fenilalanin miktarının parazitlenmiş larvalarının hemolenfinde kontrol grubuna göre artış gösterdiği (Şekil 4.31 ve Çizelge 4.3), 24 saatlik grupta gözlenen artışın önemsiz ($p > 0.05$), 48 ve 72 saatlerdeki artışın ise önemli ($p \leq 0.05$) olduğu tespit edildi. Buna karşılık parazitlendikten sonraki hemolenf fenilalanin değerleri arasında önemli bir farkın olmadığı görülmektedir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.31. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki fenilalanin yüzdesinin değişimi

Kontrol grubu larvalarında yüzde 0.46 olarak belirlenen tirozin yüzdesi, parazitlendikten sonraki 24. saatte yüzde 1.37, 48 ve 72. saatlerde sırası ile 1.05 ve 1.64 olduğu görüldü (Çizelge 4.3). Bu değerler bize konak larvalarının hemolenfindeki tirozin miktarının parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak kontrol grubuna göre

önemli ($p \leq 0.05$) derecede arttığını, buna karşılık parazitlendikten sonraki hemolenf değerleri arasında önemli bir farkın olmadığını göstermektedir (Şekil 4.32 ve Çizelge 4.3).

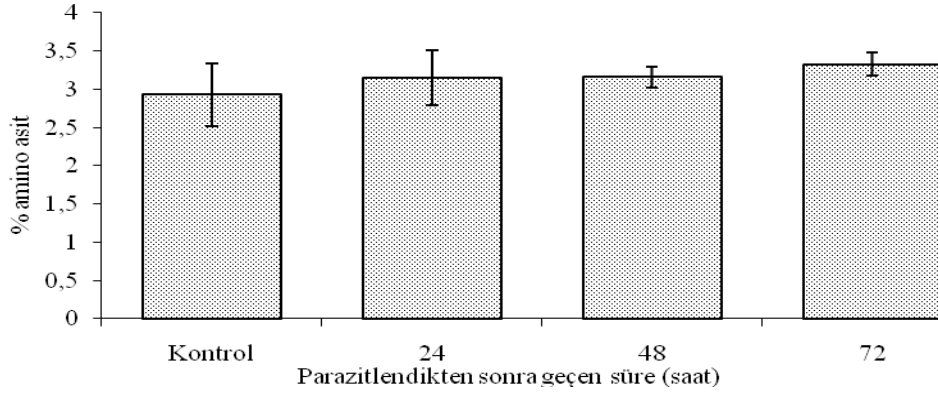


Şekil 4.32. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki tirozin yüzdesinin değişimi

4.3.1.2. Parazitlendikten Sonra Miktarlarında Önemli Değişiklikler Olmayan Amino Asitler

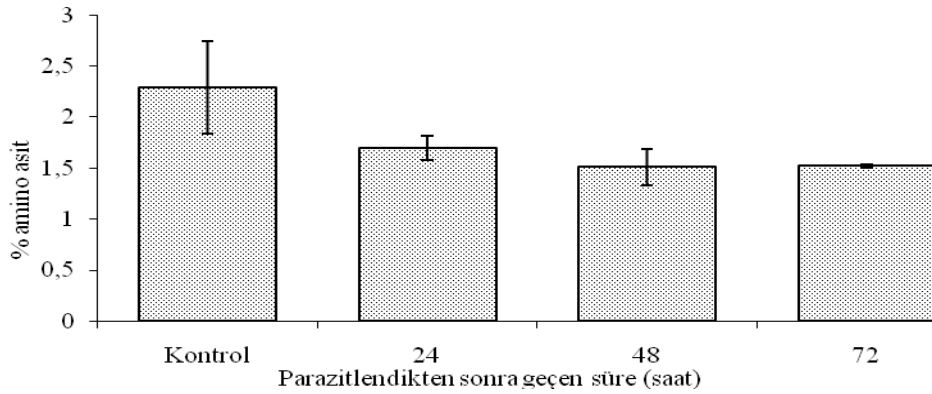
Konak larvalarının hemolenfinde parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak miktarlarında önemli değişiklikler olmayan amino asitler valin, histidin, lösin, izolösin, triptofan, metiyonin, alanin, serin ve treonin'dir. Bu amino asitlerin her birinin yüzdesinde tespit edilen değişimler Şekil 4.33- 4.41 ve Çizelge 4.2'de verilmektedir. Verilen çizelge ve şekillerden bu amino asitlerin değerlerinde kontrol gruplarına göre önemsiz ($p > 0.05$) de olsa parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak farklılıkların ortaya çıktığı görülmektedir.

Şekil 4.33 ve Çizelge 4.3' den parazitlendikten sonraki hemolenf örneklerindeki valin yüzdesinde kontrol grubuna göre bir artış görülse de, bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p > 0.05$) görülmektedir. Kontrol grubunda 2.93 olan valin yüzdesi parazitlendikten 24 saat sonra 3.15 oldu. Parazitlendikten sonra 48. ve 72. saatlerde alınan hemolenf örneklerinde valin yüzdesi sırasıyla 3.16 ve 3.33 olarak tespit edildi.



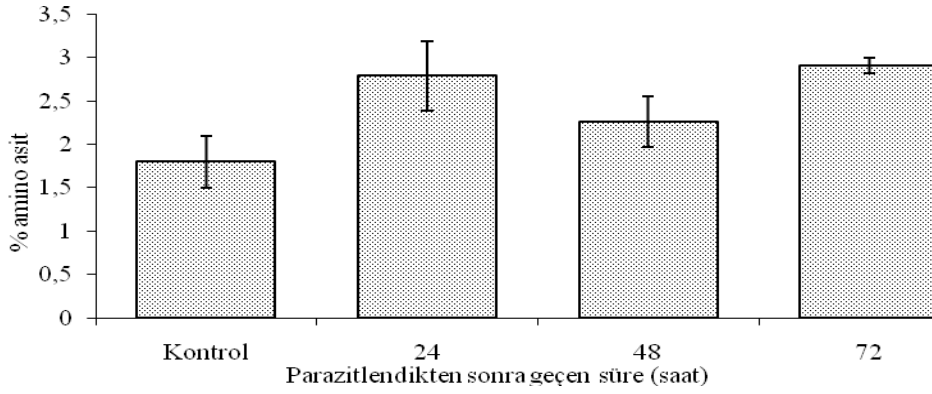
Şekil 4.33. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki valin yüzdesinin değişimi

Parazitlenmiş *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde bulunan histidin yüzdelерinin kontrol grubuyla karşılaştırılması Şekil 4.34 ve Çizelge 4.3’ de verilmektedir. Verilen şekil ve çizelgeden görüleceği gibi parazitlendikten sonra kontrol grubuna göre histidin miktarında bir düşüş gözlenmişse de, istatistiksel açıdan bu düşme önemli değildir ($p > 0.05$). Ayrıca parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak histidin miktarında önemli bir fark ($p > 0.05$) görülmedi.



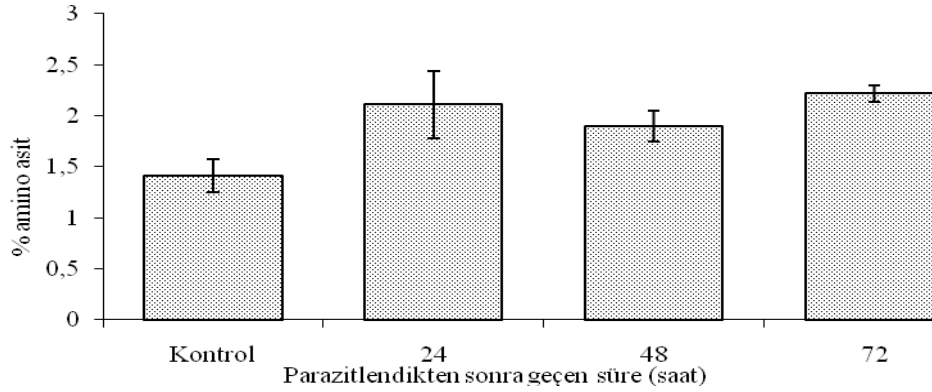
Şekil 4.34. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki histidin yüzdesinin değişimi

Parazitlendikten sonra lösin yüzdesinde tespit edilen değişimler Şekil 4.35 ve Çizelge 4.3’ de verilmektedir. Görüldüğü gibi parazitlendikten sonra kontrol grubuna göre önemsiz de olsa ($p > 0.05$) lösin yüzdesinde bir artış oldu. Kontrol grubunda 1.80 olan lösin yüzdesi parazitlendikten sonraki 24. 48. ve 72. saatlerde sırası ile 2.79, 2.26 ve 2.91 olarak tespit edildi. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak lösin miktarları arasında ortaya çıkan farklılıklar önemsizdir ($p > 0.05$).



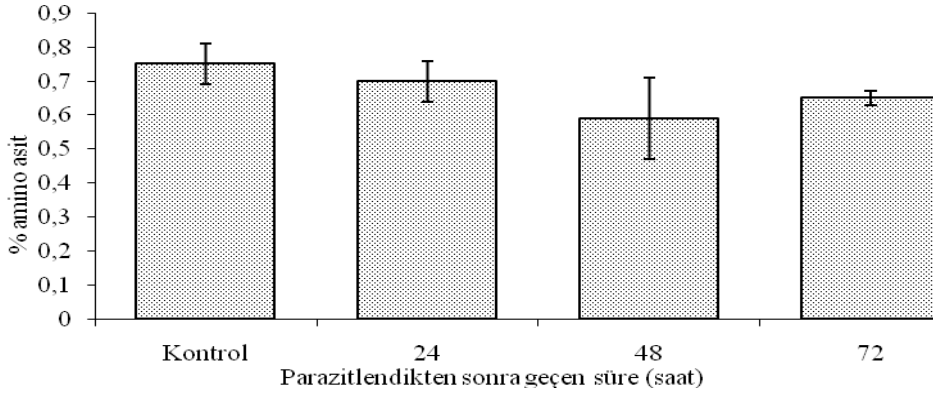
Şekil 4.35. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki lösin yüzdesinin değişimi

Hemolenfdeki izolösün yüzdesi parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak bir değişim gösterdi (Şekil 4.36 ve Çizelge 4.3). Kontrol grubunda 1.41 olan izolösün yüzdesi parazitlendikten sonraki 24. ve 48. saatlerde sırası ile 2.11 ve 1.90 iken, parazitlendikten sonraki 72. saatte 2.22 oldu. Parazitlendikten sonra izolösün miktarında kontrol grubuna göre ortaya çıkan bu artış önemsizdir ($p > 0.05$).



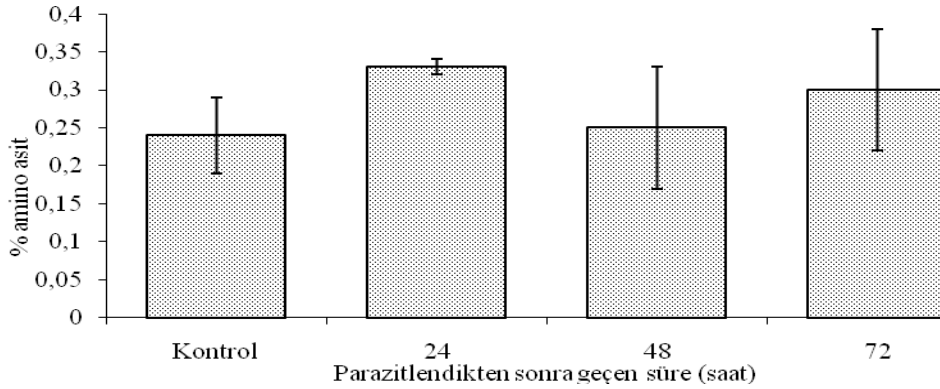
Şekil 4.36. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki izolösün yüzdesinin değişimi

Hemolenfdeki triptofan miktarı, parazitlenme sonrası geçen zamana bağlı olarak önemli bir değişiklik göstermedi (Şekil 4.37 ve Çizelge 4.3). Kontrol grubunda 0.75 olan triptofan yüzdesi, parazitlendikten 24, 48 ve 72 saat sonra sırası ile 0.70, 0.59 ve 0.65 olarak tespit edildi. Belirtilen triptofan miktarları arasında önemli bir fark yoktur ($p > 0.05$) (Çizelge 4.3).



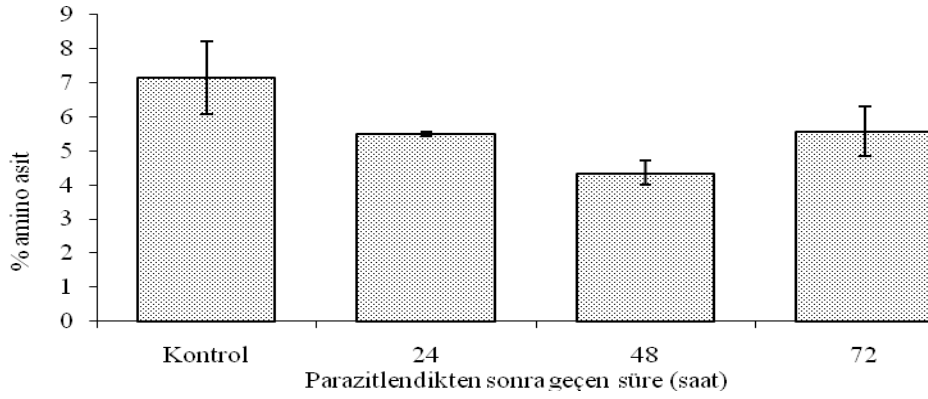
Şekil 4.37. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki triptofan yüzdesinin değişimi

Kontrol grubu konak larvalarının hemolenfinde 0.24 olarak tespit edilen metiyonin yüzdesi parazitlendikten 24, 48 ve 72 saat sonra sırası ile 0.33, 0.25 ve 0.29 olarak belirlenmiş ve bu değerler arasında önemli bir fark bulunamadı ($p > 0.05$) (Şekil 4.38 ve Çizelge 4.3).



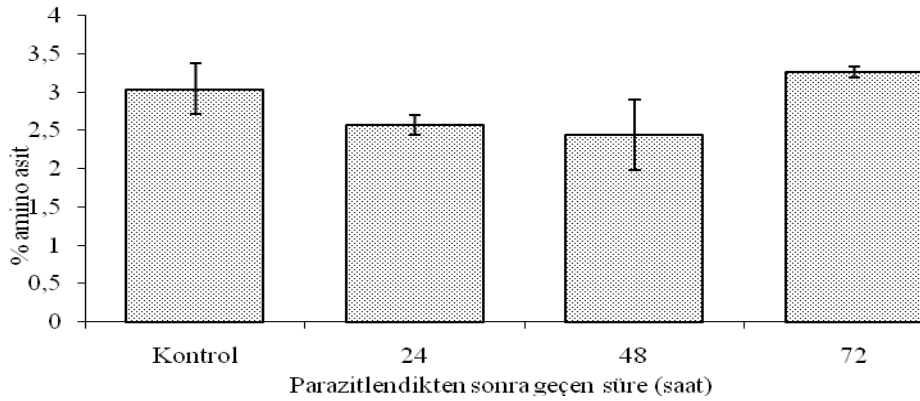
Şekil 4.38. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki metiyonin yüzdesinin değişimi

Parazitlendikten sonra konak larvalarının hemolenfindeki alanin yüzdesinde kontrol grubuna göre bir düşme ortaya çıktı. Kontrol grubunda 7.15 olan alanin yüzdesi parazitlendikten sonraki 24. ve 48. saatlerde sırası ile 5.49 ve 4.35 iken, parazitlendikten sonraki 72. saatte 5.57'ye düştü (Şekil 4.39 ve Çizelge 4.3). Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak alanin miktarı arasında tespit edilen farklılıklar önemsizdir ($p > 0.05$) (Çizelge 4.3).

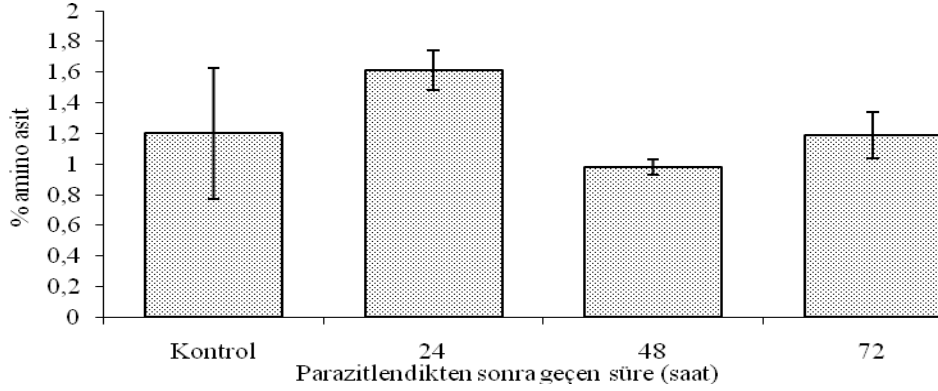


Şekil 4.39. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki alanin yüzdesinin değişimi

Parazitlenmiş *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde parazitlenme sonrası geçen zamana bağlı olarak serin ve treonin yüzdelерinde önemli bir değişiklik ortaya çıkmadı (Şekil 4.40-41 ve Çizelge 4.3). Kontrol grubunda 3.04 olan serin yüzdesi, parazitlendikten 24, 48 ve 72 saat sonra sırası ile 2.57, 2.44 ve 3.26 olarak tespit edildi (Çizelge 4.3). Kontrol grubunda 1.20 olan theronin yüzdesi de parazitlendikten sonraki 24. saatte 1.61, 48. ve 72. saatlerde sırasıyla 0.98 ve 1.19 olarak belirlendi. Kontrol gruplarına göre parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak serin ve theronin miktarları arasında tespit edilen farklılıklar önemsizdir ($p > 0.05$) (Çizelge 4.3).



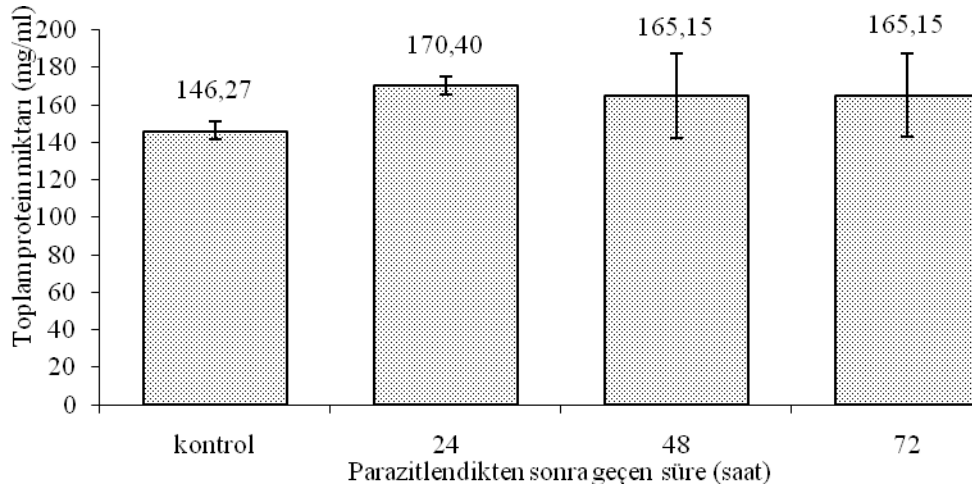
Şekil 4.40. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki serin yüzdesinin değişimi



Şekil 4.41. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak konak hemolenfindeki theronin yüzdesinin değişimi

4.3.2. Toplam Protein Analizi İle İlgili Bulgular

Parazitoit *B. hebetor* tarafından parazitlenmiş ve üzerinde parazitoit larvaları gelişen konak larvalarının hemolenfindeki toplam protein miktarında 72 saat boyunca meydana gelen değişimlerle ilgili sonuçlar Şekil 4.42’ de verilmiştir.



Şekil 4.42. Parazitlendikten sonra geçen süreye bağlı olarak *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki toplam protein miktarındaki değişimler

Şekil 4.42’de kontrol grubu larvalarında 146.27 ± 4.64 mg/mL olarak belirlenen toplam protein miktarı, parazitlenen larvalarda parazitoit yumurtasının açılmasından sonra artış göstererek parazitlenmeden 24 saat sonra 170.40 ± 4.82 mg/mL, 48 ve 72 saat sonra sırasıyla 165.15 ± 22.50 ve 165.15 ± 22.19 mg/mL olarak belirlendi. Toplam protein miktarları arasında ortaya çıkan farklılıklar önemsizdir ($p > 0.05$).

5. TARTIŞMA

Birçok organik ve inorganik bileşenleri içeren hemolenf (Florkin ve Jeuniaux, 1964; Mullins, 1985), hücresel metabolizma için gerekli olan ürünlerin transportunda, depolanmasında ve vücut savunması ile ilgili faaliyetlerde önemli rol oynar (Wyatt, 1961). Hemolenfin kimyasal kompozisyonu, türler arasında ve aynı türde farklı gelişim evrelerinde büyük değişiklik gösterebilir (Malik ve Malik, 2009). Aynı türde hemolenfin kimyasal kompozisyonundaki değişimler, çevre şartlarına karşı böcek vücudundaki morfojenik ve biyokimyasal değişimleri, farklı türlerde ise metabolik farklılıkları yansıttığından, hemolenf kimyasındaki değişimlerin tayininin önemli bir araştırma konusu olmaktadır (Malik ve Malik, 2009).

Her ne kadar nedeni tam olarak açıklanamamış olsa da, böceklerin hemolenf ve dokularında diğer hayvanlara göre daha fazla miktarda serbest amino asit bulunur (Wyatt, 1961; Florkin ve Jeuniaux, 1964; Mullins, 1985; Yi ve Adams, 2000; Colinet ve ark., 2007). Bu durum muhtemelen protein sentezi için fazlasıyla serbest amino asitlere ihtiyaç duyulmasından (Yi ve Adams, 2000; Assar ve ark., 2010), bir dereceye kadar amino asitlerin tamponlamada (Kutlesa ve Caveney, 2001), osmoregülasyonda, osmolalitenin kontrolünde (Atmowidjojo ve ark., 1999; Hazel ve ark., 2003), detoksifikasyonda (Friedler ve Smith, 1954; Shyamala, 1964; Assar ve ark., 2010), gelişimde, enerji ve değişik ürünlerin sentezinde kullanılan çeşitli ara metabolitlerin oluşumunda (Colinet ve ark., 2007) iş görmesinden kaynaklanabilir. Hemolenfteki serbest amino asitler, kalitatif ve kantitatif olarak türe, yaşa, gelişim evresine, dokuya ve eşeye bağlı olarak değişmektedir (Yi ve Adams, 2000).

Yi ve Adams (2000) böceklerin yüksek protein sentezi gerektiren pup ve ergin oluşum dönemlerinde hemolenfte yüksek konsantrasyonda, buna karşılık düşük protein sentezinin gerçekleştiği yaşlılık dönemlerinde düşük konsantrasyonda serbest amino asitlere sahip olduklarını ifade etmişlerdir. Assar ve ark. (2010)'na göre birim vücut ağırlığı ya da birim hemolenf hacmindeki her amino asitin miktarındaki değişim ile ilgili genel bir kural yoktur. Amino asitlerin bir çoğu gelişim sırasında düzenli olarak azalırken, diğerleri geçici bir artış gösterir. Amino asitlerin miktarlarındaki bazı küçük değişimler de sadece beslenme ile ilgili varyasyonları yansıtır. Amino asitlerden tirozin ve prolin miktarı özellikle pupa oluşumu yaklaştığı sırada sürekli bir artış gösterir. Bu durumun bu iki amino asitin kutikülün kalınlaşmasında önemli rol oynamasından ve tirozinin, pup kutikulasını oluşturacak larval kütikülün kararma ve sertleşmesinde

gerekli olan polifenollerin ve quinonların oluşumunda rol oynamasından kaynaklanmış olacağı ileri sürülmüştür (Assar ve ark., 2010).

Amino asitlerden deaminasyon veya transaminasyonlar sonucu oluşan alfa-keto asitler (karbon iskeletleri) Krebs döngüsü ara ürünlerine dönüştürülerek önemli bir enerji kaynağı ve diğer makromoleküllerin sentezinde ön madde olarak iş görürler (Vinson ve Iwantsch, 1980; Yi ve Adams, 2000; Taški ve ark., 2004; Zhao ve Zera, 2006). Amino asitler böceklerde büyüme ve gelişim için gerekli olan en önemli besin maddelerindendir (Gelman ve ark., 2000). Değişik işlevleri göz önüne alındığı zaman böceklerdeki değişik amino asitlerin miktarlarının belirli bir düzeyde tutulmasının gerekli olduğu anlaşılır. Bu faaliyette amino-transferazların kontrolünde gerçekleşen çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar önemli rol oynamaktadır (Assar ve ark., 2010).

Böcek hemolenfindeki serbest amino asitlerin miktarlarında ve çeşitlerinde meydana gelen değişimler böceğin fizyolojik durumunu gösteren önemli indikatörlerdir. Hemolenf amino asit kompozisyonundaki değişiklikler böceğin, deri değiştirme ve metomorfoz gibi gelişim süreçleriyle ilişkili olabileceği gibi beslenme ve/veya amino asitleri metabolize etme kabiliyetindeki farklılıklarla da ilişkili olabilir (Cônoli ve Vinson, 2002). Örneğin, lepidoptera larvalarının hemolenfindeki ipek üretiminde kullanılan amino asitlerin konsantrasyonu pup kozası için ipek iplikleri üretilmeye başladığında hızla düşer, buna karşılık tirozin konsantrasyonu kabuk değiştirme ve pupa oluşumundan önce yükselir (Florkin ve Jeuniaux, 1964; Tillinghast ve Townley, 2008).

Hanzal ve Jegorov (1991), *G. mellonella* ile yaptıkları çalışmada hemolenfteki değişik amino asitlerin miktarında larva yaşının önemli olduğunu ifade etmişlerdir. Larva yaşı arttıkça hemolenfteki valin ve GABA miktarının önemli derecede arttığını, glisin, alanin ve glutaminin miktarının düştüğünü, buna karşılık glutamik asit, serin, asparajin, fenilalanin, lösin, ornitin ve lizinin miktarının değişmediğini ileri sürmüşlerdir.

Parazitizm böcekler arasındaki önemli bir ikili yaşam şeklidir. Parazitizm genellikle konağın besin kaynağı olarak kullanılmasına yardım edecek şekilde konak kimyasal kompozisyonunda büyük değişimlere neden olmaktadır (Doury ve ark., 1997; Richards ve Edwards, 2001; Cônoli ve ark., 2005; Asgari ve Rivers, 2011). Parazitoit lehine konak biyokimyasında meydana gelen değişim idiobiyont ve koinobiyont parazitoitlerde farklı olmaktadır. Parazitoit lehine konak biyokimyasında meydana gelen

değişim koinobiyont hayat sürenlerde idiobiyontlara göre daha açık olarak görülmektedir (Quicke ve Shaw, 2004).

Bu çalışmanın bir bölümünde *B. hebetor* tarafından sadece paralize edilen konak *G. mellonella* larvalarından paralize oluşlarından sonra altışar saat ara ile (paralize oluşlarından sonraki 72. saate kadar) alınan hemolenf örneklerindeki, bir bölümünde de paralize olduktan sonra üzerine yumurta bırakılan ve parazitoit larva gelişimi başlayan konak larvalarından alınan hemolenf örneklerindeki amino asitler kalitatif ve kantitatif olarak, kontrol grubu larvalara ait hemolenf örnekleri ile karşılaştırıldı (Çizelge 4.2 ve 4.3).

Sadece paralize olan konak larvalarında hemolenfteki serbest amino asitlerden, prolin, serin, alanin, fenilalanin, asparajin ve treoninin yüzdelерinin kontrol grubu larvalara göre önemli derecede değiştiği (Şekil 4.6-4.11), valin, lösin, izolösin, histidin, triptofan, lizin, tirozin, metiyonin, arjinin ve glisin+glutamin yüzdelерinin ise paralizasyondan etkilenmediği tespit edildi (Şekil 4.12-4.21).

Buna karşılık paralizasyonu takiben parazitlenen ve üzerinde parazitoit larva gelişimi başlayan konak larvalarının hemolenfindeki serbest amino asitlerden prolin, glisin+glutamin, arjinin, asparajin, lizin, fenilalanin ve tirozin yüzdelерinin kontrol grubu larvalara göre önemli derecede değiştiği (Şekil 4.26-4.32), valin, histidin, lösin, izolösin, triptofan, metiyonin, alanin, serin ve treonin yüzdelерinde ise önemli bir değişimin ortaya çıkmadığı görülmektedir (Şekil 4.33-4.41).

Paralize olan konak larvalarında lizin, treonin, arjinin ve glutamin+glisin miktarlarında önemli bir değişme olmadığı halde parazitlenenlerde oldu. Aynı şekilde parazitlenen ve paralize olan konaklarda miktarları değişmeyen amino asit çeşitlerinin farklı olduğu görülmektedir (Çizelge 4.2 ve 4.3). Elde edilen sonuçlar paralizasyonun ve parazitlenmenin konak larvalarının hemolenfindeki amino asitlerin miktarında ve çeşidinde değişime neden olduğunu, fakat bu iki olayın etkisinin bir dereceye kadar farklı olduğunu göstermektedir. Bu fark her iki olaya karşı konağın tepkisindeki farktan ve/veya her olay için ihtiyaç duyulan amino asitlerin çeşit ve miktarının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Bu çalışmada izlenen prosedür, paralize olan ve parazitlenen konak larvaları ile kontrol grubunu oluşturan larvalarda asparat, glutamat ve sistein'nin tayinine imkan vermemiştir. Bu durum söz konusu amino asitlerin konak larvaları için gereksiz olduğu anlamına gelmez. Muhtemelen bu amino asitler metabolik yolda diğerlerinden karşılanmış olabilir. Ayrıca sisteinin oksidasyona çok duyarlı

olduğu, dikkatlice seçilmiş reaksiyon şartları altında bile rezidülerinin kolaylıkla sistine okside olabildiği (Horváti ve ark., 2008) göz önüne alındığında izlenen prosedürle tayin edilememesi normal olabilir.

Parazitlenen konakların hemolenf amino asit ve protein konsantrasyonunda meydana gelen değişimler değişik araştırmacılar tarafından ele alınmıştır (Bischof ve Ortel 1996; Doury ve ark., 1997; Rahbé ve ark., 2002; Consoli ve Vinson 2004; Consoli ve ark., 2005; Richards ve ark. 2005).

Bischof ve Ortel (1996) *G. liparidis* tarafından parazitlenen *L. dispar* larvalarının vücut dokularında toplam protein miktarının düştüğünü, hemolenfdeki toplam protein konsantrasyonunun yaklaşık olarak iki katına çıktığını fakat toplam amino asit miktarının düştüğünü belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar, parazitlenmemiş ve parazitlenmiş *L. dispar* larvalarının hemolenfinde 10 tanesi esansiyel ve 6 tanesi esansiyel olmayan 16 serbest amino asit tayin etmişlerdir. Parazitlenmiş bireylerde toplam amino asit miktarında azalma olmasına rağmen, serbest amino asitler tek tek ele alındığında parazitlenmenin etkisinin değişebildiği görülmüştür. Toplam amino asit konsantrasyonunun %50 ve %60'ından daha fazlasını kapsayan 4 amino asitten alanin ve histidin miktarı parazitlemeye bağlı olarak önemli bir değişme göstermemiş, buna karşılık sistein ve valin konsantrasyonu parazitlenmiş larvalarda önemli ölçüde azalmıştır. Parazitlenmemiş olanlara göre parazitlenmiş larvalarda, daha düşük konsantrasyonlarda bulunan serbest amino asitlerin bazıları (izolösin, ornitin, asparajin ve glutamin) ise artmıştır (Bischof ve Ortel, 1996).

Toxoneuron nigriceps'in embriyonik gelişimi boyunca konak *H. virescens* hemolenfindeki toplam serbest amino asit miktarını etkilediği tayin edilmiştir (Cônoli ve Vinson, 2004). Serbest amino asitlerden lizin, valin, treonin, arjinin, asparajin, izolösin ve fenilalanin, parazitlenmeden iki saat sonra önemli derecede azaldığı için, parazitlenmiş konaktaki toplam amino asit konsantrasyonu düşmüştür. Buna karşılık parazitoidin embriyonik gelişimi ilerledikçe, parazitlenmiş konakların hemolenfindeki amino asit konsantrasyonu artmıştır. Parazitoidin tüm embriyonik gelişimi boyunca amino asit miktarları karşılaştırıldığında parazitlenmeden sonraki ilk 10-12 saatlerde konağın hemolenfindeki prolin, glisin, serin, histidin ve asparajinin arttığı, treoninin ise azaldığı gözlenmiştir (Cônoli ve Vinson, 2004).

Konaklar üzerinde gelişen parazitoit larvalarının, beslenmeleri sırasında ağızlarından salgıladıkları sindirimle ilgili proteazlar ve/veya nörotoksik ya da

sitotoksik larval sekresyonlarıyla konaklarında biyokimyasal ve fizyolojik değişimlere neden oldukları tayin edilmiştir (Doury ve ark., 1997).

Vinson (1990) parazitoit larvalarının beslenmesi sırasında konakta ortaya çıkan savunma faaliyetlerine bağlı olarak konak metabolizmanın değişmesi sonucu, hemolenfdeki çeşitli besin maddelerinin miktar ve çeşidinde değişiklik ortaya çıktığını, Cònsoli ve ark. (2005) da parazitlenmiş konakların hemolenfdeki serbest amino asit ve protein seviyelerinin değişmesinin, gelişen parazitoit için konak uygunluğunu artırmaya yönelik bir strateji olabileceğini ifade etmişlerdir.

Bracon hebetor ile yaptığımız bu çalışmamızda paralizasyon ve parazitlenmenin konak hemolenfdeki serbest amino asitlerin her birinin miktar ve çeşidine olan etkisinin bir dereceye kadar farklı olduğunu göstermiştir. Paralizasyon bazı amino asitlerin miktarında değişime neden olmazken parazitlenme neden olabilmektedir. Bu durum her iki olayın konak metabolizmasında ortaya çıkardığı etkilerin farklı olmasından ileri gelebilir. Hemolenfteki değişik amino asitlerin miktar ve çeşidinde ortaya çıkan değişimler konak türüne, konağın evresine, konağı parazitleyen türe, parazitlendikten sonra geçen zamana bağlı olduğundan (Chen, 1966; Mullins, 1985; Hanzal ve Jegorov, 1991; Gillott, 2005) elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçlarına zıtlık göstermemektedir.

Rahbé ve ark. (2002) *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) tarafından parazitlenen *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera, Aphididae)'da toplam serbest amino asit miktarının parazitlenmemiş olanlara göre önemli derecede arttığını, belirlenen 28 amino asitten 10 tanesinin (Try, Glu, Gln, X, Asn, GABA, Asp, Petn, Arg, Trp) miktarının parazitizmden etkilendiğini, parazitizmden en fazla etkilenen amino asitin tirozin olduğunu tayin etmişlerdir. Çalışmamızda kontrol grubuna göre paralizasyondan en fazla etkilenen amino asitin alanin ve parazitizmden en fazla etkilenen amino asitin tirozin olduğu tespit edildi. İki farklı konakta aynı amino asitin parazitizmden en fazla etkilenen amino asit olması türler arası metabolik ilişkilerde ortak yolların bulunduğunu göstermesi açısından önemli olabilir.

5.1. Paralizasyon ve parazitlenmenin konak hemolenfdeki serbest amino asitler üzerine etkisi

Farklı takımlara ait birçok böcek türünde, arjinin, histidin, izolösin, lösin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan ve valin esansiyel amino asitlerdir (Nation,

2002). Esansiyel amino asitlerin, esansiyel olmayan amino asitlere oranı türlere göre değişmektedir (Simmons, 1960). *Bracon hebetor* ile yapılan bu çalışmamızda esansiyel olmayan amino asitlerin esansiyel amino asitlerden daha yüksek konsantrasyonda bulunması dikkat çekmektedir. Simmons (1960) *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) larvalarıyla yaptığı çalışmada böceklerde genellikle esansiyel olmayan amino asitlerin esansiyel amino asitlerden daha yüksek konsantrasyonda bulunduğunu ifade etmiştir. Bu sonuç bulgularımızla paralellik göstermektedir. Çalışmamızda belirlenen 17 amino asitten esansiyel olmayan prolin (%56.67), glutamin+glisin (%17.08), alanin (%7.15) ve serin (%3.04) yüzdelerinin diğer amino asitlere göre daha fazla bulundukları tayin edildi. Değişik araştırmacılar tarafından endopterygotlarda aspartat, asparajin, fenilalanin, lösin ve izolösinin genellikle düşük değerlerde, glutamik asit+glutamin ve prolinin ise daha yüksek değerlerde bulunduğu ifade edilmiştir (Florkin ve Jeuniaux, 1964; Mullins, 1985; Yi ve Adams, 2000).

Crailsheim ve Leonhard (1997)'ın işçi bal arısı *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), Yi ve Adams (2000)'ın *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), Pennington ve ark. (2003)'nın *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera), Renault ve ark. (2006)'nın *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), Cönsoli ve Vinson (2002)'nin yeni kanadını kaybetmiş *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) kraliçelerinin hemolenfi ile yaptıkları çalışmalarda prolinin hemolenfte en fazla bulunan amino asit olduğu ortaya konulmuştur. Bu bulgular bizim sonuçlarımıza uygunluk göstermektedir. Cönsoli ve Vinson (2002) *S. invicta* erkeklerinin prolini uçmada enerji kaynağı, dişilerin kanatlarını kaybetmelerinden sonra vitellüs üretimi için kullanabildiklerini ileri sürmüşlerdir.

Parazitoit *B. hebetor* dişilerinin hem konak hemolenfinden yararlanmak hem de konağı felç edip üzerine yumurta bırakmak için ovipozitorleri ile konak larvasının derisini delerek larvaya zehir enjekte ettikleri bilinmektedir (Dweck ve ark., 2008). Quistad ve ark. (1994) *B. hebetor* zehirinin, konak *G.mellonella*'da oldukça yavaş etki gösterdiğini, zehirin enjekte edilmesinden sadece birkaç dakika sonra konakda yumuşak bir paralizasyonun meydana geldiğini ve yaklaşık 20 saatte paralizasyonun maksimum düzeye çıktığını bu sırada konağın kalp ve bağırsak kaslarının fonksiyona devam ettiğini ifade etmişlerdir.

Hemolenfte miktarı en fazla olan prolinin, paralizasyondan sonra miktarında çok önemli bir değişme görülmedi (Şekil 4.6 ve Şekil 4.26). Prolinin paralizasyondan

sonraki 6-30. saatte miktarı biraz artmış fakat daha sonraki saatlerde miktarında çok fazla değişme olmadı (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.2). Parazitlenen konak larvalarının hemolenfinde prolin miktarında bir artış oldu (Şekil 4.26).

Hemolenfteki serbest amino asitlerin, detoksifikasyonda rol oynadıkları bilinmektedir (Friedler ve Smith, 1954; Shyamala, 1964). Çalışmamızda paralize olan ve parazitlenen konakların hemolenfindeki prolinin dominant olarak bulunması da muhtemelen söz konusu konaklarda zehiri detoksifiye için bu amino asite fazla gereksinim duyulmasından kaynaklanabilir. Değişik araştırmacılar prolinin deaminasyondan sonra kalan karbon iskeletinin, enerji elde etmek için α -ketoglutarat halinde sitrik asit döngüsüne girerek metabolize edildiğini ifade etmişlerdir (Bursell, 1981; Candy ve ark., 1997; Cönsoli ve Vinson, 2004; Phalaraksh ve ark., 2008; Assar ve ark., 2010). Çalışmamızda parazitlenmiş konaklarda yüksek oranda bulunan prolinin, parazitoit larvaları tarafından enerji gereksiniminin fazla olduğu evrelerde kullanılmak üzere depolanmış olmasından kaynaklanabilir. Consoli ve Vinson (2004), endoparazitoit *T. nigriceps* tarafından parazitlenen *H. virescens*'in hemolenfindeki prolin miktarının arttığını ve bu artışın embriyogenik organogenezis ve segmentasyon ile ilgili olduğunu öne sürmüşlerdir.

Serin, pirimidinler, pürinler, kreatin ve porfirinleri içeren, birçok ürünün biyosentezinde kullanılan (Furuya, 2008), asetil-CoA üretimine katkıda bulunarak yüksek enerji gereksinimi duyulan evrelerde enerji kaynağı olan (Cönsoli ve Vinson, 2004), böcek immün reaksiyonlarında önemli bir yer tutan serin proteazların aktif bölgesinde yer alan (Gorman ve Paskewitz, 2001; Krem ve Cera, 2001), dolayısıyla kutikulin melanizasyonundan sorumlu kilit enzimlerden fenoloksidazların (Hartzer ve ark., 2005; Ruuhola ve ark., 2010) aktivasyonunda (Gorman ve Paskewitz, 2001; Kan ve ark., 2008; Ruuhola ve ark., 2010; Tian ve ark., 2010) rol oynayan önemli bir amino asittir. Parazitoit *B. hebetor* ile yaptığımız çalışmada paralize olan konak larvalarında serin yüzdesinin paralizasyondan sonraki ilk 24 saatte hızlı bir düşüş gösterdiği fakat daha sonra yavaş yavaş artarak paralizasyonun 30. saatinden sonra kontrol grubundaki değerden farksız ($p > 0.05$) hale geldiği görülmüştür (Şekil 4.7, Çizelge 4.2). Serin miktarının parazitlenen konaklarda ilk 48 saat içinde önemsiz ($p>0.05$) derecede azaldığı 72. saatte arttığı tespit edildi (Şekil 4.40, Çizelge 4.3). Paralize olan ve parazitlenen konak larvalarının hemolenfinde ilk 24 saatte serin miktarında gözlenen düşüş, bu konakların besin alamaması nedeniyle serini enerji kaynağı olarak

kullanmalarından, paralizasyon ve parazitlenme sonucu konakta hemen başlayan immün reaksiyonlar için fazla miktarda serin proteaz sentezinin yapılmasından ve/veya parazitoidin konağa enjekte ettiği maddenin konaktaki serin sentezini baskılanmış olmasından ortaya çıkmış olabilir. Buna karşılık paralizasyondan 30 saat sonra konaktaki serin miktarının yavaş yavaş artarak kontrol grubundaki değerden farklı ($p > 0.05$) hale gelmesi ise paralize olan konağın enerji ihtiyacının azalması ve immün reaksiyonlarının zayıflaması nedeniyle daha az serinin tüketilmiş olmasına bağlanabilir.

Alaninin amino asitlerin sentezi sırasında, transaminasyon reaksiyonlarında bir amino-grup donörü olarak (Osana ve ark., 2000) ve piruvik asitten glukoz üretiminde (Assar ve ark., 2010) önemli rol oynadığı bilinmektedir. Çalışmamızda kontrol grubuna göre, paralize olan konak larvalarında alanin yüzdesinin paralizasyondan sonraki ilk 18 saatte çok hızlı bir düşüş gösterdiği ve 18. saatten sonra tekrar yavaş yavaş arttığı tespit edildi (Şekil 4.8, Çizelge 4.2). Parazitlenen konaklarda da alanin miktarı zamana bağlı olarak önemsiz ($p > 0.05$) de olsa azalmıştır (Şekil 4.39, Çizelge 4.3). Paralizasyon ve parazitlenme sonucu alaninin yüzdesinde gözlenen düşüş, bu olaylar sonrası, savunma amaçlı olan proteinlerin sentezi ve enerji için bu amino asitin transaminasyon reaksiyonlarında fazlasıyla kullanılmasından olabilir. Hemolenfteki alanin ve prolin miktarları arasında bir ilişkinin olduğu, alaninin fazla miktarda bulunmasının, prolinin enerji kaynağı olarak daha fazla kullanmasından ortaya çıkabileceği ileri sürülmüştür (Bursell, 1981; Candy ve ark., 1997; Phalaraksh ve ark., 2008). Bu nedenle çalışmamızda paralize olan konak larvalarında tespit ettiğimiz alanin miktarındaki düşme, bunun enerji için prolinden daha fazla tüketilmesi sonucu ortaya çıkmış olabilir.

Paralizasyonu ve parazitlenmeyi takiben larvalardaki fenilalanin miktarında kontrol grubundakilere göre önemli ($p \leq 0.05$) bir artış olduğu görülmektedir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.31). Fenilalaninin, melanin oluşumunda rol oynayarak kütikül renginin koyulaşmasını sağladığı belirtildi (Davis, 1975; Nation, 2002; Ruuhola ve ark., 2010). Çalışmamızda paralize olan ve parazitlenen konak larvalarının, farklı bir şekilde yaralanmış ya da zarar görmüş larvalardaki gibi koyulaşmadığı görüldü. Bu durum paralize olan ve parazitlenen larvalardaki melanin eksikliğinden kaynaklanabilir. Buna göre paralize olan ve parazitlenen konaklarda hemolenfteki fenilalanin miktarında gözlenen artış muhtemelen fenilalanin melanin sentezi için kullanılamamış olmasından dolayı birikiminden olabilir.

Paralize olan konak larvalarındaki asparajin miktarı önemsiz ($p > 0.05$), parazitlenenlerde önemli ($p \leq 0.05$) derecede azaldı (Şekil 4.10, Çizelge 4.2). Asparajin, aspartata dönüştürülerek okzaloasetatın öncüsü olarak krebs döngüsüne girer ve böylelikle enerji kaynağı olarak kullanılmış olur (Öhman ve ark., 1995). Çalışmamızda paralize olan ve parazitlenen konak hemolenfindeki asparajin miktarındaki düşüş, paralize olan ve parazitlenen konağın beslenememesi nedeniyle diğer amino asitler gibi asparajinin enerji elde etmek için kullanılmasından olabilir. Parazitlenen konaklarda asparajin miktarında ortaya çıkan düşüşün daha fazla olması, konak üzerinde gelişen larvaların sadece hemolenf ile beslenmeyip konak dokularını tüketmeleri sonucu enerji için bu amino asiti fazla kullanmış olmalarına bağlanabilir.

Esansiyel bir amino asit olan treoninin, paralize olduktan sonra geçen 36. saat hariç konak hemolenfindeki miktarında önemli bir değişiklik ortaya çıkmadı, sadece paralizasyondan sonraki 36. saatte nedeni tam anlaşılmayan anormal bir artış meydana geldi (Şekil 4.11 ve Çizelge 4.2). Esansiyel olan treoninin sentezi söz konusu olmadığına göre, paralizasyondan sonraki 36. saate konak hemolenfinde gözlenen bu artış ya diğer amino asitlere göre treonin 36. saatte çok az kullanılmasından olabilir yada nedeni mevcut bilgilerle açıklanamayan bir nedenden olabilir. Parazitlenen konak hemolenfinde ise treonin miktarında önemli bir değişim olmadı.

Paralize olan ve parazitlenen konak larvalarında kontrol grubuna göre Gln+Gly toplam yüzdesinin düştüğü belirlendi (Şekil 4.21 ve Şekil 4.27). Bu düşme parazitlenen konaklarda önemli ($p \leq 0.05$) paralize olanlarda önemsizdir ($p > 0.05$). Glutamin sentetaz tarafından bir detoksifikasyon ürünü olarak atık amonyaktan sentezlenen glutamin, böceklerin hemolenfinde en bol bulunan amino asitlerden biridir. Glutamin nörotransmitter olarak (Piyankarage ve ark., 2008), protein, nükleotit ve yağ asit sentezinde, glukoneogenezde, hemolenf pH tamponu (Kutlesa ve Caveney, 2001) ve önemli bir osmolit olarak (Hazel ve ark., 2003), kitini meydana getiren N-asetilglukozamin sentezinde rol oynayan önemli bir amino asittir (Kutlesa ve Caveney, 2001). Serbest amino asitlerden glisin detoksifikasyonda önemli rol oynar (Assar ve ark., 2010). Paralize olan ve parazitlenmiş konaklarda glutamin+glisin miktarındaki düşüş muhtemelen bu amino asitlerin paralizasyonda kullanılan zehirin ve parazitoit larvalarının beslenmeleri sırasında salgıladıkları maddelerin detoksifikasyonunda fazlasıyla kullanılmış olmasından ortaya çıkabilir. Parazitlenmiş konaklarda Gln+Gly

yüzdesindeki düşüş, gelişen parazitoit larvalarının glutamini yukarıda belirtilen metabolik olaylarda yoğun bir şekilde kullanmasıyla da ilgili olabilir.

Hemolenfteki arjinin miktarının, konak larvaları paralyze olduktan veya parazitlendikten sonra kontrol grubuna göre önemli ($p \leq 0.05$) derecede düştüğü görülmektedir (Şekil 4.20 ve Şekil 4.28). Arjinin deri değişiminde, farklılaşmada, pupa oluşumunda (Chen, 1966), prolin sentezinde (Sabree ve ark., 2009), azotun atılmasında taşıyıcı olarak önemli rol oynar (Cloutier, 1986). Arjinin miktarındaki düşüş, parazitoit tarafından direkt tüketimiyle açıklanabilir. Esansiyel bir amino asit olan arjininin, parazitoit larvaları tarafından yukarıda bahsedilen metabolik faaliyetlerde kullanımı için tek kaynak konak hemolenfidir. Ayrıca çalışmamızda prolin miktarında tespit ettiğimiz artışa karşılık, paralyze olan ve parazitlenen konaklardaki arjinin miktarındaki düşme arjininin prolin sentezinde kullanılmasına bağlanabilir.

Şekil 4.17 ve Şekil 4.30'dan, kontrol grubuna göre, paralyze olan konak larvalarında lizin yüzdesinde önemsiz ($p > 0.05$), parazitlenmiş olanlarda önemli ($p \leq 0.05$) bir düşüş meydana geldiği görülmektedir. Serbest lizin, arjininin proline dönüşümünde rol oynayan arjinaz enziminin önemli bir rekabetçi inhibitörüdür (Reddy ve Campbell, 1969). Lizin konsantrasyonundaki düşüş, arjinaz aktivitesinde artışa neden olarak arjininin proline dönüşümü arttırmış olabilir. Çalışmamızda paralyze olan ve parazitlenen konaklardaki prolin miktarındaki artış buna karşılık arjinin miktarındaki düşüşün bir nedeni de lizin konsantrasyonundaki bu düşüş olabilir.

Çalışmamızda konak larvalarının hemolenfindeki tirozin miktarının paralizasyondan sonra geçen süreye bağlı olarak önemsiz derecede ($p > 0.05$), parazitlenmiş olanlarda önemli ($p \leq 0.05$) derecede arttığı tespit edildi (Şekil 4.18 ve Şekil 3.32). Rahbé ve ark. (2002) *A. ervi* tarafından parazitlenen afid *A. pisum*'da tirozin miktarında ortaya çıkan artışın, konağın tirozin gerektiren fizyolojik yollarının bastırılmasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Larvalarda tirozin, böceklerin kutikülünün sertleşme sürecinde etkili olan polifenollerin ve quinonların oluşumunda kullanılır (Dennell, 1958; Aboul-Ela ve ark., 1991; Morgan, 2004). Her deri değiştirme olayından birkaç gün önce tirozin miktarında artış meydana gelir ve deri değişiminden sonra tirozin miktarında keskin ve ani bir düşüş meydana gelir (Florkin ve Jeuniaux, 1964). Bu durum tirozinin kutikülün melanizasyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir (Behmer, 2006). Bu sonuçtan yola çıkarak çalışmamızda paralyze olan ve parazitlenmiş konak larvalarının hemolenfindeki serbest tirozin miktarındaki artışı,

bu larvaların gelişimlerinin durması nedeniyle deri değiştirememelerine bu nedenle bu amino asitin hemolenfte birikmesine bağlayabiliriz.

Paralize olan ve parazitlenen konak larvalarında yüzdesi değişmeyen amino asitlerin çoğu esansiyel amino asitlerdir. Parazitoit larvalarının bu amino asitleri elde edebilecekleri tek kaynak konak hemolenfidir, bu yüzden bu amino asitlerin miktarlarının az çok değişmeden kalması parazitoit larvalarının gelişimleri için önemlidir.

5.2. Paralizasyon ve parazitlenmenin konak hemolenfindeki toplam protein miktarına etkisi

Böcek hemolenfinde miktarı gelişim evresine, fizyolojik ya da immünolojik süreçlere bağlı olarak değişen birçok protein bulunur. Hemolenf proteinleri birçok böcek türünde osmotik dengeyi ve optimal turgor basıncını korumaya yardımcı olur (Atmowidjojo ve ark., 1999). Parazitlenen konakların hemolenf protein konsantrasyonunda artma veya azalma şeklinde değişiklikler meydana geldiği ve bu değişikliklerin konak türüne, konağın evresine (Florkin ve Jeuniaux, 1964), konağı parazitleyen türe (Vinson, 1990), parazitlendikten sonra geçen zamana (Consoli ve Vinson 2004; Consoli ve ark., 2005) göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Parazitlenmenin etkisiyle toplam protein miktarının azaldığını gösteren çalışmalar vardır (Fathpour ve Dahlman, 1995; Shelby ve Webb, 1997; Salvador ve Cónsoli, 2008). Parazitlenmiş olan konaklardaki toplam protein miktarındaki azalma, konakta gelişen parazitoit larvalarının direk tüketimine bağlı olarak ortaya çıkabileceği gibi (Shelby ve Webb, 1997), konak savunmasıyla (profenoloksidaz, lipoforin) ve konak gelişimiyle (juvenil hormon esterase, juvenil hormon bağlayıcı proteinler, depo proteinler) ilgili spesifik proteinlerinin sentezinin önlenmesinden de kaynaklanabilmektedir (Cónsoli ve ark., 2005; Salvador ve Cónsoli, 2008).

Salvador ve Cónsoli (2008), endoparazitoit *C. flavipes* tarafından parazitlenen *D. saccharalis* larvalarının hemolenfinde parazitlenmeden hemen sonra belirli konak proteinlerinin ve parazitizme özel proteinlerin sentezinde bir artış, fakat larvalardaki toplam protein miktarında azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Kaeslin ve ark. (2005), yumurta-larva parazitoidi *C. inanitus* tarafından parazitlenen *S. littoralis* larvalarının, Fathpour ve Dahlman (1995) *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) polidnavirüsü enjekte edilen *H. virescens* larvalarının hemolenfindeki protein konsantrasyonunun önemli derecede düştüğünü ileri sürmüşlerdir.

Hemolenf protein konsantrasyonunda meydana gelen değişmeler konak ve parazitoit türüne, paralizasyon veya parazitlenmeden sonra geçen zamana bağlı olarak değişmektedir. *Bracon hebetor* ile olan bu çalışmamızda paralize olan ve parazitlenen konak *G. mellonella* larvalarında toplam protein miktarında, önemsiz ($p > 0.05$) bir artış olduğu bulundu. Altuntaş ve ark. (2010) *B. hebetor* tarafından parazitlenen *E. kuehniella* larvalarının, hemolenfindeki toplam protein miktarının parazitlenmeden 24 ve 48 saat sonra azaldığını fakat bu azalmanın önemsiz olduğunu, buna karşılık SDS-PAGE analizlerine göre, belirlenen proteinlerden 12 tanesinin miktarı azalırken, beş tanesinin arttığını buna dayanarak parazitlenmenin konak hemolenf proteinleri üzerinde sadece kantitatif yönden düzenleyici etki yaptığını, kalitatif olarak etkili olmadığını öne sürmüşlerdir.

Parazitlenmenin etkisiyle toplam protein miktarının azaldığını gösteren çalışmaların (Fathpour ve Dahlman, 1995; Shelby ve Webb, 1997; Salvador ve Cönsoli, 2008; Altuntaş ve ark. 2010) aksine bizim çalışmamızda önemsiz de ($p > 0.05$) olsa bir artış olduğu görülmektedir. Bu zıtlık çalışılan konakların farklı olmasından kaynaklanabileceği gibi, Nakamatsu ve Tanaka (2004) tarafından ileri sürüldüğü gibi konak üzerinde gelişimlerini sürdüren parazitoit larvalarının sayılarının farklı olmasından veya paralizasyon ve parazitlenmenin, normal larvalarda pupa oluşumundan önce gözlenen protein konsantrasyonundaki azalmayı engellemelerinden (Cönsoli ve ark. 2005) kaynaklanabilir. Nakamatsu ve Tanaka (2004) endoparazitoit *C. kariyai* tarafından parazitlenen *P. separata* da konak hemolenfindeki karbohidrat, lipit ve protein tüketiminin konakta bulunan parazitoit larva sayısına bağlı olarak değiştini, çok fazla sayıda parazitoit larvası bulunan konakların hemolenfindeki protein, lipit ve trehaloz konsantrasyonunun az sayıda larva bulunanlardan önemli derecede düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Cönsoli ve ark. (2005) parazitlenmenin, konak larvalarının hemolenfindeki toplam protein miktarını artırmadığını sadece parazitlenmemiş larvalarda pupa oluşumundan önce gözlenen protein konsantrasyonundaki azalmayı engelleyerek, hemolenfteki protein miktarının yüksek seviyede kalmasını sağladığını ileri sürmüşlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda parazitoit *B. hebetor* tarafından paralize edilen ve/veya parazitlenen konak *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki serbest amino asitlerin miktarlarındaki ve toplam protein miktarındaki değişimler incelendi. Hemolenf örneklerinde 17 amino asit tespit edildi. Çalışmamızda 17 amino asit birbirine oranlanarak herbirinin yüzdesi bulunmuş ve amino asitlerin her birisinin yüzdelerinde meydana gelen değişimler tespit edilebildi. Tespit edilen 17 amino asitten yüzdesi en fazla olan amino asit prolindir.

Elde edilen sonuçlar paralizasyonun ve parazitlenmenin konak larvalarının hemolenfindeki amino asitlerin miktarında ve çeşidinde değişiklik ortaya çıkardığını, fakat bu iki olayın etkisinin bir dereceye kadar farklı olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda kontrol grubuna göre paralizasyondan miktarı en fazla etkilenen amino asitin alanin ve parazitizmden en fazla etkilenen amino asitin tirozin olduğu tespit edildi. Paralizasyon sonrasında konak hemolenfindeki bazı amino asitlerin yüzdelerinde artış (Pro, Phe, Thr), bazılarında azalma (Ser, Ala, Asn) olurken, bazı amino asitlerin (Val, Leu, Ile, His, Trp, Lys, Tyr, Met, Arg, Gln+Gly) yüzdelerinde ise herhangi bir değişim tespit edilmedi. Parazitlenmiş konak larvalarının hemolenfinde de, bazı amino asitlerin yüzdelerinin arttığı (Pro, Phe, Try), bazılarının azaldığı (Gln+Gly, Arg, Asn, Lys), bazılarının (Val, His, Leu, Ile, Trp, Met, Ala, Ser, Thr) ise parazitlenmeden etkilenmediği tespit edildi.

Konak hemolenfinde yapılan amino asit analizleri, konakta gelişmekte olan parazitoit larvalarında da yapılarak, konaktaki kimyasal değişim ile parazitoidin besinsel ihtiyaçları arasındaki metabolik ilişki belirlenebilir. Elde edilen sonuçlar pratikte özellikle biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılacak parazitoit türlerinin doğal konaklarının yeterli olmadığı durumlarda, kompozisyonu belirli sentetik besinler hazırlanarak laboratuvar şartlarında toplu üretilmelerinde kullanılabilir.

Çalışmamızda hemolenfdeki toplam protein miktarının paralizasyondan ve parazitlenmeden önemli derecede etkilenmediği belirlendi. Fakat SDS-PAGE analizleri yapılarak paralizasyon ve parazitlenmenin hemolenfteki değişik işlevli proteinlerin her birini nasıl etkiledikleri ve buna bağlı olarak paralizasyon ve parazitlenme nedeniyle konakta ve parazitoitte ortaya çıkan değişik tepkilerin nedenleri açıklanabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abdel-latif, M., Hilker, M., 2008. Innate immunity: Eggs of *Manduca sexta* are able to respond to parasitism by *Trichogramma evanescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 136-145.
- Aboul-Ela, R., Kamel, M.Y., Salama, H.S., El-Moursy, A., Abdel-Razek, A., 1991. Changes in the biochemistry of the hemolymph of *Plodia interpunctella* after treatment with *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 4(1), 29-35.
- Alleyne, M., Chappell, M.A., Gelman, D.B., Beckage, N.E., 1997. Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on metabolic rate in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, 43 (2), 143-154.
- Alleyne, M., Beckage, N.E., 1997. Parasitism-induced effects on host growth and metabolic efficiency in tobacco hornworm larvae parasitized by *Cotesia congregata*. *Journal of Insect Physiology*, 43 (4), 407-424.
- Altuntaş, H., Kılıç, A.Y., Zeytinoğlu, H.S., 2010. The effects of parasitism by the ectoparasitoid *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) on the host hemolymph proteins in the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Turkish Journal of Zoology*, 34 (3), 409-416.
- Anand, A.N., Lorenz, M.W., 2008. Age-dependent changes of fat body stores and the regulation of fat body lipid synthesis and mobilisation by adipokinetic hormone in the last larval instar of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology*, 54, 1404-1412.
- Arrese, E.L., Soulages, J.L., 2010. Insect Fat Body: Energy, Metabolism and Regulation. *Annual Review of Entomology*, 55, 207-225.
- Asgari, S., 2006. Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: Their role in host-parasite interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 61, 146-156.
- Asgari, S., Rivers, D.B., 2011. Venom proteins from endoparasitoid wasp and their role in host-parasite interactions. *Annual Review of Entomology*, 56, 313-335.
- Assar, A.A., Abo El-Mahasen, M. M., Khalil, M. E., Mahmoud, S. H., 2010. Biochemical effects of some insect growth regulators on the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences C Physiology & Molecular Biology*, 2(2), 33-44.
- Atmowidjojo, A.H., Erickson, E.H., Wheeler, D.E., Cohen, A.C., 1999. Regulation of hemolymph osmolality in feral and domestic honeybees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 122, 227-233.
- Baker, J.E., Fabrick, J.A., 2000. Host hemolymph proteins and protein digestion in larval *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 937-946.
- Barandoc, K.P., Kim, Y., 2009. Identification of three host translation inhibitory factors encoded in *Cotesia glomerata* bracovirus. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D: Genomics and Proteomics*, 4(3), 218-226.
- Bauerfeind, S., Fischer, K., 2005. Effects of adult-derived carbohydrates, amino acids and micronutrients on female reproduction in a fruit-feeding butterfly. *Journal of Insect physiology*, 51, 545-554.
- Beckage, N.E., Templeton, T.J., Nielsen, B.D., Cook, D.I., Stoltz, D.B., 1987. Parasitism-induced hemolymph polypeptides in *Manduca sexta* (L.) larvae

- parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata* (Say). *Insect Biochemistry*, 17 (3), 439-455.
- Beckage, N.E., Gelman, D.B., 2004. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. *Annual Review of Entomology*, 49, 299-330.
- Behmer, S.T., 2006. Insect Dietary Needs: Plants as food for insects. *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. (Editor: R.M. Goodman), s: 1-4, Marcel Dekker Publishers, New York, NY.
- Benson, J.F., 1973. Intraspecific competition in the population dynamics of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). *The Journal of Animal Ecology*, 42 (1), 105-124.
- Bernstein, C., Heizmann, A., Desouhant, E., 2002. Intraspecific competition between healthy and parasitised hosts in a host-parasitoid system: Consequences for life-history traits. *Ecological Entomology*, 27, 415-423.
- Bezemer, T.M., Harvey, J.A., Mills, N.J., 2005. Influence of adult nutrition on the relationship between body size and reproductive parameters in a parasitoid wasp. *Ecological Entomology*, 30, 571-580.
- Bianchi, F.J.J.A., Wäckers, F.L., 2008. Effects of flower attractiveness and nectar availability in field margins on biological control by parasitoids. *Biological Control*, 46, 400-408.
- Bischof, C., Ortel, J., 1996. The effects of parasitism by *Glyptapanteles liparidis* (Braconidae: Hymenoptera) on the hemolymph and total body composition of gypsy moth larvae (*Lymantria dispar*, Lymantriidae: Lepidoptera). *Parasitology Research*, 82, 687-692.
- Brodeur, J., Boivin, G., 2004. Functional ecology of immature parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 49, 27-49.
- Brown, P.R., Grushka, E., Lunte, S., 2005. *Advances in Chromatography*. Volume 43. Marcel Dekker, 323 s, New York.
- Bursell, E., 1981. The role of proline in energy metabolism. *Energy Metabolism in Insects*. (Editor: R.G.H. Downer), s: 135-155, Plenum Press. New York and London.
- Candy, D.J., Becker, A., Wegener, G., 1997. Coordination and integration of metabolism in insect flight. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117B(4), 497-512.
- Carton, Y., Nappi, A.J., 1997. Dropsophila cellular immunity against parasitoids. *Parasitology Today*, 13(6), 218-227.
- Chang, C.L., 2004. Effect of amino acids on larvae and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97 (3), 529-535.
- Checa-Moreno, R., Manzano, E., Mirón, G., Capitán-Vallvey, L.F., 2008. Revisitation of the phenylisothiocyanate-derivatives procedure for amino acid determination by HPLC-UV. *Journal of Separation Science*, 31, 3817-3828.
- Chen, P.S., 1966. Amino acid and protein metabolism in insect development. *Advances in Insect Physiology*. Vol 3, (Editors: J.W.L. Beament, J.E. Treherne, V.B. Wigglesworth), s: 53-132, Academic Press Inc. (London) LTD., New York.
- Cho, M.Y., Lee, H.S., Lee, K.M., Homma, K., Natori, S., Lee, B.L., 1999. Molecular cloning and functional properties of two early-stage encapsulation-relating proteins from the coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae. *European Journal of Biochemistry*, 262, 737-744.

- Chung, K.T., Ourth, D.D., 2000. Larval and pupal induction and N-terminal amino acid sequence of lysozyme from *Heliothis virescens*. *Journal of Insect Physiology*, 46, 563-572.
- Cloutier, C., 1986. Amino acid utilization in the aphid *Acyrtosiphon pisum* infected by the parasitoid *Aphidius smithi*. *Journal of Insect Physiology*, 32 (4), 263-267.
- Colinet, H., Hance, T., Vernon, P., Bouchereau, A., Renault, D., 2007. Does fluctuating thermal regime trigger free amino acid production in the parasitic wasp *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae)? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147, 484-492.
- Coşkun, M., Kayis, T., Sulanc, M., Ozalp, P., 2006. Effects of different honeycomb and sucrose levels on the development of greater wax moth *Galleria mellonella* larvae. *International Journal of Agriculture & Biology*, 8 (6), 855-858.
- Cônsoli, F.L., Vinson, S.B., 2002. Hemolymph of reproductives of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae)- Amino acids, proteins and sugars. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 132, 711-719.
- Cônsoli, F.L., Vinson, S.B., 2004. Host regulation and the embryonic development of the endoparasitoid *Toxoneuron nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 137, 463-473.
- Cônsoli, F.L., Brandt, S.L., Coudron, T.A., Vinson, S.B., 2005. Host regulation and release of parasitism-specific proteins in the system *Toxoneuron nigriceps*-*Heliothis virescens*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 142 (2), 181-191.
- Cônsoli, F.L., Lewis, D., Keeley, L., Vinson, S.B., 2007. Characterization of a cDNA encoding a putative chitinase from teratocytes of the endoparasitoid *Toxoneuron nigriceps*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 122, 271-278.
- Crailsheim, K., Leonhard, B., 1997. Amino acids in honeybee worker haemolymph. *Amino Acids*, 13, 141-153.
- Dabbağoglu, S., 2004. Parazitoit *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) ile konukçuları *Plodia interpunctella* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae) ve *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) arasındaki biyolojik ilişkiler üzerine araştırmalar. Doktora tezi. Ankara üniversitesi fen bilimleri enstitüsü, Bitki koruma anabilim dalı. Ankara, 134 s.
- Darwish, E., El-Shazly, M., El-Sherif, H., 2003. The choice of probing sites by *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) foraging for *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research*, 39, 265-279.
- Davis, G.R.F., 1975. Essential dietary amino acids for growth of larvae of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. *The Journal of Nutrition*, 105, 1071-1075.
- Dennell, R., 1958. The amino acid metabolism of a Developing insect cuticle: The larval cuticle and puparium of *Calliphora vomitoria*. I. Changes in amino acid composition during development. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 148, 270-279.
- Doury, G., Bigot, Y., Periquet, G., 1997. Physiological and biochemical analysis of factors in the female venom gland and larval salivary secretions of the ectoparasitoid wasp *Eupelmus orientalis*. *Journal of Insect Physiology*, 43(1), 69-81.
- Dweck, H.K.M., Gadallah, N.S., Darwish, E., 2008. Structure and sensory equipment of the ovipositor of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). *Micron*, 39, 1255-1261.

- Ergin, E., Uçkan, F., Rivers, D.B., Sak, O., 2006. In vivo and in vitro activity of venom from the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 61, 87-97.
- Evans, D.R., Dethier, V.G., 1957. The regulation of taste thresholds for sugars in the blowfly. Journal of Insect Physiology, 1, 3-17.
- Evans, P.D., Crossley, A.C., 1974. Free amino acids in the haemocytes and plasma of the larva of *Calliphora vicina*. The Journal of Experimental Biology, 61, 463-472.
- Fadamiro, H.Y., Heimpel, G.E., 2001. Effects of partial sugar deprivation on lifespan and carbohydrate mobilization in the parasitoid *Macrocentrus grandis* (Hymenoptera: Braconidae). Annals of Entomological Society of America, 94 (6), 909-916.
- Falabella, P., Tremblay, E., Pennacchio, F., 2000. Host regulation by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: the role of teratocytes. Entomologia Experimentalis et Applicata, 97, 1-9.
- Fathpour, H., Dahlman, D.L., 1995. Polydnviruses of *Microplitis croceipes* prolongs the larval period and changes hemolymph protein content of the host *Heliothis virescens*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 28, 33-48.
- Fields, P.G., Fleurat-Lessard, F., Lavenseau, L., Febvay, G., Peypelut, L., Bonnot, G., 1998. The effect of cold acclimation and deacclimation on cold tolerance, trehalose and free amino acid levels in *Sitophilus granarius* and *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera). Journal of Insect Physiology, 44, 955-965.
- Florkin, M., Jeuniaux, C.H., 1964. Hemolymph: Composition. *The Physiology of Insecta*. Vol 3. (Editor: M. Rockstein), s: 110-152, Academic Pres, New york and London.
- Friedler, L., Smith, J.N., 1954. Comparative detoxication. 3. Hippuric acid formation in adult locusts. Biochemical Journal, 57 (3), 396-400.
- Fröblius, A.C., Kanost, M.R., Götz, P., Vilcinckas, A., 2000. Isolation and characterization of novel inducible serine protease inhibitors from larval hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. European Journal of Biochemistry, 267, 2046-2053.
- Furuya, S., 2008. An essential role for de novo biosynthesis of L-serine in CNS development. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 17(S1), 312-315.
- Gelman, D.B., Rojas, M.G., Kelly, T.J., Hu, J.S., Bell, R.A., 2000. Ecdysteroid and free amino acid content of eggs of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 44, 172- 182.
- Genç, H., 2006. General principles of insect nutritional ecology. Trakya University Journal of Science, 7(1), 53-57.
- Gheshlaghi, R., Scharer, J.M., Moo-Young, M., Douglas, P.L., 2008. Application of statistical design for the optimization of amino acid separation by reverse-phase HPLC. Analytical Biochemistry, 383, 93-102.
- Gillott, C. 2005. *Entomology*. Springer, 831 s, Dordrecht, Netherlands.
- Giron, D., Casas, J., 2003. Lipogenesis in an adult parasitic wasp. Journal of Insect Physiology, 49, 141-147.
- Godfray, H.J.C. 1994. *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Pres, Princeton, New Jersey.
- González, M.S., Soulages, J.L., Brenner, R.R., 1991. Changes in the hemolymph lipophorin and very high density lipoprotein levels during the fifth nymphal and adult stages of *Triatoma infestans*. Insect Biochemistry, 21 (6), 679-687.

- Gorman, M.J., Paskewitz, S.M., 2001. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 257-262.
- Gross, P., 1993. Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 38, 251-273.
- Gül, M., Gülel, A., 1995. Parasitoid *Bracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae)'un biyolojisi ve konak larva büyüklüğünün verim ve eşey oranı üzerine etkisi. *Turkish Journal of Zoology*, 19, 231-235.
- Gülel, A., 1982. Studies on the biology of *Dibrachys boarmiae* (Walker) (Hymen., Pteromalidae) parasitic on *Galleria mellonella* L. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 94 (1-5), 138-149.
- Gündüz, E.A., Gülel, A., 2004. *Bracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) erginlerinde konukçu türünün ve besin tipinin ömür uzunluğuna etkisi. *Türk Entomoloji Dergisi*, 28, 275-282.
- Gündüz, E.A., Gülel, A., 2005. Investigation of fecundity and sex ratio in the parasitoid *Bracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) in relation to parasitoid age. *Turkish Journal of Zoology*, 29, 291-294.
- Gündüz, E.A., Gülel, A., Işıtan, Ö.V., 2008. İki konukçu türün, larva ektoparazitoiti *Bracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae)'da protein, lipit ve glikojen miktarlarına etkisi. *Türk Entomoloji Dergisi*, 32, 33-42.
- Gündüz, E.A., Gülel, A., 2010. Protein, lipid and glycogen levels in the parasitoid *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). *Turkish Journal of Zoology*, 34, 243-248.
- Gürbüz, M.F., Aksoylar, M.Y., 2006. Reproduction capacity and sex ratio of *Bracon hebetor* (Say) (Hymenoptera, Braconidae), parasitoid on *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera, Pyralidae). *Journal of the Entomological Research Society*, 8(1), 37-41.
- Hance, T., van Baaren, J., Vernon, P., Boivin, G., 2007. Impact of extreme temperatures on parasitoids in a climate change perspective. *Annual Review of Entomology*, 52, 107-126.
- Hanzal, R., Jegorov, A., 1991. Changes in free amino acid composition in haemolymph of larvae of the wax moth, *Galleria mellonella* L., during cold acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100A (4), 957-962.
- Hartzer, K.L., Zhu, K.Y., Baker, J.E., 2005. Phenoloxidase in larvae of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): Molecular cloning of the proenzyme cDNA and enzyme activity in larvae paralyzed and parasitized by *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 59, 67-79.
- Harvey, J.A., Jervis, M.A., Gols, R., Jiang, N., Vet, L.E.M., 1999. Development of the parasitoid, *Cotesia rubecula* (Hymenoptera: Braconidae) in *Pieris rapae* and *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae): evidence for host regulation. *Journal of Insect Physiology*, 45, 173-182.
- Hausmann, C., Wäckers, F.L., Dorn, S., 2005. Sugar convertibility in the parasitoid *Cotesia glomerata* (Hymenoptera: Braconidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 60, 223-229.
- Hayakawa, Y., 1994. Cellular immunosuppressive protein in the plasma of parasitized insect larvae. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (20), 14536-14540.
- Hazel, M.H., Ianowski, J.P., Christensen, R.J., Maddrell, S.H.P., O'Donnell, M.J., 2003. Amino acids modulate ion transport and fluid secretion by insect Malpighian tubules. *The Journal of Experimental Biology*, 206, 79-91.

- Heimpel, G.E., Antolin, M.F., Franqui, R.A., Strand, M.R., 1997. Reproductive isolation and genetic variation between two "Strains" of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*, 9, 149-156.
- Hochuli, A., Lanzrein, B., 2001. Characterization of a 212 kD protein, released into the host by the larva of the endoparasitoid *Chelonus inanitus* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Physiology*, 47, 1313-1319.
- Horváti, K., Bősze, S., Hudecz, F., Medzihradszky-Schweiger, H., 2008. A simple method for monitoring the cysteine content in synthetic peptides. *Journal of Peptide Science*, 14, 838-844.
- How Does High Performance Liquid Chromatography Work? http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055&locale=en_TR (30.10.2011)
- Janssen, P.S.L., van Nispen, J.W., Melgers, P.A.T.A., van den Bogaart, H.W.M., Hamelinck, R.L.A.E., Goverde, B.C., 1986. HPLC analysis of phenylthiocarbamyl (PTC) amino acids. I. Evaluation and optimization of the procedure. *Chromatographia*, 22 (7-12), 345-350.
- Jervis, M.A., Kidd, N.A.C., Walton, M., 1992. A review of methods for determining dietary range in adult parasitoids. *Entomophaga*, 37 (4), 565-574.
- Kaeslin, M., Pfister-Wilhelm, R., Molina, D., Lanzrein, B., 2005. Changes in the haemolymph proteome of *Spodoptera littoralis* induced by the parasitoid *Chelonus inanitus* or its polydnavirus and physiological implications. *Journal of Insect Physiology*, 51, 975-988.
- Kan, H., Kim, C-H., Kwon, H-M., Park, J-W., Roh, K-B., Lee, H., Park, B-J., Zhang, R., Zhang, J., Söderhäll, K., Ha, N-C., Lee, B.L., 2008. Molecular control of phenoloxidase-induced melanin synthesis in an insect. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (37), 25316-25323.
- Klowden, M.J., 2007. *Physiological systems in insects*. Academic Press Elsevier, 688s, USA.
- Krem, M.M., Cera, E.D., 2001. Molecular markers of serine protease evolution. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 20 (12), 3036-3045.
- Kutlesa, N.J., Caveney, S., 2001. Insecticidal activity of glufosinate through glutamine depletion in a caterpillar. *Pest Management Science*, 57, 25-32.
- Lee, S., Kim, Y., 2008. Two homologous parasitism-specific proteins encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus and their expression profiles in parasitized *Plutella xylostella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 67, 157-171.
- Lowry, O.H., Rose Brough, N.J., Farr, A.L., Randall, V.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Lu, J.-F., Hu, J., Fu, W.-J., 2006. Levels of encapsulation and melanization in two larval instars of *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lep., Pyralidae) during simulation of parasitization by *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hym., Braconidae). *Journal of Applied Entomology*, 130(5), 290-296.
- Malik, M.A., Malik, F.A., 2009. Ontogenic changes in haemolymph biochemical composition in the silkworm, *Bombyx mori* L under thermal stress. *Academic Journal of Entomology*, 2(1), 16-21.
- Milonas, P.G., 2005. Influence of initial egg density and host size on the development of the gregarious parasitoid *Bracon hebetor* on three different host species. *Biological Control*, 50, 415-428.

- Mochacka, J., Petryszyn, C., 1959. Trehalase in *Celerio euphorbiae*. *Acta Biochimica Polonica*, 6, 307-311.
- Moreau, S. J. M., Guillot, S., 2005. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 1209-1223.
- Morgan, E.D., 2004. *Biosynthesis in insects*. The Royal Society of Chemistry, 200s, Cambridge, UK.
- Mullins, D.E., 1985. Chemistry and Physiology of the Hemolymph. *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Volume 3. Integument, Respiration and Circulation. (Editörler: G.A. Kerkut, L.I. Gilbert), s: 356-392, Pergamon Pres.
- Nakamatsu, Y., Gyotoku, Y., Tanaka, T., 2001. The endoparasitoid *Cotesia kariyai* (Ck) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia separata* larvae by venom and Ck polydnavirus. *Journal of Insect Physiology*, 47, 573-584.
- Nakamatsu, Y., Tanaka, T., 2003. Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus sp.* near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. *Journal of Insect Physiology*, 49, 149-159.
- Nakamatsu, Y., Tanaka, T., 2004. Correlation between concentration of hemolymph nutrients and amount of fat body consumed in lightly and heavily parasitized hosts (*Pseudaletia separata*). *Journal of Insect Physiology*, 50, 135-141.
- Nation, J.L., 2002. Nutrition. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press, s: 65-87, Boca Raton, London, New York Washington, D.C.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. (Çeviri Editörü: N. Kılıç), Palme Yayıncılık, 1264 s, Ankara.
- Nicolson, S.W., 1998. The importance of osmosis in nectar secretion and its consumption by insects. *American Zoologist*, 38 (3), 418-425.
- Nurulloğlu, Z.Ü., Uçkan, F., Sak, O., Ergin, E., 2004. Total lipid and fatty acid composition of *Apanteles galleria* and its parasitized host. *Physiology, Biochemistry and Toxicology*, 97 (5), 1000-1006.
- O'Brien, D.M., Fogel, M.L., Boggs, C.L., 2002. Renewable and nonrenewable resources: Amino acid turnover and allocation to reproduction in lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (7), 4413-4418.
- Osanai, M., Okudaira, M., Natio, J., Demura, M., Asakura, T., 2000. Biosynthesis of L-alanine, a major amino acid of fibroin in *Samia cynthia ricini*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 225-232.
- Öhman, L., Ljunggren, J., Häggström, L., 1995. Induction of a metabolic switch in insect cells by substrate-limited fed batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 1006-1013.
- 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.
- Pennacchio, F., Vinson, S.B., Tremblay, E., Tanaka, T., 1994. Biochemical and developmental alterations of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera, Noctuidae) larvae induced by the endophagous parasitoid *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera, Braconidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 26, 211-233.

- Pennacchio, F., Tranfaglia, A., Malva, C., 2003. Host-parasitoid antagonism in insects: New opportunities for pest control? *AGRO Food Industry Hi.-Tech*, 14 (4), 53-56.
- Pennacchio, F., Strand, M.R., 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 51, 233-258.
- Pennington, J.E., Goldstrohm, D.A., Wells, M.A., 2003. The role of hemolymph proline as a nitrogen sink during blood meal digestion by the Mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 49, 115-121.
- Phalaraksh, C., Reynolds, S.E., Wilson, I.D., Lenz, E.M., Nicholson, J.K., Lindon, J.C., 2008. A metabonomic analysis of insect development: ¹H-NMR spectroscopic characterization of changes in the composition of the haemolymph of larvae and pupae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *ScienceAsia*, 34, 279-286.
- Piyankarage, S.C., Augustin, H., Grosjean, Y., Featherstone, D.E., Shippy, S.A., 2008. Hemolymph amino acid analysis of individual *Drosophila* larvae. *Analytical Chemistry*, 80, 1201-1207.
- Quicke, D.L.J., 1997. *Parasitic wasps*. Chapman & Hall, 470 s, London.
- Quicke, D.L.J., Shaw, M.R., 2004. Cocoon silk chemistry in parasitic wasps (Hymenoptera, Ichneumonoidea) and their hosts. *Biological Journal of the Linnean Society*, 81, 161-170.
- Quistad, G.B., Nguyen, Q., Bernasconi, P., Leisy, D.J., 1994. Purification and characterization of insecticidal toxins from venom glands of the parasitic wasp, *Bracon hebetor*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24 (10), 955-961.
- Rahbé, Y., Digilio, M.C., Febvay, G., Guillaud, J., Fanti, P., Pennacchio, F., 2002. Metabolic and symbiotic interactions in amino acid pools of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, parasitized by the braconid *Aphidius ervi*. *Journal of Insect Physiology*, 48, 507-516.
- Rath, S.S., Sinha, B.R.R.P., 2005. Parasitization of fifth instar tasar silkworm, *Antheraea mylitta*, by the uzi fly, *Blepharipa zebina*; a host-parasitoid interaction and its effect on host's nutritional parameters and parasitoid development. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88, 70-78.
- Reddy, S.R.R., Campbell, J.W., 1969. Arginine Metabolism in Insects, role of arginase in proline formation during silkworm development. *Biochemical Journal*, 11, 495-503.
- Renault, S., Stasiak, K., Federici, B., Bigot, Y., 2005. Commensal and mutualistic relationships of reoviruses with their parasitoid wasp hosts. *Journal of Insect Physiology*, 51 (2), 137-148.
- Renault, D., Bouchereau, A., Delettre, Y.R., Hervant, F., Vernon, P., 2006. Changes in free amino acids in *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) during thermal and food stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 143, 279-285.
- Richards, E.H., Edwards, J.P., 2001. Proteins synthesized and secreted by larvae of the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 46, 140-151.
- Richards, E.H., Manderyck, B., Edwards, J.P., 2005. Partial amino acid sequence and physiological effects of a 27 kDa parasitism-specific protein present in the plasma of parasitized *Lacanobia oleracea* (Noctuidae). *Physiological Entomology*, 30, 362-371.
- Rose, W.C., 1938. The nutritive significance of the amino acids. *Physiological Reviews*, 18, 109-136.

- Ruuhola, T., Yang, S., Rantala, M.J., 2010. Increase in the substrate availability decreases phenoloxidase activity in the autumnal moth, *Epirrita autumnata*. *Chemoecology*, 20, 11-18.
- Sabree, Z.L., Kambhampati, S., Moran, N.A., 2009. Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (46), 19521-19526.
- Salvador, G., C nsoli, F.L., 2008. Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*, 45, 103-110.
- Sarikaya, A., G lel, A., 2004. İki farklı konukçu ve iki farklı sıcaklığın parazitoit *Dibrachys boarmiae* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae)'nin ergin öncesi gelişme süresi, verim, e ey oranı ve ergin yaşam süresine etkileri. *Türk Entomoloji Dergisi*, 28 (2), 133-140.
- Schmidt, O., Theopold, U., Strand, M., 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *BioEssays* 23 (4), 344-351.
- Schmidt, O., Glatz, R. V., Asgari, S., Robert, H.L.S., 2005. Are insect immune suppressors driving cellular uptake reactions? *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 60, 153-158.
- Schopf, A., Nussbaumer, C., 1996. Influence of parasitism by *Glyptapanteles liparidis* (Hym., Braconidae) on the haemolymph carbohydrate and glycogen content of its host larva, *Lymantria dispar* (Lep., Lymantriidae). *Journal of Applied Entomology*, 120, 357-362.
- Sharma, S.P., Sharma, G., 1980. Age-related glycogen changes in Bruchids. *Mechanisms of Ageing and Development*, 13(4), 397-400.
- Shelby, K.S., Webb, B.A., 1997. Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27 (3), 263-270.
- Shelby, K.S., Adeyeye, O.A., Okot-Kotber, B.M., Weeb, B.A., 2000. Parasitism-linked block of host plasma melanization. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75, 218-225.
- Shim, J-K., Ha, D-M, Nho, S-K., Song, K-S., Lee, K-Y., 2008. Upregulation of heat shock protein genes by envenomation of ectoparasitoid *Bracon hebetor* in larval host of Indian meal moth *Plodia interpunctella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 306-309.
- Shyamala, M.B., 1964. Detoxication of benzoate by glycine conjugation in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Journal of Insect Physiology*, 10 (2), 385-391.
- Simmons, J.R., 1960. Studies on amino acid incorporation in the larvae of *Drosophila melanogaster*. Doctor of Philosophy Thesis, California Institute of Technology Pasadena, California, 60 s.
- Song, K-H, Jung, M-K., Eum, J-H., Hwang, I-C., Han, S.S., 2008. Proteomic analysis of parasitized *Plutella xylostella* larvae plasma. *Journal of Insect Physiology*, 54, 1271-1280.
- Strand, M.R., Casas, J., 2007. Parasitoid and host nutritional physiology in behavioral ecology. In *Behavioral Ecology of Insect Parasitoids*. (Edit rler: E. Wajnberg, C. Bernstein & J. van Alphen). s: 113-128, Blackwell, London.

- Takasu, K., Ode, P.J., Antolin, M.F., Strand, M.R., 1997. Environmental and genetic determinants of ovicide in the parasitic wasp *Bracon hebetor*. *Behavioral Ecology*, 8(6), 647-654.
- Taški, K.J., Stanić, B.Đ., Grubor-Lajšić, G.N., 2004. The preference of an arylphorin-type storage protein at different life stages of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences*, 106, 5-13.
- Thomas, M.B., Blanford, S., 2003. Thermal biology in insect-parasite interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(7), 344-350.
- Thompson, S.N., 1976. The amino acid requirements for larval development of the hymenopterous parasitoid *Exerister roborator* Fabricius (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 53, 211-213.
- Thompson, S.N., Lee, R.W.-K., Beckage, N.E., 1990. Metabolism of parasitized *Manduca sexta* examined by nuclear magnetic resonance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 13, 127-143.
- Thompson, S.N., Lee, R.W.K., 1993. Metabolic fate of alanine in an insect *Manduca sexta*: Effects of starvation and parasitism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1157, 259-269.
- Thompson, S.N., 2003. Trehalose-The insect 'blood' sugar. *Advances in Insect Physiology*, Volume 31. (Editör: S. Simpson), s: 205-285, Academic Press, U.K.
- Tian, C., Wang, L., Ye, G., Zhu, S., 2010. Inhibition of melanization by a *Nasonia* defensin-like peptide: Implications for host immune suppression. *Journal of Insect Physiology*, 56, 1857-1862.
- Tillinghast, E.K., Townley, M.A., 2008. Free amino acids in spider hemolymph. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 151, 286-295.
- Tungjitwitayakul, J., Singtripop, T., Nettagul, A., Oda, Y., Tatun, N., Sekimoto, T., Sakurai, S., 2008. Identification, characterization, and developmental regulation of two storage proteins in the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis*. *Journal of Insect Physiology*, 54, 62-76.
- Uçkan, F., Ergin, E., Rivers, D.B., Gençer, N., 2006. Age and diet influence the composition of venom from the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 63, 177-187.
- Uçkan, F., 2009. Endoparazitoit *Pimpla turionellae* Zehirinin ve Parazitlemenin Konak Hemolenf Proteinleri, Serbest Aminoasitleri ve Hemositlerine Etkileri. Tübitak 106T255 nolu araştırma Projesi.
- 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). *Journal of Applied Entomology*, 134 (9-10), 718-726.
- Ueno, T., 1999. Reproduction and host-feeding in the solitary parasitoid wasp *Pimpla nipponica* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Invertebrate Reproduction and Development*, 35 (3), 231-237.
- Ueno, T., Ueno, K., 2007. The Effects of host-feeding on synovigenic egg development in an endoparasitic wasp, *Itopectis naranyae*. *Journal of Insect Science*, 7(46), 1-13.
- Vinson, S.B., Iwantsch, G.F., 1980. Host regulation by insect parasitoids. *The Quarterly Review of Biology*, 55(2), 143-165.
- Vinson, S.B., 1990. Physiological interactions between the host genus *Heliothis* and its guild of parasitoids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 13, 63-81.

- Vinson, S.B., Mourad, A.K., Sebesta, D.K., 1994. Sources of possible host regulatory factors in *Cardiochiles nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 26, 197-209.
- Vinson, S.B., 1998. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. *Biological Control*, 11, 79-96.
- Waller, J.B., 1965. The effect of the venom of *Bracon hebetor* on the respiration of the wax moth *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 11, 1595-1599.
- Wyatt, G.R., 1961. The biochemistry of insect hemolymph. *Annual Review of Entomology*, 6, 75-102.
- Wu, H., Meng, L., Li, B., 2008. Effects of feeding frequency and sugar concentrations on lifetime reproductive success of *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*, 45, 353-359.
- Wyckhuys, K.A.G., Strange-George, J.E., Kulhanek, C.A., Wäckers, F.L., Heimpel, G.E., 2008. Sugar feeding by the aphid parasitoid *Binodoxys communis*: How does honeydew compare with other sugar sources. *Journal of Insect Physiology*, 54, 481-491.
- Xu, J., Bao, B., Zhang, Z-F., Yi Y.-Z., Xu, W-H., 2009. Identification of a novel gene encoding the trehalose phosphate synthase in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Glycobiology*, 19(3), 250-257.
- Yi, S-X., Adams, T.S., 2000. Effect of pyriproxyfen and photoperiod on free amino acid concentrations and proteins in the hemolymph of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Journal of Insect Physiology*, 46, 1341-1353.
- Zhang, D., Dahlman, D.L., Järlfors, U.E., 1997. Effects of *Microplitis croceipes* teratocytes on host haemolymph protein content and fat body proliferation. *Journal of Insect Physiology*, 43, 577-585.
- Zhang, G., Schmidt, O., Asgari, S., 2004. A novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (40), 41580-41585.
- Zhao, Z., Zera, A.J., 2006. Biochemical basis of specialization for dispersal vs. reproduction in a wing-polymorphic cricket: Morph-specific metabolism of amino acids. *Journal of Insect Physiology*, 52, 646-658.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Özgür VARER İŞİTAN

Doğum Yeri: Rize

Doğum Tarihi: 10.07.1979

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise: Namık Kemal Lisesi, 1993-1996

Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 1997-2001

Yüksek Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2001-2005

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2005-2010.

Samsun Büyükşehir Belediyesi Su ve Kanalizasyon İdaresi Genel Müdürlüğü Su Arıtma Dairesi İçme Suyu Arıtma Tesisi, 2010-.

İletişim Bilgileri: ovarer@omu.edu.tr