

**KSANTOTOKSİNİN *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA:  
PYRALIDAE)'NİN BAZI BİYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNE  
ETKİSİ**

**Meltem ERDEM**

**Zonguldak Karaelmas Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalında  
Yüksek Lisans Tezi  
Olarak Hazırlanmıştır**

**ZONGULDAK  
Temmuz 2011**

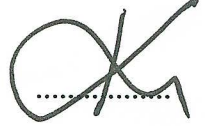
**KABUL:**

Meltem ERDEM tarafından hazırlanan "KSANTOTOKSİNİN *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)'NİN BAZI BİYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNE ETKİSİ" başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 01/07/2011.

Başkan: Yrd. Doç. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL (ZKÜ)  
(Danışman)



Üye : Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL (ZKÜ)



Üye : Prof. Dr. Nursel GÜL (AÜ)



---

**ONAY:**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. 14.7/2011



Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”*



Meltem ERDEM

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

# KSANTOTOKSİNİN *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)'NİN BAZI BİYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNE ETKİSİ

Meltem ERDEM

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL

Temmuz 2011, 71 sayfa

Büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)'nin yaşama oranı, gelişme süresi, eşey oranı, ergin dişi ve erkek ömür uzunluğu, yumurta verimi, açılma oranı ile erginlerinde oksidatif stresin önemli indikatörleri lipid peroksidasyonu ürünü malondialdehit (MDA) ve protein oksidasyonu ürünü protein karbonil miktarları ile detoksifikasyon enzimi glutatyon-S- transferaz (GST) aktivitesi üzerine bir bitki allelokimyasalı ksantotoksinin etkisi incelendi. Böceğin birinci evre larvaları % 0,001, 0,005 ve 0,1 oranında ksantotoksin içeren yapay besinler ile laboratuvar şartlarında ergin evreye kadar beslendi. Ksantotoksinin denenen tüm konsantrasyonları böceğin 7. evreye ulaşan larva oranı, pup ve ergin oranı ile erkek ve dişi oranını önemli derecede düşürmüştür.

## ÖZET (devam ediyor)

Kontrol besininde % 77,7 ± 1,96 oranında ergin elde edilmesine rağmen % 0,1 oranında ksantotoksin içeren besin ergin olma oranını % 11,0 ± 00,0'e düşürmüştür. Ksantotoksinin bu konsantrasyonu erkek ve dişi oranını % 5,5 ± 0,00'e düşürmüştür. Ksantotoksin ile yapılan deneylerde erkek bireylerin ömür uzunluğu üzerinde önemli etkisi olmazken en yüksek ksantotoksin konsantrasyonu (% 0,1) dişilerin ömür uzunluğunu 10,4 ± 0,43 günden 5,7 ± 0,64 güne önemli derecede kısaltmıştır. En yüksek ksantotoksin konsantrasyonu (% 0,1) yumurta sayısını 95,0 ± 12,87'den 33,5 ± 3,38'e, açılma oranını ise % 82,7 ± 3,70'den % 35,6 ± 3,00'ya önemli derecede düşürmüştür. Ksantotoksinin en düşük konsantrasyonu (% 0,001) erginlerin MDA miktarını 0,005 ± 0,0005'den 0,028 ± 0,001 nmol/mg protein'e (yaklaşık 6 katı) yükseltirken protein karbonil miktarı ve GST aktivitesi üzerine önemli bir etkisi olmamıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ksantotoksinin yüksek konsantrasyonları (% 0,005 ve 0,1) MDA miktarını ortalama üç kat, protein karbonil miktarını iki kat artırırken GST aktivitesini önemli derecede düşürmüştür. Ksantotoksinin en yüksek konsantrasyonunu içeren besin GST aktivitesini 0,276 ± 0,025'den 0,159 ± 0,005 µmol/mg protein/dk'ya azaltmıştır.

Oksidatif stres indikatörlerinin düzeyindeki artış ksantotoksin ilave edilen besinler ile yetiştirilen erginlerde yüksek derecede oksidatif stres meydana geldiğini göstermiştir. Erginlerdeki oksidatif strese bağlı olarak detoksifikasyon kapasitesinde GST aktivitesi düzeyinde önemli bir azalma görülmüştür. Bu sonuçlar ksantotoksin ile uyarılan oksidatif stresin bal mumu güvesinin erginlerinin özelliklerini olumsuz yönde etkileyecek şekilde detoksifikasyon enzimi üzerine önleyici etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Galleria mellonella*, oksidatif stres, ksantotoksin, GST, yaşama, yumurta verimi, protein karbonil

**Bilim Kodu:** 401.02.01.

## **ABSTRACT**

**M.Sc. Thesis**

**THE EFFECTS OF XANTHOTOXIN ON SOME BIOLOGICAL AND  
BIOCHEMICAL PARAMETERS OF *GALLERIA MELLONELLA* L.  
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

**Meltem ERDEM**

**Zonguldak Karaelmas University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology**

**Thesis Advisor: Assist. Prof. Ender BÜYÜKGÜZEL**

**July 2011, 71 pages**

The effects of a plant allelochemical, xanthotoxin (XA), on survivorship, development, sex ratio, male and female adult longevity, fecundity, hatchability of greater wax moth *Galleria mellonella* (L.) were investigated. Important oxidative stress indicators, lipid peroxidation product, malondialdehyde (MDA) and protein oxidation products, protein karbonyl (PCO) contents and a detoxification enzyme glutathione-S-transferase (GST) activity were also determined in the adults of the wax moth. The insect was reared from first-instar larvae on an artificial diets containing XA at 0.001, 0.005 or 0.1% to adult stage in the laboratory condition. Relative to the control, the diets containing XA concentrations significantly resulted in decreased survivorship in seventh-instar, pupal and adult stages, and female and male ratio. Control diet produced adult yield by  $77.7 \pm 1.96\%$ , while the diet with 0.1% XA significantly decreased adult yields to  $11.0 \pm 0.00\%$ . This dietary concentration reduced both male and female ratio to  $5.5 \pm 0.00\%$ . Dietary XA concentrations had no significant effect on adult longevity of male whereas the highest XA concentration (0.1%) significantly shortened female longevity from  $10.4 \pm 0.43$  to  $5.7 \pm 0.64$  days.

## ABSTRACT (continued)

This highest XA concentration significantly decreased egg number from  $95.0 \pm 12.87$  to  $33.5 \pm 3.38$ , hatchability from  $82.7 \pm 3.70$  to  $35.6 \pm 3.00$ . The lowest concentration of XA (0.001%) significantly increased MDA content from  $0.005 \pm 0.0005$  to  $0.028 \pm 0.001$  nmol/mg protein by approximately 6-fold while it had no significant effect on protein carbonyl content and GST activity. XA at high concentrations (0.005 and 0.1%) significantly increased MDA (3-fold) and protein carbonyl (2-fold) contents while they significantly resulted in decreased GST activity. The highest dietary XA concentration significantly decreased GST activity from  $0.276 \pm 0.025$  to  $0.159 \pm 0.005$   $\mu\text{mol/mg protein/min}$ .

Two of the markers indicated that significantly higher levels of oxidative stress were produced in the whole body of adult reared on diets supplemented with XA. This oxidative stress was associated with elicited detoxification responses by markedly decreasing GST activities in adults. We infer from these findings that XA-induced oxidative stress exerted strong inhibitory effect on the activity of the wax moth detoxification enzyme leading to decreased adult fitness.

**Keywords:** *Galleria mellonella*, oxidative stress, xanthotoxin, GST, survivorship, fecundity, protein carbonyl

**Science Code:** 401.02.01.

## TEŞEKKÜR

Bu konuda bana çalıőma firsatı veren, araőtırma sırasında ilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen danıőman hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL'e çalıőmamın her aőamasında değerli öneri ve bilgilerinden yararlandığım Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL'e ve ek Cumhuriyeti Masaryk Üniversitesi Hayvan Fizyolojisi ve İmmünolojisi Bölümünden Dr. Pavel Hyršl'a teőekkürlerimi bir borç bilirim. Çalıőmamın deneysel ve yazma aőamasında moral desteği ve yardımlarını esirgemeyen aileme ve yüksek lisans arkadaşlarıma teőekkürlerimi sunarım. Bu alıőma Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri Koordinatörlüęü tarafından desteklenmiőtir (PROJE NO: 2011-10-06-08).



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xv
BÖLÜM 1 GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2 GENEL BİLGİLER.....	15
BÖLÜM 3 MATERYAL VE METOT .....	21
3.1 <i>GALLERIA MELLONELLA</i> L. KÜLTÜRÜNÜN DEVAMI.....	21
3.2 KSANTOTOKSİNİN DENEYLERDE KULLANILMASI .....	22
3.3 LARVALARIN ELDE EDİLMESİ.....	22
3.4 YAŞAMA, GELİŞME, EŞEY ORANI VE ERGİN ÖMÜR UZUNLUĞU İLE İLGİLİ BESLENME DENEYLERİ.....	23
3.5 DİŞİLERİN YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANI İLE İLGİLİ DENEYLER ...	24
3.6 MDA, PROTEİN KARBONİL MİKTARI VE GST AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ .....	25
3.6.1 Malondialdehid (MDA) .....	26
3.6.2 Protein Karbonil.....	26
3.6.3 Glutasyon S-transferaz (GST) .....	27
3.7 VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	28

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 4 ARAŞTIRMA BULGULARI .....	29
4.1 KSANTOTOKSİNİN <i>G. MELLONELLA</i> LARVALARININ YAŞAMA, GELİŞME VE EŞEY ORANINA ETKİSİ.....	29
4.2 KSANTOTOKSİNİN <i>G. MELLONELLA</i> 'NİN ÖMÜR UZUNLUĞU, YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANINA ETKİSİ.....	31
4.3 KSANTOTOKSİNİN <i>G. MELLONELLA</i> ERGİNLERİNDE MDA, PROTEİN KARBONİL MİKTARI VE GST AKTİVİTESİNE ETKİSİ.....	33
BÖLÜM 5 TARTIŞMA .....	37
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	71

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Oksidatif stres ve hücre hasarı.....	5
1.2 Lipid peroksidasyonu ürünü MDA'nın oluşumu. ....	6
4.1 Ksantotoksinin <i>G. mellonella</i> erginlerinde MDA miktarına etkisi. ....	34
4.2 Ksantotoksinin <i>G. mellonella</i> erginlerinde protein karbonil miktarına etkisi. ....	34
4.3 Ksantotoksinin <i>G. mellonella</i> erginlerinde GST aktivitesine etkisi. ....	35



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 Ksantotoksinin <i>G. mellonella</i> larvalarının yaşama, gelişme ve eşey oranına etkisi.....	30
4.2 Ksantotoksinin <i>G. mellonella</i> larvalarının ergin ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranına etkisi .....	32



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$^{\circ}\text{C}$	:	santigrad derece
cm	:	santimetre
dk	:	dakika
g	:	gram
kg	:	kilogram
lt	:	litre
M	:	molar
ml	:	mililitre
mm	:	milimetre
mM	:	milimolar
nm	:	nanometre
nmol/mg protein	:	nanomol/miligram protein
sn	:	saniye
$\mu\text{l}$	:	mikrolitre
$\mu\text{mol/mg protein/dk}$	:	mikromol/miligram protein/dakika

## KISALTMALAR

$^1\text{O}_2$	:	singlet (tekli) oksijen
4-HNE	:	4-hidroksi-2 nonenal
ANOVA	:	Analysis of variance
APOX	:	askorbat peroksidaz
BHT	:	butillenmiş hidroksi toluen
BSA	:	Sığır serum albumin
CAT	:	katalaz
$\text{CCl}_4$	:	karbon tetraklorür
CDNB	:	1-chloro-2,4-dinitrobenzen
CuZn-SOD	:	Bakır çinko süperoksit dismutaz

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

DNPH	:	2,4- dinitrofenilhidrazin
DTT	:	ditiyotreititol
EDTA	:	etilendiamintetraasetik asit
GPx	:	glutasyon peroksidaz
GR	:	glutasyon redüktaz
GSH	:	indirgenmiş glutasyon
GSSG	:	oksiteleşmiş glutasyon
GST	:	glutasyon-S-transferaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	hidrojen peroksit
HO·	:	hidroksil radikali
JH	:	jüvenil hormon
L·	:	lipid radikali
LOO·	:	lipid peroksil radikali
LOOH	:	lipid hidroperoksid
LSD	:	Least Significant Difference
MDA	:	malondialdehid
Mn-SOD	:	mangan-süperoksit dismutaz
NO·	:	nitrik oksit
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	:	süperoksit radikali
OP	:	organofosfor
PCO	:	protein karbonil
PMSF	:	fenilmetilsülfonil florür
PPO	:	polifenol oksidaz
Px	:	peroksidaz
ROO·	:	peroksit radikali
ROT	:	reaktif oksijen türevleri
Se-GPx	:	selenyum bağımlı glutasyon peroksidaz
-SH	:	sülfidril
SOD	:	süperoksit dismutaz
SPSS	:	Statistical Package for the Social Sciences
TBA	:	tiyobarbitürik asit
TCA	:	triklorasetik asit

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

TPx	:	tiyoredoksin peroksidaz
TrxR	:	tiyoredoksin redüktaz
UV	:	Ultraviole
YÖİ	:	Yumurta bırakmayı önleyici indeks
$\chi^2$	:	ki kare (Chi square )



## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Tarımsal zarara sebep olan en önemli canlı grubu böceklerdir. Lepidoptera takımına ait türler bu grup içerisinde önemli bir yer tutmaktadır. Böcekler tarımsal ürünlerin çeşitlilik, kalite, verim, depolama, pazarlama kalitesini düşürürken aynı zamanda çeşitli hastalıkların taşınmasında aracı olduklarından halk sağlığı açısından da tehdit oluşturmaktadır. Ürün verimini ve kalitesini artırmak için böcekler ile mücadelede bir dizi kimyasal, biyolojik, fiziksel ve diğer bazı yöntemler kullanılmaktadır (Charriere and Imdorf 1997). Ucuz olması, kısa sürede sonuç alınması ve kolay uygulanabilirliği sebebiyle çeşitli insektisitlerin kullanıldığı kimyasal mücadele daha çok tercih edilmektedir. Son zamanlarda özellikle organoklorlu ve doğrudan sinir sistemine etkili olan organofosforlu insektisitler çevreye amaçsız, sınırsız ve kontrolsüz olarak uygulanan toksik kimyasallar olup diğer canlılar açısından tehdit unsuru oluşturmaktadır (Fenske et al. 2002). Zararlı böceklerle mücadelede sentetik analoglar, örneğin juvenil hormon analogu, priproksifen (Sumilaru 0,5 G), sentetik pretroidler, D-fenotrin (Neosumi NS), sipermetrin (*Cypermethrin*, Cyper) ve karbamat grubu kimyasallar gibi çevreye zararlı etkisi olan insektisitler hala kullanımdadır (He et al. 2002). Bu insektisitlere karşı böceklerin direnç geliştirdiği bilinmektedir (Barata et al. 2001, Anderson and Zhu 2004). İnsektisit kullanımının vazgeçilmez yararlarına karşın denetimsiz ve aşırı miktarlarda uygulanması insan dahil hedef olmayan diğer canlılarda önemli zararlı etkilere ve ölümlere neden olmakta, ekosistemlerin bozulmasına, besin zincirlerinde aksamalara ve kirlenmelere yol açmaktadır. İnsektisitler biyolojik birikimle canlıların vücutlarında yoğunlaşabilir. Besin zincirinde hareket ederken her aşamada daha büyük bir orana ulaşmaktadır. Etkili kimyasal insektisitlerin yaygın olarak kullanılmasından kısa süre sonra insanlar ve yabanıl yaşamda hedef olmayan canlılara zararlı etkileri ortaya konmaya başlanmıştır (Bhavan-Saravana and Geraldine 2001). İnsektisitlerin çevreye verdiği zararların insan sağlığı açısından tehlikeli boyutlara varması üzerine pek çok ülke ve kuruluş soruna titizlikle eğilirken, ülkemizde de son zamanlarda konuya önem verilmeye başlanmıştır. İnsektisitler toksik ve öldürücü etkiye sahiptir, bu sebeple uygulamalarda doğal yaşam da göz

ardı edilmemelidir. Zararlı böcekler ile mücadele yapılırken seçilen insektisit hedef olmayan canlılara zararlı etkilerinin düşük olmasına dikkat edilmelidir.

Bilinçsizce kullanılan kimyasal insektisitler ekolojik dengenin bozulmasına sebep olmakla kalmayıp, hedef olmayan diğer canlılar için de ciddi tehditler oluşturmaktadır. Pestisitlerin sebze ve meyve üzerinde kalan artıkları, yeraltı ve yerüstü sularına karışması ya da besin zinciri yolu ile insanlara kadar ulaşması akut ve kronik zehirlenmelere sebep olmaktadır. Organofosfatlı bir insektisit olan diazinonun ratların karaciğerinde histopatolojik değişikliklerin yanında biyokimyasal ve hematolojik birçok parametrenin negatif yönde değişmesine neden olduğu aynı zamanda kalp dokusunda da çeşitli patolojik değişikliklere sebep olduğu gözlenmiştir (Kalender et al. 2005 b, 2006, Ogutcu et al. 2006). Organofosfatlı bir insektisit olan metil parathionun da subakut ve subkronik uygulamadan sonra erkek ratların testislerinde sperm sayısında ve sperm motilitesinde bir azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir. Pestisitlerin çoğunun kan-testis bariyerini rahatlıkla geçebildiği ifade edilmektedir (Uzunhisarcikli et al. 2007). Dere vd. (1995) ise organofosforlu bir insektisit olan malathionun farelerin karaciğerindeki heksokinaz, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz, laktat dehidrojenaz ve malat dehidrojenaz enzim aktivitelerinin bozulmasına neden olduğunu ifade etmişlerdir. Organofosforlu insektisitler özellikle sinir sisteminin çalışmasında rol oynayan kolinesteraz enziminin aktivitesini inhibe ederek geri dönüşü olmayan akut ya da kronik zehirlenmeler meydana getirmektedir (Zeren vd. 1998). Aynı zamanda böceklerin birçoğunun da uzun süre kullanılan kimyasal insektisitlere karşı direnç oluşturduğu bilinmektedir (Apperson and Georghiou 1975, Priester and Georghiou 1978). Bununla beraber kimyasal mücadele diğer mücadele metotlarına göre daha hızlı ve daha etkili olması nedeniyle tercih edilmektedir.

Kimyasal insektisitler böceklerin çeşitli dokularında fizyolojik işlev bozukluğu yanında patolojik değişikliklere neden olmaktadır (Kalender et al. 2005 a). Kimyasal insektisitler verilen doza ve zamana bağlı olarak hücre seviyesinde bazı olumsuz etkiler meydana getirebilirler. Bunun sonucunda hücredeki protein sentezi bozulabilir, hücre solunumu engellenebilir, hücre zarının işlevi bozulabilir ya da çekirdekdeki DNA etkilenebilir ve DNA'da kırılmalar ya da mutasyonlar oluşabilir. Hücrede meydana gelen bu olaylar sonucunda hücrelerde şişme, endoplazmik retikulumlarda genişleme, mitokondrielerde şişme ve vakuolizasyon, çekirdeğin yapısında da bozulmalar gözlenebilir.

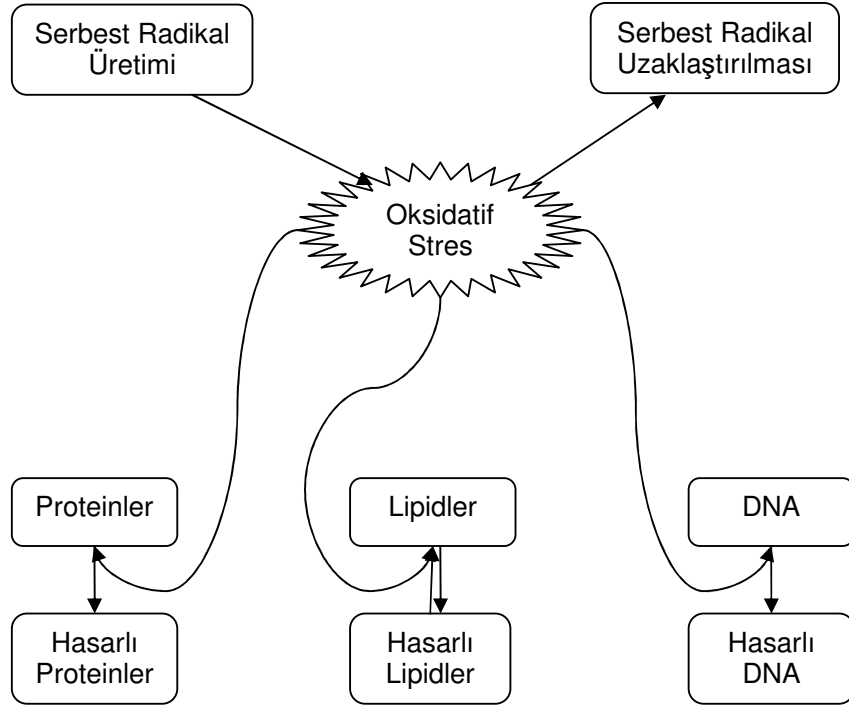
Hedef olmayan canlılar için toksik olan bu kimyasal maddelere alternatif olarak çevre dostu kimyasal maddelerin kullanıldığı mücadele yöntemleri geliştirebilmek için birçok zararlı türün laboratuvar şartlarında yapay besin ortamları ile kitle halinde üretimleri yapılmaktadır (Al-Izzi et al. 1987, Keena et al. 1995, Lopez et al. 1996, Bernardi et al. 2000). Lepidoptera takımına ait zararlı türlerin yapay besinler ile kültüre alınması ekoloji ve fizyolojilerinin yanında bunların farklı evrelerindeki bazı metabolik olaylarının moleküler düzeyde incelenmesine de olanak sağlar (Mandato et al. 1997, Pohlen and Baldwin 2001, Büyükgüzel et al. 2002, Tunaz et al. 2003). Böylece geliştirilen yeni insektisitlerin arazi uygulamasından önce laboratuvar şartlarında böcek üzerindeki etkileri araştırılmış olur. *Galleria mellonella* (L.) bu konudaki çalışmalar için oldukça iyi bir fizyolojik model oluşturmakla beraber laboratuvar şartlarında kolayca kültürü yapılabilir. Pyralidae familyasına ait diğer türler ile birlikte *G. mellonella* larvaları ve pupaları parazitoid böceklerin laboratuvar şartlarında çoğaltılabilmesi için yalancı konak olarak kullanılmaktadır (Wiedenmann et al. 1992, Gupta et al. 1996 a,b, Bernardi et al. 2000, Büyükgüzel 2001). Günümüzde bazı parazitoid türlerin tarımsal alanlarda önemli zararlara sebep olan lepidoptera takımına ait türlerin biyolojik mücadelesinde halen kullanılması (Chen and Welter 2002) bu güvelerin laboratuvar şartlarında yapay ortamda yetiştirilmesi çalışmalarının önemini arttırmaktadır. Bu yüzden yüksek ergin verimine ve kısa hayat devrine sahip olması, doğal besin olarak koyu renkli kuluçka bal peteği ve çeşitli yapay besinler üzerinde iyi gelişmesi sebebiyle, mum güvesi *G. mellonella* konak-parazitoid etkileşimi, bitki-böcek tritrofik etkileşimi, biyolojik ve kimyasal mücadele çalışmaları için önemli bir deneysel model oluşturmaktadır (Jarosz 1989). Bu böceğin larvaları arı kovanındaki peteklere ve diğer ürünlere zarar verdiği için arıcılık sektöründe veya kendi imkanları ile arıcılık yapan çiftçiler için önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Charriere and Imdorf 1997). Büyük balmumu güvesine karşı kabartılmış peteklerin korunmasında çeşitli ülkelerde kimyasal [(aluminum phosphide, methyl bromide, etilen dibromid, paradiklorobenzen (Naftalin), kükürt, karbondioksit], fiziksel (soğuk-sıcak) uygulamaları ve biyolojik insektisitler (*Bacillus thuringiensis*) gibi mücadele yöntemleri farklı şekillerde kullanılmaktadır (Tutkun vd. 1987, Ritter et al. 1992, Ahmad 1994, Yacobson et al. 1997, Delaware 2000, Kumova ve Korkmaz 2002, Akyol vd. 2009). Arı kolonilerinin 1 kg balmumu üretimi için ortalama 8-10 kg bala eşdeğer nektar tüketmeleri gerekmektedir (Whitcomb 1946). Dolayısıyla koloninin gereksinimi olan peteklerin yapımı sırasında, arılar bal üretimi için kullanılacak nektarı balmumu üretiminde kullanılmakta ve birim kovan başına bal üretimi azalmaktadır. Bal arılarının bitkilerden nektar toplaması sırasında bitki allelokimyasalları ile kontamine olması sonucu *G. mellonella* (L.) larvaları bu güçlü

prooksidan maddeler ile karşılaşılabilmektedir. Dolaylı besinsel etkileşimin (trofik) antioksidan savunma sistemini ele alarak incelenmesi zararlı böceklerin mücadelesinde yeni teknik ve yaklaşımlar belirlemek açısından yararlı olabileceği gibi bu yöntemlerin fizyolojik ve biyokimyasal temeli de belirlenebilecektir. Diğer taraftan besinsel etkileşim sonucu prooksidan maddelerin zararlı böceklerin yaşam parametreleri ile ilişkili olarak antioksidan veya detoksifikasyon enzim aktiviteleri üzerindeki oksidatif etkilerinin tamamen anlaşılması böceklerin çevreleri, besinleri ve konakları ile ekolojik ilişkilerinin anlaşılmasını sağlayacaktır. Böylece *G. mellonella* (L.), zararlı böceklerin zarar verdikleri konak bitkiler ile kimyasal düzeyde etkileşimlerinin laboratuvar şartlarında detaylı çalışılması için bir model oluşturmaktadır.

Canlıların insektisitlerin de dahil olduğu çeşitli kimyasal maddeler ve bazı çevresel stres faktörlerine maruz kalmaları, reaktif oksijen türevlerinin (ROT) oluşumuna ve dolayısıyla metabolik olayların bozulmasına neden olur (Felton and Summers 1995). ROT'lar, sahip oldukları paylaşılmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktif atom veya moleküllerdir. Biyolojik sistemlerdeki ROT'lar, süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $HO^{\cdot}$ ), nitrik oksit ( $NO^{\cdot}$ ), peroksit radikali ( $ROO^{\cdot}$ ) gibi serbest radikaller ile radikal olmayan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birisidir. Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, omurgalılarda bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil ve makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizmaları için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi hücre hasarı ve ölümü ile sonuçlanmaktadır. Aerobik yaşamın normal bir aşaması olan oksidatif reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkan ROT'lar DNA, RNA, proteinler, karbohidratlar ve lipidler gibi makromoleküler hücresel yapılara kovalent bağlanarak yapısal hasar meydana getirir.

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum "oksidatif denge" olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. 'Oksidatif stres' olarak adlandırılan bu durum serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (Şekil 1.1). Oksijenli solunum yapan bütün organizmalarda kullanılan oksijenin çoğu sitokrom oksidaz tarafından mitokondride tam olarak indirgenerek su molekülü

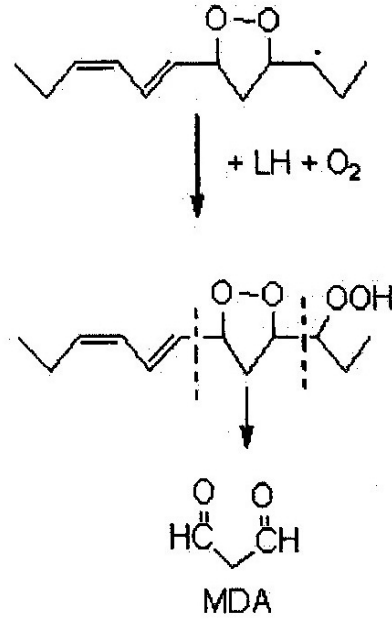
oluşturulduğu halde hücrelerde çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucu ROT'lar oluşmaktadır. Canlılar aynı zamanda doğrudan besinler ile bu reaktif oksijen radikalleri ve diğer serbest radikalleri almaktadırlar.



Şekil 1.1 Oksidatif stres ve hücre hasarı.

Lipid peroksidasyonu, zarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından lipid peroksitler, alkoller, aldehidler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur (Felton and Summers 1995). Lipid peroksidasyonu zincir tepkimelerle yürümektedir. Lipid peroksidasyonunun başlamasına singlet oksijen ( $^1O_2$ ) gibi ROT veya karbon tetraklorür ( $CCl_4$ ) gibi çeşitli kimyasallar neden olmaktadır. ROT çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileştiğinde bu molekülden bir hidrojeni kopartarak bir lipid radikalinin ( $L\cdot$ ) oluşumuna neden olur, çoklu doymamış yağ asitleri çift bağ düzenlenmesi ile bir dien konjugatına dönüşür, buna bir oksijenin eklenmesiyle de lipid peroksil radikali ( $LOO\cdot$ ) meydana gelir (Sevgiler 2007). Oldukça reaktif olan peroksil radikali komşu yağ asidinden bir hidrojen alarak lipid hidroperoksidi ( $LOOH$ ) ve yeni bir lipid radikali meydana getirir (Halliwell 1996). Böylece lipid peroksidasyonu ilerlemeye devam eder. Hücre membranlarında lipid peroksidasyonunun ilerleme tepkimeleri ile alkanlar, isoprostanlar ve karbonil bileşikler ( $MDA$ ) gibi çok çeşitli yan ürünler açığa çıkmaktadır (Ansari et al. 1989,

Djordjevic 2004). Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. İki veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin (Linoleik, linolenik ve araşidonik asitler) peroksidasyonunda tiyobarbitürik asit ile ölçülebilen malondialdehid (MDA)'in yanında 4-hidroksi-2 nonenal (4-HNE) meydana gelir (Bokov et al. 2004). MDA yağ asidi oksidasyonunun kantitatif bir indikatörüdür ve lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi uyum gösterir. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olan bir aldehid (Şekil 1.2) olup oksidatif stresin derecesi ile orantılı olarak miktarı artmaktadır (Suwalsky et al. 2001). Oluşan MDA, hücre zarlarındaki iyon alış-verişine etki ederek zardaki bileşiklerin çapraz bağlanması, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişmesi gibi olumsuz sonuçlara neden olur.



Şekil 1.2 Lipid peroksidasyonu ürünü MDA'nın oluşumu.

Lipid peroksidasyonu membranın akışkanlığını değiştirerek, bir veya iki değerlikli iyonlara geçirgenliği artırır ve membrana bağlı enzimlerin ve reseptörlerin inaktivasyonuna neden olur. Peroksidasyon tüm membran lipidlerinin yıkımına yol açabilir. Proteolitik enzimler içeren lizozomlarda membran yıkımı ile bu enzimler hücre içine salınır ve aktivasyonları ile hücre hasar artar. Bu nedenlerle membranlarda meydana gelen lipid peroksidasyonunun

kontrol edilememesi membranların yapı ve işlevlerinde önemli değişimlere ve giderek hücre ölümüne neden olmaktadır (Djordjevic 2004).

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, organoklorlu ve organofosforlu (OP) pestisidler, poliklorlu bifeniller ve bitkisel allelokimyasaların da dahil olduğu diğer ksenobiyotikler bu tip oksidatif hasar ile önemli etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle lipid peroksidasyonunun ölçülmesi böyle bileşiklerin oksidatif etkilerinin değerlendirilmesinde indikatör olarak kullanılmaktadır (Valavanidis et al. 2006). Lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde kullanılan en basit ve en yaygın yöntem arakidonik asit ve diğer çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ve araşidonik peroksitlerin parçalanma ürünü olan aldehit türevi MDA miktarının belirlenmesidir (Spiteller 2001). Böceklerde de MDA miktarının yükselmesi lipid peroksidasyonu seviyesinin önemli bir göstergesidir (Ahmad et al. 1995, Mano et al. 1995, Krishnan et al. 2009). Fitofaj böcekler için, lipidler sadece hücre membranı bileşeni değil, ayrıca juvenil hormonlar ve feromonlar gibi diğer fizyolojik fonksiyonlarda rol aldığı için, lipid peroksidasyonu özellikle zararlıdır (Downer 1985).

Lipid peroksidlerinin parçalanma ürünleri zamanla hücre hasarı ile birlikte artarlar. Bu ürünlerin klasik örneği "lipofüssin" (lipofuscin) ve "ceroid" (doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan oksitlenmiş çoklu doymamış lipid pigmentleri)'dir. Bunlara "kromolipidler" veya "yaş pigmentleri" adı verilir. Lipid peroksidasyon ürünlerinin amino asit, protein, fosfolipid ve DNA'daki primer amino grupları ile reaksiyonları sonucu meydana gelirler. Yaşla birlikte lipofüssin sentezi artar ve memelilerde özellikle sinir sistemi, kalp ve kas hücreleri gibi postmitotik (bölünmeyen) hücrelerde birikir.

Diğer taraftan oksidatif strese bağlı olarak oluşan *in vivo* DNA ve protein hasarının, lipidlerdeki hasardan daha önemli olduğu öne sürülmektedir (Reznick and Packer 1994). Proteinlerde *in vivo* olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücresel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücresel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenir (Hu 1994, Levine et al. 1994, Evans et al. 1999).

Oksidatif protein hasarı, protein karbonil (PCO) düzeylerindeki artış (Hu 1994, Levine et al. 1994, Evans et al. 1999) ve protein tiol düzeylerindeki azalma (Takenaka et al. 1991, Bourdon et al. 1999) ile karakterizedir. Reaktif oksijen türlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda

histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit kalıntısında ve/veya peptid omurgasında meydana gelen oksidatif hasar sonucunda PCO ürünleri meydana gelir (Hu 1994, Levine et al. 1994, Evans et al. 1999). PCO düzeylerinin saptanmasının oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmektedir (Hu 1994, Levine et al. 1994, Evans et al. 1999). Diğer taraftan serbest radikaller proteinlerdeki tiol gruplarının oksidasyonuna yol açarak oksidatif protein hasarına neden olur (Takenaka et al. 1991, Bourdon et al. 1999).

Protein oksidasyonu, ROT ( $\text{OH}^{\cdot}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  gibi) ile doğrudan veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu dolaylı olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (Gülbahar 2007). Serbest radikallerin oksidan etkisi sonucu meydana gelen oksidatif protein modifikasyonu ve bunun sonucu oksitlenmiş proteinlerin fazla miktarda birikmesi hücre ve doku hasarına neden olur (Stadtman 1992, Dean et al. 1997).

Proteinler serbest radikal saldırılarına doymamış yağ asitlerinden daha az duyarlıdır. Çok yoğun bir saldırı olmadıkça fazla hasar görmezler (Chesemann and Slater 1993). Protein, geçiş metal iyonunu özel bir bölgeden bağlarsa, geçiş metal iyonu  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile reaksiyona girerek  $\text{OH}^{\cdot}$  radikalini oluşturur.  $\text{OH}^{\cdot}$  radikali de hasar verici etkisini metal bağlanma bölgesinde veya ona yakın bölgelerde meydana getirir. Proteinlere olan serbest radikal ataklar, peroksitlerin ve karbonillerin oluşumu ile sonuçlanır.

Canlılarda oksijen bulunan bir ortamda çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oksijen radikalleri yapılabilir. Özellikle oksijenin metabolize edildiği canlılarda önemli derişimlerde radikal üretimi gerçekleşir. Oksijen radikalleri dış kaynaklı (ekzojen) ve iç kaynaklı (endojen) olarak oluşmaktadır. Normal metabolik olaylar sırasında ara ürün olarak oluşabilmektedir. Bu radikaller belirli seviyenin üzerine çıktığı zaman canlı için ciddi tehlikeler oluşturmaktadır. Bu radikaller hücre zarının doymamış yağ asitleri, protein bileşimi üzerine zarar vermektedir (Halliwell 1994, Heinle and Betz 1994). Serbest radikallerin zar ile etkileştiği durumda enzimler, hormonlar ve nörotransmitter maddeler olumsuz yönde etkilenmektedir. Ksenobiyotiklerin (bitkisel allelokimyasallar ve diğer ksenobiyotikler) prooksidan etkilerine özellikle serbest oksijen radikallerine karşı böcekler kendilerini antioksidan sistemler ile savunurlar (Felton and Duffey 1991, Felton and Summers 1995, Krishnan and Sehnal 2006). Böcekler detoksifikasyon kapasitelerine bağlı olarak serbest radikallerin zararlı etkisinden korunma yeteneğine sahiptir (Vasseur and Leguille 2004). Omurgalılarda olduğu gibi

böceklerde serbest oksijen radikallerinin yapmış olduğu hasarı önleyen enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri vardır. Enzimatik sistemin başlıcaları süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-transferaz (GST) enzimleridir (Ahmad et al. 1989, 1991, 2005 a, Ahmad 1992, 1995, Kono and Shishido 1992, Yu 2004, Krishnan and Kodrik 2006). Bunların yanında, *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) türünün larva evresinde antioksidan enzim askorbat peroksidazın (APOX) (Mathews et al. 1997) ve *Drosophila*'da ise tiyoredoksin peroksidazın (Missirlis et al. 2003) varlığı tespit edilmiştir. Enzimatik olmayan savunma sistemlerinin başlıca elemanları glutatyon, vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol), vitamin C (askorbik asit), melatonin, karoten ve diğer maddelerdir (Hermes-Lima et al. 1998).

SOD enzimi, süperoksiti hidrojen peroksite ve moleküler oksijene parçalar. CuZn-SOD enzimi hücre sitoplazmasında, lizozomlarda, mitokondrilerin iç ve dış zarı arasında ve çekirdekte bulunmaktadır. Mn-SOD enzimi ise mitokondri matriksinde yerleşmiştir (Mockett et al. 1999). CAT ise oluşan hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştürür. Bu enzimlerin görevi hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır (Parker et al. 2004). GPx omurgalılarda oksidan strese karşı en etkili antioksidan olup hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin indirgenmesini (redüksiyon) katalizleyen, dört alt birimden oluşan (tetramer) ve 4 selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir (Manduzio et al. 2005). GPx aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksit düzeylerinin yükselmesine ve hücre hasarına yol açmaktadır (Schaeffer and Stainer 1978, Ursini et al. 1982). GR ise oksitlenmiş glutatyonda (GSSG) oluşan disülfid bağının tekrar sülfidril yapısına indirgenerek daha sonraki konjugasyon reaksiyonları için hücreye indirgenmiş glutatyon (GSH) sağlar.

GST ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynayan faz II enzim sisteminin önemli bir enzimidir (Sivori et al. 1997, Sheehan et al. 2001). Başta araşidonik asit ve linolenik asitin (C18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ) peroksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksidler olmak üzere lipid peroksidlerine karşı selenyumdan bağımsız GPx aktivitesi (GSTPx) göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluşturur. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak ilaç, herbisit ve insektisit gibi yabancı maddeleri glutatyon (GSH,  $\gamma$ -glutamil-sistenil-glisin)'daki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar (O'Brien and Tew 1996). Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar. GSH'dan glutamat ve glisin

koparılmasından sonra sisteinin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürük asidlere dönüştürülür. Ksenobiyotiklerin omurgalılardaki klasik atılım ürünleri olan bu merkaptürük asitler daha sonra safra ile atılırlar. Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofilik pek çok bileşiği bağlamaları ise bu enzimlerin hücre içinde sınırlı çözünürlülüğe sahip moleküller için depo ve taşıma rolü üstlendiğini gösterir.

GST enzimi üç alt birimden oluşan zara bağlı mikrozomal enzim ve iki alt birimden oluşan dimerik sitoplazmik enzim olarak iki gruba ayrılır. Böceklerde sitoplazmik GST'lerin büyük bölümü zeta, teta ve omega sınıfına dahildir (Ranson et al. 2000). GST'nin böceklerin insektisitlere karşı direnç geliştirmelerinde önemli bir rolü vardır (Syvanen et al. 1996, Wei et al. 2001, Hamimy et al. 2004). GST'ler böceklerde insektisitlerden korunmada rol alan detoksifikasyon enzimlerinin büyük bir ailesidir (Yu 2004). Yüksek GST aktivitesi, insektisitlerin şiddetli toksitesinin izlendiği çoğu böcekte saptanmıştır (Punzo 1993, Vontas et al. 2001). GST ve GSH, reaktif türlerin konjugasyonu ve lipid peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonu ile oksidatif zararın önlenmesinde önemli bir rol oynarlar (Singh et al. 2001). *Musca domestica* (Linnaeus, 1758)'da organofosforlu insektisitlere dirençli mutantların yüksek GST aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Zhou and Syvanen 1997). GST, böceklerde insektisitlerin (Yu 1996) ve konak bitkilerden salınan allelokimyasalların (Wadleigh 1988, Yu 1993) metabolik detoksifikasyonunda, ROT'ların toksik etkilerinden böcekleri korumada (Clark et al. 1985, Ahmad and Pardini 1990 a, Parkes et al. 1993, Zaman et al. 1994, Vontas et al. 2001), aynı zamanda prostaglandin ve bazı hormonların biyosentezinde (Kanaoka et al. 2000) ve hücre içi iyon kanallarının düzenlenmesinde (Dulhunty et al. 2001) önemli role sahiptir. GSH, sahip olduğu sülfidril grubu ile oksidatif hasar ve toksik maddelere karşı hücreleri koruyan bol miktarda tiyol ihtiva eden, düşük moleküler ağırlıklı bir maddedir. Organik hidroperoksitler kadar hidrojen peroksite indirgenmesini de katalizleyen selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (Se-GPx) memeli dokularında bir anahtar antioksidan enzimdir. Böceklerde GPx'in selenyumdan bağımsız tipi bulunmaktadır. Daha önceki çalışmalarda lepidopter böceklerin çoğunun hidrojen peroksiti uzaklaştırmak (süpürmek) için önemli sayılabilecek derece selenyuma bağımlı GPx aktivitesine sahip olmadığını belirtilmiştir (Ahmad et al. 1987, Ahmad and Pardini 1990 b). Son çalışmalar *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803), *Spodoptera eridania* (Stoll, 1782), *Papilio polyxenes* (Fabricius, 1775) gibi lepidopter türlerde GPx aktivitesinin düşük de olsa bulunduğunu göstermiştir (Ahmad et al. 2005 a,b). Bu böceklerde düşük olan GPx aktivitesinin GST'nin peroksidaz aktivitesi (GSTPx) tarafından desteklenmekte olduğu

(Ahmad et al. 1989, Peric-Mataruga et al. 1997, Krishnan and Sehnal 2006) ve katalaz aktivitesinin de yüksek olduğu bulunmuştur. Katalaz enzimi sitoplazmada ve peroksizomlarda bulunmakta olup  $H_2O_2$ 'yi oksijen ve suya parçalamaktadır (Wang et al. 2002). Böceklerin sahip oldukları GST lipid peroksitleri metabolize edebilir fakat  $H_2O_2$ 'ye karşı reaktif değildir (Ahmad et al. 1991, Ahmad 1992, Kono and Shishido 1992). Böceklerde katalaz düşük konsantrasyonlarda iken  $H_2O_2$ 'yi redükte etmekte başarısızdır (Ahmad et al. 1991, Felton and Duffey 1991, Ahmad 1992). Bu nedenle böcekler peroksitleri güvenli bir düzeyde tutmak için farklı mekanizmalara sahiptir. Askorbat peroksidaz (APOX) böceklerde bulunan diğer bir doğal antioksidan enzimdir. *Helicoverpa zea* (Bod.) larvalarında bu enzim askorbatın oksidasyonu ile eş zamanlı olarak  $H_2O_2$ 'yi enzimatik olmayan yollardan redükte etmektedir (Mathews et al. 1997). Böceklerde reaktif oksijen türevlerine karşı enzimatik antioksidan savunma sistemleri tiyoredoksin redüktaz (TrxR) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimlerini de içermektedir. Tiyoredoksin peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (TPx ve GPx) substrat olarak glutatyonu kullanır. Fonksiyonel bir GR'den yoksun olan meyve sineği *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) glutatyonu indirgeme olayında tiyoredoksin sistemini kullanılır (Missirlis et al. 2003).

Bazı çalışmalarda çeşitli çevresel stres faktörlerine maruz kalan birkaç böcek türünün biyolojik özelliklerinin iyileşmesi ve ömür uzunluğundaki artışın, lipid peroksidasyonu seviyesinin düşmesi (Sestini et al. 1991) ve antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon bağımlı antioksidan enzimlerin aktivitelerinin yükselmesi (Sohal et al. 1995 b, Bains et al. 1998, Sun et al. 2002) ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır. Uzun süre fenitrotiyona maruz bırakılan lepidoptera takımına ait *Spodoptera exigua* (Hübner)'nin erginlerinde artan SOD aktivitesi ile birlikte yaşama oranının ve ömür uzunluğunun arttığı gözlenmiştir (Adamski et al. 2003). Büyükgüzel (2006) organofosforlu insektisitlerin öldürücü olmayan dozlarına karşı bir adaptasyon tepkisi olarak *Pimpla turionellae* (Linnaeus, 1758) erginlerinde SOD aktivitesinin ve ömür uzunluğunun arttığını göstermiştir. Kimyasal mücadelede kullanılan yeni insektisitlerin böcekler üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde yaşama, gelişme, ömür uzunluğu, yumurta verimi gibi biyolojik etkinlik parametrelerinin yanında biyokimyasal ve fizyolojik tepki mekanizmalarının da iyi bilinmesi gerekmektedir.

Böceklerin ortabağırsak, hemolenf ve yağ dokusunda ksantotoksin ve diğer bazı bitkisel allelokimyasalların sebep olduğu oksidatif strese karşı enzimatik antioksidatif savunma sisteminin önemi detaylı olarak incelenmiştir (Pritsos et al. 1991, Ahmad 1992, Bi and Felton

1995, Felton and Summers 1995, Timmermann et al. 1999, Barbehenn and Stannard 2004, Krishnan and Kodrik 2006). Böceklerde enzimatif antioksidatif savunma sistemi ile çalışmalar daha çok fenolik maddeler (taninler, fenolik asit, flavonlar, lignin, gliseollin), kinonlar ve furanokumarinler (ksantotoksin, izopimpinellin, angelisin) ile ilgili olup bu konuda yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu orta bağırsaktaki oksidatif ve antioksidatif tepki üzerinde yoğunlaşmıştır (Lee and Berenbaum 1990, Brown et al. 2005, Barbehenn et al. 2005 a,b, 2006, 2008, Chen 2008). Bitki allelokimyasalları bitki-böcek tritrofik etkileşimi incelemek ve bazı dokulardaki antioksidan düzeyi belirlemek için kullanılan yapay besinlere doğrudan ilave edilmektedir (Timmermann et al. 1999, Barbehenn et al. 2005 a,b). Diğer taraftan belirtilen parametrelerin böceğin yaşama ve gelişimi ile ilişkisini incelemek için lepidopter böceklerin bazıları doğrudan bu allelokimyasalların kaynağı bitkiler ile doğal olarak beslenmektedir (Lee and Berenbaum 1989, Aucoin et al. 1995, Barbehenn 2005, Krishnan and Kodrik 2006). Bu sekonder metabolitlerin yüksek konsantrasyonlarda böceklerin yaşama, gelişme, vücut büyüklüğü üzerinde olumsuz etkiler yaptığı gözlenmiştir. Böceğin yaşama ve gelişimi üzerine etkisiz olan konsantrasyonların üzerindeki yüksek konsantrasyonlarda ksantotoksin yaşama oranını düşürmüş, gelişmeyi geciktirmiş ve vücut büyüklüğünü azaltmıştır (Chen 2008, Lampert et al. 2008). Furanokumarinlerin toksisitesi UV ışığı varlığında arttığı halde bu ışığın olmadığı durumlarda da adapte olmayan böceklerin ölüm oranını etkilemektedirler (Berenbaum 1978, 1995). Diğer taraftan, ksantotoksinin farklı konsantrasyonları (% 0,87 ve 0,1 a/a) ile birlikte  $\alpha$ -sipermetrine maruz kalan *Heliothis zea* (Boddie, 1850) larvalarında ksantotoksin tarafından uyarılan P450 enzimi  $\alpha$ -sipermetrine karşı direnç oluşturarak böceğin yaşama oranını artırmıştır (Li et al. 2000 a,b). Bitkisel allelokimyasallar böceklerin biyolojisi üzerinde olumsuz etkiler göstermelerine rağmen böceklerdeki etki mekanizmaları tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Bazı bitkisel sekonder metabolitlerin böcek larvaları orta bağırsak hücreleri üzerinde öldürücü etkiye sahip olduğunun gösterilmesi (Bernays et al. 1980, Barbehenn 2003) dikkatleri bitkisel kökenli prooksidan maddelerin böceklerin larval evreleri dışında diğer evrelerdeki etki mekanizmasının aydınlatmaya yönelik çalışmalara yöneltmiştir.

Ksantotoksin bir bitkisel allelokimyasal olup kuvvetli bir prooksidandır. Bu bitki prooksidanı DNA sentezini seçici olarak inhibe eder. Aktivasyondan sonra DNA'nın guanin ve sitozin bazları ile çapraz bağlar yaparlar. Yüksek konsantrasyonlarda RNA ve protein sentezini de baskılar. Bu sekonder metabolit Apiaceae ve Rutaceae familyasına ait çeşitli bitki türlerinde bulunan doğal olarak görülen bir furanokumarin bileşiğidir. Kumarin ana yapısındaki furan

halkasının yan gruplarının konfigürasyonuna bağlı olarak düzlemsel ve açısız olarak bulunurlar. Ksantotoksin metabolizması sonucunda superoksit radikali ve tekli oksijen gibi ROT'ları oluşturan bazı metabolitlere oksitlenir (Ahmad and Pardini 1990 b, Pritsos et al. 1990). Böcekler tarafından bu maddelere karşı davranışsal, fiziksel ve biyokimyasal direnç mekanizmaları bulunmaktadır. Biyokimyasal direnç mekanizmaları içerisinde CAT, SOD, GR, GST gibi antioksidan veya detoksifikasyon enzimleri ile glutatyon, ürik asit gibi düşük moleküler ağırlığa sahip antioksidan maddeler bulunmaktadır. Diğer taraftan birçok herbivor böcekte furanokumarine direnç geliştirmede birinci derecede sitokrom P450 mono-oksijenaz enzimi etkilidir. *Papilio* (Lepidoptera: Papilionide) cinsine ait türlerin yakalşık % 75'i furanokumarin içeren bitkiler ile etkileşim halindedir (Pritsos et al. 1990). Siyah kırlangıç kuyruklu bir kelebek türü *Papilio polyenes* (Linnaeus, 1758) büyük oranda furanokumarin içeren bitkiler ile beslenir. Bu böcekler tarafından furanokumarinlerin metabolizması sitokrom P450 mono-oksijenaz ile gerçekleştirilir.

Herbivor böceklerin dahil olduğu tüm aerobik organizmalar yaşamları süresince, süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) veya hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretiminden kaynaklanan oksidatif strese maruz kalmaktadır (Ahmad and Pardini 1990 a). Metabolizmaları sırasında kendi kendilerince oksitlenebilen moleküller ve oksidoredüktazlar gibi endojen ROT kaynakları, çekirdek, mitokondri ve mikrozom gibi hücre içi organeller içerisinde yer almaktadır (Barbehenn et al. 2003). Ayrıca, herbivor böcekler doğal ortamlarında üzerinde beslendikleri konak bitkileri aracılığıyla, aktivasyona bağlı olarak ROT üreten bitki prooksidan bileşikleri (allelokimyasallar) gibi eksojen kaynaklara da maruz kalır. Asetofenonlar,  $\beta$ -karbolin alkaloidler, furanokumarinler, tiyofenler, poliasetilenler, flavonoidleri *o*-dihidroksifenoller ve kinonları içeren bitki prooksidantları, bitki yüzeyinde veya epidermis ve mezofil gibi periferel dokular içinde bulunabilir (Downum and Rodriquez 1986, Manach et al. 1996, Barbehenn et al. 2003, Roda et al. 2003). Bunların birçoğu fotokimyasal olarak aktive edilirken, sadece fenolik bileşikler ve kinonlar metabolik aktivasyona maruz kalır. Fenoller (Ahmad and Pardini 1990 b), özellikle *o*-dihidroksifenoller, süperoksit radikalleri ve dolayısıyla hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini oluşturmak için moleküler oksijenle tepkimeye girerek oksidasyon sonucunda reaktif semikinon radikalleri üretebilirler (Kalyanaraman et al. 1987, Ahmad 1992). Diğer taraftan, fenolik maddeler, yapılarına, konsantrasyonlarına ve ortamın fizikokimyasal şartlarına bağlı olarak hem prooksidan hem de antioksidan gibi davranabilir. *In vitro* şartlarda quersetin ve mirisetinin, sulu ortamda ve pH 7.4'te otooksidasyona uğrayarak ROT üretebildiği

gösterilmiştir (Laughton et al. 1989). Buna ek olarak, fenolik bileşiklerin, hidroksil radikalleri üretimini başlatabilen bakır veya demir gibi metaller üzerine şelatlama etkisi vardır. Böylece bazı durumlarda, muhtemelen patolojik olarak, bazı *o*-dihidroksifenoller bir prooksidan gibi rol oynayabilir (Manach et al. 1996). Herbivor böceklerde fenoliklerin oksidasyonu, oksitleyici çevre, alkalın (bazik) pH veya polifenol oksidaz (PPO) ve peroksidaz (Px) varlığında artırılabilir (Kalyanaraman et al. 1987).

Herbivorlar içerisinde konak bitkileri ile kimyasal etkileşimlerindeki oksidatif stres düzeyi ve antioksidan mekanizma ile ilgili çalışmaların çoğu, lepidopter larvaları gibi yaprak-çiğneyici böcekler ve afidler gibi emici-delici ağıza sahip böcekler (Lukasik and Golawska 2007) üzerine yoğunlaşmıştır ancak Pyralidae familyasına ait doğrudan bitkiler ile beslenmeyen depolanmış ürün zararlısı güveler içerisinde oksidan ve antioksidan sistem hakkında az şey bilinmektedir. Bu çalışmada yapay besinler ile beslenen büyük bal mumu güvesinin erginlerinde lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu seviyesi ile detoksifikasyon enzimi GST aktivitesi üzerine furanokumarin grubundan bir bitki prooksidan maddesi ksantotoksinin laboratuvar şartlarında etkisi incelenmiştir.

Ksantotoksinin böceğin yaşama, gelişme ve ergin biyolojik özellikleri ile metabolik faaliyetleri üzerine etkilerinin araştırılması, böceklerin konak bitkiler ile etkileşiminin oksidatif ve antioksidatif düzeyde anlaşılması için de bir ışık olacaktır. Şimdiye kadar ksantotoksinin besinsel karışımlarının *G. mellonella* (L.) ve diğer lepidopter böceklerin biyolojik özellikleri üzerindeki kalitatif ve kantitatif etkileri belirtilmemiştir. Bu çalışmada yapay besine ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki ksantotoksinin *G. mellonella* (L.) 'nın yumurtadan yeni çıkmış larvalarının ergin evreye kadar yaşama oranına, gelişme süresine, eşey oranına, erkek ve dişi ömür uzunluğuna, yumurta verimi ve açılma oranına etkisi incelenmiştir. Ayrıca böceğin yeni erginleşen bireylerinde lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu seviyesini gösteren sırasıyla MDA ve protein karbonil miktarı ile detoksifikasyon enzimi GST aktivitesinde sebep olduğu değişimler de belirlenmiştir. Böylece larval evrede besinle alınan farklı konsantrasyonlardaki ksantotoksinin böceğin erginlerinde bazı biyolojik etkinlik özellikleri üzerindeki etki mekanizmasının oksidatif stres ile ilişkisinin biyokimyasal ve fizyolojik temelleri ortaya konmaya çalışılmıştır.

## BÖLÜM 2

### GENEL BİLGİLER

Tarımsal savaşım, bitkilerin hastalık, zararlı ve yabancı otların etkilerinden ekonomik ölçüler içinde korunması, ürünün ve kalitenin artırılmasıdır. Bu basit tanımdan da anlaşılacağı gibi, tarımsal savaşım, bir yandan ürünü ve kalitesini arttırmak, bir yandan da ekonomik olmak hedeflenmektedir. Bu amaca ulaşabilmek için, tarımsal savaşımın entegre savaş (entegre zararlı yönetimi) görüşüne uygun olarak yürütülmesi gerekmektedir. Entegre zararlı yönetiminden ise, tarımsal savaşımında bilinen tüm yöntemlerden yararlanan, insan ve çevre sağlığına olumsuz etkileri en az olanların uygulanmasına yönelik çalışmalar anlaşılmaktadır. Tarımsal savaşım değişik yöntemleri içermektedir. Bu yöntemlerden birisi de tarım ilaçlarının (pestisitlerin) kullanıldığı kimyasal savaşımdır. Her ne kadar kimyasal savaşım tarımsal savaşımında bir yöntem ise de, tüm savaşım yöntemleri arasında en fazla kullanılanıdır. Çünkü kimyasal savaşım yüksek etkililiğe sahiptir, hızlı sonuç verir, bilinçli ve kontrollü kullanıldığında ekonomiktir ve ürünü toksin salgılayan organizmalardan da koruyabilir (De Waard et al. 1993). Kısaca özetlenen bu avantajlar, kimyasal savaşımın modern bitki korumada uygulanması gerekli bir yöntem olma özelliğini günümüzde de sürdürmesinin en önemli nedenidir. Ancak, pestisitlerin bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı sonucu, zararlı organizmalarda dayanıklılık oluşturabilme, riskleri ve kalıntılar yoluyla insan sağlığına ve çevreye olumsuz etkileri kesinlikle göz ardı edilmemelidir. Söz konusu riskler nedeniyle, özellikle gelişmiş ülkelerde pestisitler daha bilinçli ve kontrollü kullanılmaktadır. Bunu sağlayabilmek için, örneğin AB ülkelerinde ve ABD’nde birçok yasa çıkarılmış, resmi örgütler kadar, sivil toplum örgütleri de bu yönde söz sahibi duruma gelmişlerdir (Gullino and Kuijpers 1994).

Zararlı böceklerin kontrolü için geliştirilen teknikler içerisinde, zirai mücadelede öncelikle, doğal denge ve ekonomik zarar eşiği göz önünde tutulur. Bitki korumada doğal dengeyi bozmadan zararlı popülasyonlarını mümkün olduğunca uzun süre ekonomik zarar seviyesinin altında tutmak temel ilkedir. Bu nedenle, zararlıların bulaşmaları veya çoğalmalarını önleyen, doğal dengeyi bozmadan ve herhangi bir girdi kullanmadan zarar oluşmasını önleyen

yöntemler öncelikle uygulanmalıdır. Ancak dünyada kimyasal mücadele, diğer mücadele yöntemlerinden çok daha fazla tercih edilen bir mücadele yöntemi olmuştur. Kısa sürede etki gösteren, uygulaması kolay olan kimyasallara, zararlılar ve hastalıklarla mücadelede tek kurtarıcı olarak bakılmış ve uzun vadede çevreye yaptıkları geriye dönüşümsüz olumsuz etkileri ilk olarak 1962 yılında Rachel Carson tarafından “Sessiz İlkbahar” (Silent Spring) adlı kitapta anlatılmıştır. Bu kitap biyologlara, ekoloğlara, araştırmacılara, çevrecilere vb. birçok kesime çok önemli mesajlar vermiş ve bundan sonra da bu konudaki çalışmalara hız verilmiştir. DDT'nin keşfinden önce, 1940'ların başına kadar zararlılar tarafından üründe meydana gelen kaybın dünya ortalaması %7 iken, 1980'lerin sonuna doğru ürün kaybı %13'e yükselmiştir. Bu ürün kaybındaki iki katlık artış, ilaç devriminden sonra başlamış ve aynı dönem içinde ilaç kullanımında ise 12 katlık bir artış meydana gelmiştir. İlaç kullanımındaki 12 katlık artışa rağmen, ürün kayıplarındaki bu artış, ilaçlara dayanıklılığın artmasından, doğal düşmanların öldürülmesinden, potansiyel zararlıların ekonomik zararlı durumuna geçmesinden kaynaklanmıştır. Bunlara, insan ve hayvan sağlığının tehdit edilmesi, gıda maddelerindeki ilaç kalıntıları, çevre kirlenmesi, yüksek ilaç fiyatları, ekonomik kayıp vb. yan etkiler de eklenince kimyasal mücadeleye alternatif çevre dostu ve daha ucuz mücadele yöntemlerine geçilmesi zorunlu hale gelmiştir. Bu yöntemler kanuni tedbirler, kültürel önlemler ve fiziksel mücadele yöntemleridir. Koruyucu önlemlerin alınmasına karşın zararlıların sorun olması durumunda, ortaya çıkan zararlılara karşı mekaniksel, biyoteknolojik ve biyolojik mücadele gibi çevre dostu mücadele yöntemleri uygulanmaktadır (Melan 2004).

Pestisitler insanlarda, akut ve kronik zehirlenmelere, kansere, alerjik reaksiyonlara, sinir sisteminin tahribatına, öğrenme güçlüğü ve hafıza kaybına, insan organizması için hayati fonksiyonları olan enzim dengelerinin bozulmasına, biyomoleküler hasara, hücre içi DNA moleküllerinde bozulmalara ve mutasyona neden olurlar. Sayılan tüm bu ve benzeri olumsuzluklarından dolayı kimyasal mücadele en son düşünülmesi gereken bir metot olmalıdır.

Ülkemizde ekonomik düzeyde önemli zararlı olan tüm zararlılara karşı kullanılacak mücadele yöntemleri, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Zirai Mücadele Teknik Talimatlarında yer almaktadır. Bu teknik talimatlarda kimyasal mücadele hariç, tüm zirai mücadele yöntemleri organik tarımda da uygulanabilir yöntemlerdir. Bazı talimatlarda ise organik tarımda kullanılacak çok az sayıda kimyasal mücadele tavsiyeleri de bulunmaktadır (Melan 2004).

Gelişmiş ülkelerde organik klorlu ve organik fosforlu insektisitlerin keşfinden önce 1930-40 yıllarında, tarımsal zararlılarla mücadelede bitkisel kökenli insektisitlerin önemli oranlarda kullanıldığı kayıtlıdır. 1939 yılında ABD’de toplam pyrethrum ithali 5.400 ton iken 1990 yılında bu miktar sadece 350 ton olmuştur. Bitkisel kökenli insektisitler zamanla yerlerini daha etkili, etki süreleri daha uzun sentetik insektisitlere bırakmıştır. Ayrıca gelişmiş ülkelerde sentetik insektisitler teknoloji sayesinde daha ucuz elde edilebilirler. Günümüzde bitkisel kökenli insektisitler dünya pazarının % 1’ini oluşturmakta ve organik tarıma yönelim nedeniyle yıllık satışlar her sene % 10-15 oranında artış göstermektedir.

Zirai mücadelede en çok kullanılan metotlardan biri kimyasal insektisitlerdir. Bu insektisitler böcekler üzerinde son derece etkili olup başarılı sonuçlar alınmasına rağmen kullanılan kimyasal insektisitlerin memelilere ve diğer canlı gruplarına da toksik etki göstermesi bunların en önemli dezavantajıdır. Bu yüzden bitkisel kökenli insektisitlere olan ilgi yeniden önem kazanmış ve son yıllarda organik tarımla birlikte bu konudaki çalışmalar da yoğunluk kazanmıştır.

Doğal insektisitlerin ruhsat alabilmesi için toksikolojik ve ekotoksikolojik incelemeler için 100’den fazla özelleşmiş testten geçmesi gerekir ki bu işler yaklaşık 10 yıl sürmekte ve büyük paralar harcanmaktadır. Bu nedenle günümüzde ruhsat almış organik insektisitlerin sayısı sentetiklere göre daha azdır.

Bitkisel kökenli doğal insektisitler bitkilerden çeşitli yöntemlerle elde edilen ve insektisit özelliği gösteren bileşiklerdir. Bu maddeler işlenmemiş bitkisel materyaller, bitki ekstraktları ve bitkilerden izole edilen saf bileşikler gibi formlarda olabilir. 2000’den fazla bitkinin insektisit etkisinin var olduğu bilinmesine karşın pratikte yararlanılanların sayısı çok azdır. Bunun nedenleri doğal kaynakların kısıtlı olması, standardizasyon ve ruhsat almadaki zorluklardır. Bitkisel kökenli insektisit olarak üzerinde en çok çalışmalar yapılan bitki *Azadirachta indica*’dan izole edilen azadiraktindir. Tropik ve subtropik bölgelerde yaşayan 200’den fazla ısırıcı böcek türüne etkili olduğu tesbit edilmiştir. Yararlılara ve sıcakkanlılara toksik etkisi bulunmamaktadır. *Chrysanthemum cinerariaefolium*’un çiçeklerinden elde edilen pretrum (pyrethrum) mevcut insektisitlerin içinde en eski ve en güvenilir olup halen geniş alanlarda kullanılan tek bitkisel kökenli insektisittir. Isırıcı ve emici böceklere karşı insektisit etkilidir. Daha çok depolanmış ürün ve ev zararlılarına karşı kullanılmaktadır. Pyrethrum’un en büyük dezavantajı gün ışığında çabuk parçalanmasıdır. Rotenon Amerika’da yetişen

*Lonchocarpus* sp. (Fabaceae) ve Asya'da yetişen tropik bir bakla türü olan *Derris* sp. (Fabaceae) ve *Terphrosia* sp. bitkilerinin köklerinden ekstrakte edilerek kullanılmaktadır. Böceklerde temas ve hemde mide zehiri olarak etki gösterir ve genelde yaprakla beslenen Lepidoptera takımına ait türlerin larvalarına karşı mücadelede kullanılır. Balıklara son derecede toksik olduğu saptanmıştır. *Nicotiana tabacum* ve diğer *Nicotiana* türlerinin yapraklarından çeşitli metotlarla ekstrakte edilen nikotin Avrupa'da 1950'li yıllardan beri kullanılmaktadır. Tütün yapraklarının sulu ekstraktı zararlı böceklere karşı kontakt etki gösterir. Daha çok afidler ve diğer yumuşak vücutlu böceklere karşı mücadelede kullanılmaktadır. Sıcakkanlılara son derece toksik olan nikotini kullanırken dikkat edilmelidir. Ryania Güney Amerika kökenli *Ryania speciosa* adlı bitkinin kök, yaprak ve gövdesinden ekstrakte edilmekte ve Lepidoptera larvalarına temas ve mide zehiri etkisi göstermektedir *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796), *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758), *Dacus dorsalis* (Hendel, 1912) ve *Heliothis zea* (Bod.) gibi zararlılara insektisit ve uzaklaştırıcı (repellent) etkisinin olduğu saptanmıştır. Ancak memelilere yüksek toksisitesi yüzünden kullanımı kısıtlanmıştır. Quassin adı verilen *Quassine armara* (Acı ağaç) adlı bitkinin gövdesinden elde edilen ekstrakt meyvecilikte unlu bitlere ve testereli arılara karşı insektisit ve repellent olarak kullanılır (75g bitki / 1 lt su içinde 24 saat ıslatılır, kaynatılır, arap sabunu konur ve soğutulur). *Schoenocaulon officinale* bitkisinin tohumundan elde edilen sabadilla adı verilen ekstrakt Heteroptera takımına ait zararlılarda kullanılmakla birlikte *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758), *Ostrinia nubilalis* (Hubn.), *Thrips tabaci* (Lindeman, 1889) ve *Empoasca* spp. gibi zararlılara karşı insektisit etkisi göstermektedir. Balarlarına toksisitesi yüksek olduğundan kullanılırken dikkat edilmelidir (Melan 2004).

Ksantotoksin Apiaceae ve Rutaceae familyasına ait çeşitli bitki türlerinde bulunan doğal olarak görülen bir furanokumarin bileşimidir. Kumarin ana yapısındaki furan halkasının yan gruplarının konfigürasyonuna bağlı olarak düzlemsel ve açısız olarak bulunurlar. Ksantotoksin metabolizması sonucunda superoksit radikali ve tekli oksijen gibi ROT'ları oluşturan bazı metabolitlere oksitlenir (Ahmad and Pardini 1990 b, Pritsos et al. 1990).

*G. mellonella* (L.)'nın özellikle larva evreleri arı kovanlarının önemli zararlısıdır. Arıcılık sektöründe her yıl önemli derecede ekonomik kayba yol açmaktadır. Genelde bazı mevsimlerde çok fazla çoğalarak istila ettiği kovanlardaki bal, bal mumu ve arılara zarar vererek ve sonuçta arıların büyük bölümünü öldürebilmektedir. Böcek larval evrelerde kovandaki bal ve bal mumu veya depolanmış ürünler ile beslenerek kayba sebep olmakta son

evre (7. larval evre) larvalarına doğru zarar gittikçe artmaktadır. Bal arılarının bitkilerden nektar toplaması sırasında bitki allelokimyasalları ile kontamine olması sonucu *G. mellonella* (L.) larvaları bu güçlü prooksidan maddeler ile karşılaşabilmektedir. Böylece dolaylı besinsel etkileşimin (trofik) antioksidan savunma sistemini ele alarak incelenmesi zararlı böceklerin mücadelesinde yeni teknik ve yaklaşımlar belirlemek açısından yararlı olabileceği gibi böceklerin çevreleri, besinleri ve konakları ile ekolojik ilişkilerinin anlaşılmasını sağlayacaktır. Bu çalışma ayrıca bitkisel kökenli insektisitlerin tarımsal mücadelede kullanım oranının artırılmasında önemli olacaktır.



## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOT

#### 3.1 GALLERIA MELLONELLA L. KÜLTÜRÜNÜN DEVAMI

Büyük bal mumu güvesi *Gallaria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) pup ve erginleri Zonguldak ve çevresindeki arıcılardan temin edildi ve bölümümüz laboratuvarında yumurtadan yeni çıkmış larvalar yapay besinde yetiştirilerek stok kültür oluşturuldu. Böcek kültürünün devamı yumurtadan yeni çıkmış larvaların yarı sentetik besinde (Bronskill 1961) aseptik olmayan şartlarda beslenilmesi ile sağlandı. Deneylerde böcek tarafından bırakılan yumurtalardan yeni çıkmış larvalar (birinci evre) kullanıldı. Kültür  $28 \pm 2$  °C ve %  $65 \pm 5$  bağıl neme ayarlı bir inkübatörde (Nüve, EN 500) ve gün boyu devamlı karanlıkta yürütüldü.

*G. mellonella* (L.) larvalarını laboratuvar şartlarında yetiştirmek için Bronskill (1961) tarafından geliştirilen öğütülmüş koyu renkli eski bal peteği (kuluçka peteği) içeren yapay besin kullanıldı. *G. mellonella* (L.) kültürünün devamı için kullanılan bu besin aynı zamanda ksantotoksinin böcek üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yürütülen beslenme deneylerinde de kontrol besini olarak kullanıldı. Besin, 420 g buğday kepeği, 150 ml süzme bal, 150 ml gliserin (Merck, Darmstadt, Germany), 20 g öğütülmüş koyu renkli eski petek ve 30 ml saf sudan oluşmaktadır. Besinin bileşenleri gerekli miktarda tartılarak geniş bir kap içerisinde karıştırıldı ve karıştırıcı ile homojen bir karışım oluşturuldu. Bu karışım sıvı bileşenlerin katı bileşenler tarafından tam olarak emilebilmesi için 24 saat bekletildi. Hazırlanan besin bir litrelik cam kavanozların (80x180 mm) yaklaşık 1/3'ne kadar dolduruldu. Kavanozun içine konulacak dişilerin yumurta bırakması ve yeni açılan larvaların beslenmesi için besinin üzerine küçük bir parça bal peteği bırakıldı (Ortel 1995). Bu kavanozların içine 10-15 adet dişi bırakılarak ağızları tel kafes yerleştirilmiş kapak ile kapatıldı. Yaklaşık 25-30 gün sonra gelişimlerini tamamlayan olgunlaşan larvalar (7. evre) pup olmaları için diğer bir kavanoza aktarıldı. Bu kavanozun içine, larvaların pup olmaları için kuru ortam sağlamak üzere, katlanmış pelur kağıt parçaları bırakıldı (Campos et al. 1990). Oluşan puplardan yaklaşık 7-8

gün sonra ergin bireyler meydana geldi. Bu erginlerin büyük bir çoğunluğu böcek kültürünün devamı, bazı erginler ise ksantotoksinin farklı konsantrasyonlarının etkisi ile ilgili beslenme çalışmaları için gerekli yumurtaların elde edilmesinde kullanıldı.

### **3.2 KSANTOTOKSİNİN DENEYLERDE KULLANILMASI**

Bu çalışmada denenen ksantotoksinin belirli bir miktarı (8-Methoxypsoralen, toz, % 98≥, C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından satın alınarak Çek Cumhuriyeti Masaryk Üniversitesi Hayvan Fizyolojisi ve İmmünolojisi Bölümünden Dr. Pavel Hyřl tarafından hediye edildi. Ksantotoksinin besine ilave edilmesi ile yürütülen beslenme deneylerinde denenen miktarların konsantrasyonu 100 g besin başına gram (%) olarak ifade edildi. Ksantotoksin suda çözüldüğü için bu miktarlar, besinin hazırlanması sırasında doğrudan besine ilave edildi. Kontrol besini (ksantotoksin içermeyen) hariç ksantotoksinin *G. mellonella* (L.) için 0,001, 0,005, 0,1 g olmak üzere üç farklı konsantrasyonu denendi. Kontrol deneylerinde ise yalnızca ksantotoksin içermeyen besin kullanıldı. Bu çalışmada denenecek ksantotoksin konsantrasyonları tarımsal yönünden zararlı Lepidoptera takımına ait bazı böcek türleri (Timmerman et al. 1999) ve *Galleria mellonella* (L.) (Büyükgüzel et al. 2010) ile yapılan önceki beslenme çalışmaları temel alınarak belirlenmiştir. Bu çalışmaların ışığında, denenecek konsantrasyonların aralığını belirlemek amacıyla ön beslenme deneyleri yapıldı. Böceklerin ergin evreye kadar gelişimini tamamlayabileceği konsantrasyon aralıkları belirlendi. Ksantotoksinin *G. mellonella* (L.) üzerindeki konsantrasyonları belirlenerek böceğin 7. evre larvalarının hemolenf MDA ve protein karbonil miktarları ile antioksidan enzimler SOD, CAT, GST ve GPx aktivitesine etkisi önceki bir çalışmamızda (Büyükgüzel et al. 2010) incelenmiştir. Bu çalışmada böceğin yaşama, gelişme, eşey oranı, erkek ve dişi ergin ömür uzunluğu, yumurta verimi, yumurtaların açılma oranı, yeni erginleşen bireylerin MDA ve protein karbonil miktarı ile GST aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesinde daha önce çalışılan ksantotoksin konsantrasyonları aynen kullanılmıştır.

### **3.3 LARVALARIN ELDE EDİLMESİ**

Beslenme deneylerinde kullanılacak *G. mellonella* (L.) larvaları, kapaklı, 30 ml'lik geniş ağızlı, vida kapaklı bir plastik kabın (ORLAB, L190030, 35x55 mm) iç yüzeyine dişiler tarafından bırakılan yumurtaların açılması ile elde edildi. Bunun için 2-3 dişi birey, delikli kapakları olan bu plastik kaplara konuldu ve yumurta bırakmaları için stok kültürün devam

ettirildiği ortam koşullarında bekletildi. Bırakılan yumurtalar yine aynı ortam şartlarında bekletilerek açılması sağlandı. Yumurtadan yeni çıkan larvaların kaçmasını önlemek için caydırıcı olarak kabın kapağa yakın iç yüzeyine yaklaşık 1 cm kadar genişlikte gliserin sürüldü. Yumurtaların açılması ile serbest kalan larvalar, yumuşak uçlu ve ucu gliserine batırılarak nemlendirilmiş bir fırça (No: 0, Goya Toray) ile içlerinde 200 g besin bulunan tel kafesli metal kapaklı orta boy cam kavanozlara (60 x120mm) bırakıldı.

Bu şekilde larvalar tarafından doğrudan besin aracılığıyla alınan ksantotoksin karışımlarının böceğin yaşama, gelişme, eşey oranı, erkek ve dişi ergin ömür uzunluğu, yumurta verimi, yumurtaların açılma oranı, yeni erginleşen bireylerin MDA ve protein karbonil miktarı ile GST aktivitesi üzerine etkileri incelendi.

### **3.4 YAŞAMA, GELİŞME, EŞEY ORANI VE ERGİN ÖMÜR UZUNLUĞU İLE İLGİLİ BESLENME DENEYLERİ**

Farklı konsantrasyonlarda ksantotoksinin ergin evreye kadar *G. mellonella* (L.)'nın yaşama oranına ve gelişme süresine etkisini incelemek için öğütülmüş koyu renkli bal peteği içeren Bronskill'in (1961) yapay besini kullanıldı. Ksantotoksinin denenen miktarları % (100 g besine g ksantotoksin) olarak hesaplanıp gerekli miktarları besinlerin hazırlanması sırasında ilave edilerek homojen olarak karışması sağlandı. Daha sonra kontrol besinleri ve ksantotoksini içeren diğer besinler uygun besin kaplarına (Cam kavanozlar, 60 x120 mm) taksim edildi. Her bir besin için 20 larva kullanıldı ve deneyler dörder defa tekrarlandı. Larvalar farklı konsantrasyonlarda ksantotoksin içeren besinlere bırakıldıktan sonra gelişimlerini tamamlayan olgun *G. mellonella* (L.) larvaları (7. evre larvalar) alınarak pup olmak üzere 30 ml'lik plastik örnek kaplarına (ORLAB, L190030, 35x55 mm) her kaptaki bir larva olacak şekilde bırakıldı. Bu kapların içerisine larvaların pup olması için ortam sağlamak üzere katlanmış, ince pelur kağıt bırakıldı. Son larva evresine ulaşan larvaların oranı ile her bir larvanın 1. larva evresinden itibaren son larval evreye ulaşması için geçen süre (gün) kaydedildi. Pupa olan bireylerin oranı, 1. larva evresinden itibaren pup olma süreleri (gün) ile bu puplardan erginleşen bireylerin oranı ve ergin olma süreleri (gün) ile erginleşen bireylerin erkek ve dişi oranı belirlendi. Denemede kullanılan erginlerin eşey ayrımı, erginlerinin vücut büyüklüğüne ve abdomenlerinin son segmentindeki genital yapıya göre yapıldı.

Farklı konsantrasyonlarda ksantotoksinin erkek ve dişi ergin bireylerin yaşama süresine (ömür uzunluğu) etkisini belirlemek için yumurtadan yeni çıkmış *G. mellonella* (L.) larvaları ksantotoksinin denenen miktarlarını içeren yapay besinler ile ergin evreye kadar beslendi. Her bir deney için 10 adet ergin kullanıldı ve deneyler dörder defa tekrarlandı. Erginleşen bireyler 30 ml'lik, geniş ağızlı, şeffaf, delikli kapaklı plastik kaplara (ORLAB, L190030, 35x55 mm) birer adet bırakıldı. *G. mellonella* (L.) erginleri besin almadığı için deney süresince herhangi bir besin verilmedi. Bu erginler stok kültürün devam ettirildiği ortam şartlarında bırakıldı. Erginler, her gün belirli saatte kontrol edilerek en son erginin ölümüne kadar her erginin yaşama süresi belirlendi.

### 3.5 DIŞİLERİN YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANI İLE İLGİLİ DENEYLER

Farklı konsantrasyonlarda ksantotoksinin sentetik besinle yetiştirilen *G. mellonella* (L.) dişilerinin yumurta verimine etkisini incelemek için yumurtadan yeni çıkan larvalar bu bitki allelokimyasalının farklı miktarlarını içeren yapay besinler ile ergin evreye kadar beslendi. Bu amaçla yeni erginleşmiş ve döllenmemiş bir günlük dişiler kullanıldı. *G. mellonella* dişileri geniş ağızlı, delikli kapaklı, plastik kaplara (15 ml, ORLAB) her kapta bir adet dişi olacak şekilde bırakıldı. *G. mellonella* (L.)'nın erginleri besin almadığı (Charriere and Imdorf 1997) için bu dişilere yumurta bırakma süresi içerisinde herhangi bir besin verilmedi. Dişiler tarafından bırakılan yumurtalar siyah bir zemin üzerine konulan petri kutusu içinde sayıldı. Yapılan ön denemeler erginleşen dişilerin ilk 48 saat içinde yumurtalarının çoğunluğunu bıraktığını göstermiştir. Bu yüzden ilk iki gün içinde bırakılan yumurtalar sayılarak açılması için stok kültürün devam ettirildiği ortam şartlarında bekletildi. Yumurta üretimi, bir günde dişi başına bırakılan yumurta sayısı ele alınarak değerlendirildi ve dişinin verimliliği olarak ifade edildi. Her gün açılan larvalar yine siyah bir zemin üzerinde sayılarak ortalama sayısı kaydedildi ve yumurtaların açılma oranı (fertilite) tespit edildi. Kontrol ve ksantotoksinin her bir konsantrasyonu için 10 adet dişi kullanıldı ve deneyler dört defa tekrarlandı. Yumurta bırakmayı önleyici indeks (YÖİ) ayrıca Riba et al.'e (2003) göre hesaplandı.

$$YÖİ = (B_{ksantotoksin\ içermeyen} - B_{ksantotoksin\ içeren}) / (B_{ksantotoksin\ içermeyen} + B_{ksantotoksin\ içeren})$$

$B_{ksantotoksin\ içermeyen}$  ksantotoksin içermeyen besinlerde yetiştirilen erginlerin bıraktığı yumurta sayısını,  $B_{ksantotoksin\ içeren}$  ksantotoksin içeren besinlerde yetiştirilen erginlerin bıraktığı yumurta sayısını göstermektedir. Bu indeks (YÖİ) yumurta bırakma üzerinde önleyici etki olmadığını

gösteren “sıfır” ile yumurta bırakılma davranışının tamamen önlendiğini gösteren yaklaşık “1” rakamları arasındadır.

Kontrol ve ksantotoksin konsantrasyonlarının *G. mellonella* (L.) üzerindeki etkisinin araştırıldığı deneylerin hepsinde larvaların aşılacağı besin kapları ve olgun larvaların pup olmaları için hazırlanan kaplar kısa bir günlük inceleme periyodu hariç sürekli olarak karanlıkta tutuldu. Besinin hazırlanması ve larvaların aşılması hariç beslenme deneylerinin tümü böceklerin stok kültürünün yetiştirildiği şartlarda yürütüldü. Besinin hazırlanması, yumurtaların elde edilmesi, bu yumurtalardan çıkan larvaların besine aşılması işlemleri tamamen aseptik olmayan şartlarda yapıldı (İçen et al. 2005, Büyükgüzel et al. 2007, Büyükgüzel and Kalender 2007). Bu işlemlerin uygulanmasında Laing ve Hagen’in (1970) meyve güvesi *Grapholitha molesta* (Busck, 1916) ile Campos et al.’ın (1990) mısır kurdu *Ostrinia nubilalis* (Hubn.) için kullandığı yöntemler temel alındı ve bir ölçüde değiştirilerek uygulandı. Birçok lepidopter türünün birinci evre larvalarında olduğu gibi *G. mellonella* (L.) larvalarının da ilk evrelerinde besin ortamında ölüm oranının yüksek olduğu, ölen larvaların içlerinin boş olarak kuruduğu ve göz ile görülemediği için besine aşılana her bir larvanın olgun evreye ulaşmaya kadar günlük olarak takip edilmesi mümkün olamamıştır (Zalucki et al. 2002). Bu yüzden farklı evrelerdeki yaşama oranı tespit edilirken deney süresince yaşayan larva sayısı olarak, besine başlangıçta aşılana larvaların sayısı dikkate alındı.

### **3.6 MDA, PROTEİN KARBONİL MİKTARI VE GST AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ**

Farklı konsantrasyonlarda ksantotoksin içeren besinler ile yetiştirilen *G. mellonella* ergin bireylerdeki lipid peroksidasyon ürünü MDA ve protein oksidasyonu ürünü protein karbonil miktarları ve GST aktivitesi ölçüldü. Deneyler her bir tekrarda 10 adet yeni erginleşmiş birey kullanılarak dörder defa tekrarlandı. *G. mellonella* (L.) erginleri homojenizasyon tamponu [% 1,15’lik potasyum klorür (KCL) w/v, 25 mM dipotasyum hidrojen fosfat ( $K_2HPO_4$ ), 5 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 2 mM fenilmetilsülfonil florür (PMSF), 2 mM ditiyotreitöl (DTT), pH: 7,4] bulunan bir ependorf tüpe alındı. Muhtemel fenol oksidaz aktifliğini önlemek için tüplere birkaç feniltiyoyüre kristali konuldu. Erginler analiz yapılmaya kadar derin dondurucuda (-80 °C) saklandı.

### 3.6.1 Malondialdehid (MDA)

Jain ve Levine'in (1995) kullandığı metod temel alınarak 532 nm'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren lipid peroksidasyonun son ürünü MDA miktarı ölçüldü. Erginler % 1,15'lik KCl ile ultrasonik homojenizatör (10 sn, 30 W) (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) ile parçalandı. Homojenize edilen örnekler pH 7,4 olan fosfat tamponu (18 mM NaCl, 18 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,04 M butillenmiş hidroksi toluen (BHT), % 30'luk triklorasetik asit (TCA)] eklenerek 2 saat buzun içerisinde bekletildikten sonra 4 °C'de, 2000 x g devirde 15 dakika santrifüj edildi. Tüplerden alınan üst sıvıya 0,1 M EDTA ve % 1'lik TBA ilave edilerek kaynar su banyosunda 45 dakika bekletildi, daha sonra spektrofotometrede (Shimadzu 1700 UV/Vis, Kyoto, Japan) 532 nm'de absorbansı okundu. MDA miktarı  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  kat sayısı kullanılarak nmol/mg protein olarak verildi.

### 3.6.2 Protein Karbonil

Protein karbonil tayini Levine et al.'in (1994) metodu temel alınıp bir ölçüde değiştirilerek (Krishnan and Kodrik 2006) kuvvetli asit ortamda proteinlerdeki karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile oluşturdukları kararlı bileşik 2,4-dinitrofenilhidrazonun 370 nm'de miktarı ölçüldü. Örnekler, homojenizasyon tamponunda [% 1,15'lik potasyum klorür (KCL) w/v, 25 mM dipotasyum hidrojen fosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 5 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 2 mM fenilmetilsülfonil florür (PMSF), 2 mM ditiyotritol (DTT), pH: 7,4)] ultrasonik homojenizatör (10 sn, 30 W) (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) ile + 4 °C'de parçalandı. Elde edilen özüt + 4 °C'de 1000 x g'de 10 dk santrifüj (Hettich Zentrifugen, Mikro 200 R soğutmalı santrifüj) edildi. Üst sıvı alınıp % 10'luk streptomisin sülfat ilave edilerek + 37 °C'de 15 dk benmaride bekletildi. Daha sonra 8000 x g'de + 4 °C'de santrifüj edilerek nükleik asitler çöktürüldü. Üst sıvıdan 200 µl alınarak üzerine 800 µl 10 mM 2,4 dinitrofenilhidrazin (DNPH) eklendi. Oda ısısında bir saat veya benmaride + 37 °C'de 15 dk belirli aralıklar ile çalkalamak suretiyle beklendi. Daha sonra tüplere 700 µl % 20'lik trikloroasetik asit ilave edilerek buz üzerinde 10 dk bekletildikten sonra + 4 °C'de 10000 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Böylece oluşan 2,4-dinitrofenilhidrazon bileşikler çöktürüldü. Üst sıvı atılarak çöküntü üzerine 1:1 oranında 1 ml etanol:etil asetat karışımı ilave edildi ve vorteks ile yavaşça homojenize edildi. Bu işlem 3 defa tekrarlanıp her defasında 10000 x g'de + 4 °C'de santrifüj edilerek üst sıvı atıldı. En son santrifüjleme işleminden sonra çöküntü üzerine 2 ml 6 M guanidin hidroklorür ilave edilerek iyice + 37 °C'de 10 dk (oda

ısısında 45 dk) karıştırılmak suretiyle çöküntü çözüldü. Bu homojen çözeltilerden 150 µl alınarak toplam protein analizinde kullanıldı. Karışımın diğer bölümü çözünmeyen kaba partiküllerin çökmesi için 10000 x g'de 10 dk + 4 °C'de santrifüj edildi. Üst sıvının absorbansı 370 nm'de kör tüpe karşı spektrofotometrede (Shimadzu 1700 UV/Vis, Kyoto, Japan) okunarak protein karbonil miktarı 22,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> kat sayısı kullanılarak nmol/mg protein olarak verildi.

Protein karbonil analizi yapılan örneklerdeki toplam protein tayini için 6 M guanidin hidroklorür ile çözülen çöküntüden alınan 150 µl karışım 1350 µl guanidin hidroklorür ile 1:10 oranında sulandırıldı. Örneğin absorbansı 280 nm'de ölçüldü. 6 M guanidin hidroklorür ile hazırlanan Bovin serum albumin (BSA) standart çözeltileri (12,5-1600 mg/100ml) ile standart grafik oluşturularak toplam protein miktarı bu grafiğe göre hesaplandı.

### 3.6.3 Glutasyon S-transferaz (GST)

Örnekler +4 °C'de ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) (10 sn, 30 W) homojenize edildi. Enzim inaktivasyonunun önlenmesi için homojenizasyon dahil tüm işlemler buz ile sağlanan soğuk ortamda yapıldı. Homojenize edilen örnekler, +4 °C'de 16000 x g devirde soğutmalı santrifüjde 20 dakika santrifüj edildi. Çöküntü atılarak üst sıvılar GST aktivitesinin ölçümünde kullanıldı. GST aktivitesinin ölçümünde Habig et al. (1974) tarafından geliştirilen metod uygulandı. GST'nin bütün izozimleri için 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) yaygın bir substrattır. CDNB 340 nm'de yükselen absorbans gösteren glutasyon oksidasyonunu katalizleyen GST enzimi için substrat olarak kullanıldı. Bu enzimin aktivitesinin ölçülmesi için 3 ml'lik cam küvetlere 2,5 ml 50 mM fosfat tamponu, 200 µl 20 mM redükte glutasyon ve 150 µl süpernatant ilave edildi. Enzimatik reaksiyon bu karışıma 150 µl 25 mM CDNB eklenerek başlatıldı ve 2 dakika boyunca yükselen absorbanslar okundu. Yükselen absorbans CDNB'nin redükte glutasyon ile reaksiyona girerek tiyoether yapısının oluşumunu göstermektedir. Enzim aktivitesi 340 nm'de ( $\epsilon_{340}$ : 0,0096 µM.cm<sup>-1</sup>) süpernatantta bulunan 1 mg toplam protein başına 1 dakikada oluşturulan tiyoether miktarı olarak ölçüldü ve enzimin spesifik aktivitesi nmol/mg protein/dk olarak verildi.

(GST)

GSH + ksenobiyotik ----- ksenobiyotik – GSH konjugasyonu

Erginlerden elde edilen süpernatanttan enzimlerin spesifik aktifliğini hesaplamak ve MDA miktarını mg protein başına vermek için çözünür toplam protein tayini yapıldı. Bu amaçla örneklerin absorbansı spektrofotometrede 600 nm'de Folin-Lowry (Lowry et al. 1951) metoduna göre ölçülerek total protein miktarı tespit edildi. Bu hesaplamayı yapmak için öncelikle farklı konsantrasyonlarda standart protein olarak, bovin serum albumini (BSA) çözeltileri hazırlandı ve bir standart grafik oluşturuldu. Total protein miktarları bu standart grafiğe göre hesaplandı.

### **3.7 VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ksantotoksinin farklı konsantrasyonlarının *G. mellonella* (L.)'nin yaşama ve gelişimi üzerindeki etkileri olgun larva (7. evre), pup ve ergin evresine ulaşan bireylerin yüzdesi ve bu evrelere ulaşmak için geçen ortalama süre (gün) dikkate alınarak değerlendirildi. Ergin eşey oranına etkisi erginleşen erkek ve dişi bireylerin yüzdesi dikkate alınarak değerlendirildi. Ergin bireylerin ömür uzunluğu süresine etkisi erginleşen bireylerin hayatta kaldıkları gün olarak ortalama süre (ömür uzunluğu) belirlenerek değerlendirildi. Dişilerin verimliliği üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde ise bırakılan yumurta sayısı ve açılma oranı dikkate alındı. Farklı konsantrasyonlarda ksantotoksinin böceğin detoksifikasyon kapasitesine, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu düzeyi üzerine etkilerinin değerlendirilmesinde ise ergin bireylerde GST enzimi ile lipid peroksidasyonu ürünlerinden MDA ve protein oksidasyonu ürünlerinden protein karbonil miktarındaki değişimler dikkate alındı. Erginlerin ömür süresi ve dişilerin yumurta verimi ve yumurtaların açılma oranı, erginlerin tüm vücut MDA, protein karbonil miktarları ve GST aktivitesi ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü "Varyans Analizi" (ANOVA) (SPSS 1997), ortalamalar arasındaki farkın önemini saptamak için "LSD Testi" (SPSS 1997), yaşama ve eşey oranı ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde ise " $\chi^2$  (Chi square) Testi" (Snedecor and Cochran 1989) kullanıldı. Ortalamaların önemi 0,05 olasılık seviyesinde değerlendirildi.

## BÖLÜM 4

### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 4.1 KSANTOTOKSİNİN *G. MELLONELLA* LARVALARININ YAŞAMA, GELİŞME VE EŞEY ORANINA ETKİSİ

Ksantotoksin içermeyen kontrol besine göre ksantotoksinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler 7. evreye ulaşan larva oranını, pup ve ergin olma oranını önemli derecede düşürmüştür. Kontrol besininde %  $77,7 \pm 1,96$  oranında ergin edilmesine rağmen % 0,1 oranında ksantotoksin içeren besin bu oranı %  $11,0 \pm 0,00$ 'e indirmiştir. Ksantotoksinin bu besinsel oranı 7. evreye ve pup evresine ulaşmak için gereken süreyi ortalama 6 gün geciktirmesine rağmen kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir fark ortaya çıkmamıştır. Buna karşılık ksantotoksinin bu oranı ergin evreye ulaşma süresini ortalama 10 gün süre ile önemli derecede uzatmıştır. Ksantotoksinin % 0,005'lik konsantrasyonu, % 0,001'lik ksantotoksin konsantrasyonuna göre 7. evreye ulaşan larva oranını ve pup olma oranını istatistiksel olarak önemli olmayan derecede artırmış ancak denenen en yüksek ksantotoksin konsantrasyonu tekrar bu yaşama oranlarını düşürmüştür (Çizelge 4.1).

Ksantotoksin içermeyen kontrol besininden %  $77,7 \pm 1,96$  oranında ergin elde edilmiş olup bu erginlerin %  $50,0 \pm 0,00$ 'i erkek, %  $27,7 \pm 1,96$ 'sı dişidir. Ksantotoksinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler hem erkek hem de dişi birey oranını önemli derecede düşürmüşlerdir. Ksantotoksinin en yüksek konsantrasyonu olan % 0,1'ini içeren besin erkek ve dişi oranını %  $5,5 \pm 0,00$ 'e düşürmüştür (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Ksantotoksinin *G. mellonella* larvalarının yaşama, gelişme ve eşey oranına etkisi.

Ksantotoksin (%)	7.evreye ulaşan larva oranı (%)	7.evreye ulaşma süresi (gün)	Pup olma oranı (%)	Pup olma süresi (gün)	Ergin olma oranı (%)	Ergin olma süresi (gün)	Eşey oranı (%)	
	(Ort* ± S.H)†	(Ort* ± S.H)†	(Ort* ± S.H)†	(Ort* ± S.H)†	(Ort* ± S.H)†	(Ort* ± S.H)†	Erkek (Ort* ± S.H)†	Dişi (Ort* ± S.H)†
0,000 <sup>§</sup>	81,8 ± 2,30a	34,7 ± 2,45a	79,1 ± 3,01a	40,8 ± 2,38a	77,7 ± 1,96a	47,6 ± 2,49a	50,0 ± 0,00a	27,7 ± 1,96a
0,001	30,5 ± 3,08b	35,7 ± 2,09a	26,3 ± 3,59b	42,0 ± 2,73a	24,9 ± 4,15b	47,8 ± 3,15a	18,0 ± 3,01b	6,9 ± 1,21b
0,005	34,6 ± 1,21b	38,4 ± 2,31a	29,1 ± 1,16b	46,9 ± 2,53a	24,9 ± 3,09b	54,5 ± 3,42a	15,2 ± 4,10b	9,7 ± 1,21b
0,1	12,4 ± 1,21c	39,3 ± 3,59a	12,4 ± 1,21c	45,5 ± 3,76a	11,0 ± 0,00c	58,8 ± 2,27ab	5,5 ± 0,00bc	5,5 ± 0,00b

\* Dört tekrarın ortalaması, her bir tekrar için 20 larva kullanıldı.

† Aynı sütunda aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, P > 0,05 ( $\chi^2$  testi, LSD Testi).

§ Kontrol besini (Ksantotoksin içermeyen).

## 4.2 KSANTOTOKSİNİN *G. MELLONELLA*'NİN ÖMÜR UZUNLUĞU, YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANINA ETKİSİ

Ksantotoksin içermeyen kontrol besini ile karşılaştırıldığında ksantotoksinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler erkek erginlerin ömür uzunluğu üzerinde önemli derecede etkili olmamıştır. Ksantotoksinin % 0,001 ve 0,005'lik konsantrasyonları dişilerin ömür uzunluğunda kontrol grubuna göre kısaltmaya neden olsalarda bu etki istatistiksel olarak önemli olmamıştır. Ksantotoksinin denenen en yüksek konsantrasyonu (% 0,1) dişilerin ömür uzunluğunu  $10,4 \pm 0,43$  günden  $5,7 \pm 0,64$  güne önemli derecede kısaltmıştır. Ksantotoksinin bu konsantrasyonu erkek ömür uzunluğunu da ortalama 2,5 gün kısalttığı halde kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmamıştır. (Çizelge 4.2).

Ksantotoksin içermeyen kontrol besine göre, ksantotoksininin düşük konsantrasyonlarını (% 0,001 ve 0,005) içeren besinler bir günde dişi başına bırakılan yumurta sayısını istatistiksel bakımdan önemli olmayan derecede düşürmüştür. Kontrol besininden elde edilen dişilerden  $95,0 \pm 12,87$  yumurta elde edilmiş olup bu sayı % 0,001 ksantotoksin tarafından  $58,2 \pm 9,2$ 'e düşürülmüştür. Buna karşılık ksantotoksinin % 0,005'lik konsantrasyonu ile yetiştirilen dişilerin yumurta veriminde % 0,001'lik ksantotoksin konsantrasyonuna göre önemli olmayan bir artış (% 7) olmuştur. Ksantotoksinin bu iki konsantrasyonu yumurta açılımı üzerine etkili olmamıştır. Ksantotoksinin denenen en yüksek konsantrasyonu (% 0,1) yumurta verimini  $95,0 \pm 12,87$ 'den  $33,5 \pm 3,83$ 'e, açılma oranını ise  $82,7 \pm 3,70$ 'den  $35,6 \pm 3,00$ 'ya önemli derecede düşürmüştür (Çizelge 4.2).

Ksantotoksinin her bir konsantrasyonu için yumurta bırakmayı önleme indeksinin hesaplanması sonucunda düşük ksantotoksin konsantrasyonlarının kendi aralarında *G. mellonella* erginlerinin yumurta bırakma davranışı üzerinde etkili olmadıkları görülmüştür (sırasıyla YBİ = 0,24 ve 0,27). Buna karşılık kontrol ile karşılaştırıldığında, dişi başına bırakılan yumurta sayısı yalnızca en yüksek ksantotoksin konsantrasyonunda (% 0,1) önemli derecede düşmüştür. Bu en yüksek konsantrasyon ksantotoksininin düşük konsantrasyonlarına göre yumurta bırakma davranışı üzerinde yaklaşık yarıyarıya önleyici (YÖİ = 0,47) etki göstermiştir.

Çizelge 4.2 Ksantotoksinin *G. mellonella* larvalarının ergin ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranına etkisi.

Ksantotoksin (%)	Ergin ömür uzunluğu (gün)		Yumurta verimi (Yumurta sayısı/gün/dişi)	Açılma oranı (%)
	Erkek	Dişi		
	(Ort* ± S.H)†	(Ort* ± S.H)†	(Ort* ± S.H)†	Ort* ± S.H)†
0,00 <sup>§</sup>	8,5 ± 1,54a	10,4 ± 0,43a	95,0 ± 12,87a	82,7 ± 3,70a
0,001	8,3 ± 0,77a	8,0 ± 1,27a	58,2 ± 9,26ab	60,4 ± 13,80a
0,005	7,0 ± 1,08a	9,1 ± 0,99a	61,1 ± 14,98ab	59,2 ± 9,64a
0,1	6,0 ± 1,76a	5,7 ± 0,64ab	33,5 ± 3,83b	35,6 ± 3,00ab

\*Dört tekrarın ortalaması, her bir tekrar için 10 ergin kullanıldı.

† Aynı sütunda aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, P > 0,05 (LSD Testi).

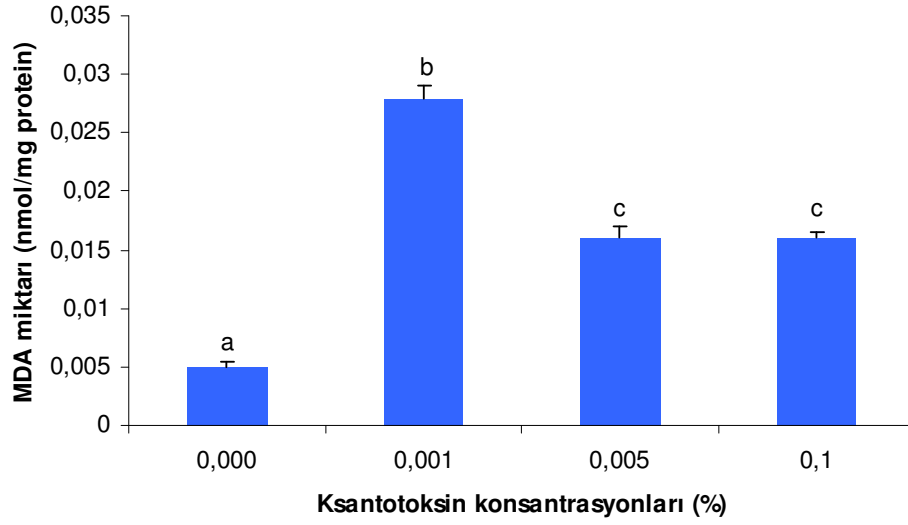
§ Kontrol besini (Ksantotoksin içermeyen).

#### 4.3 KSANTOTOKSİNİN *G. MELLONELLA* ERGİNLERİNDE MDA, PROTEİN KARBONİL MİKTARI VE GST AKTİVİTESİNE ETKİSİ

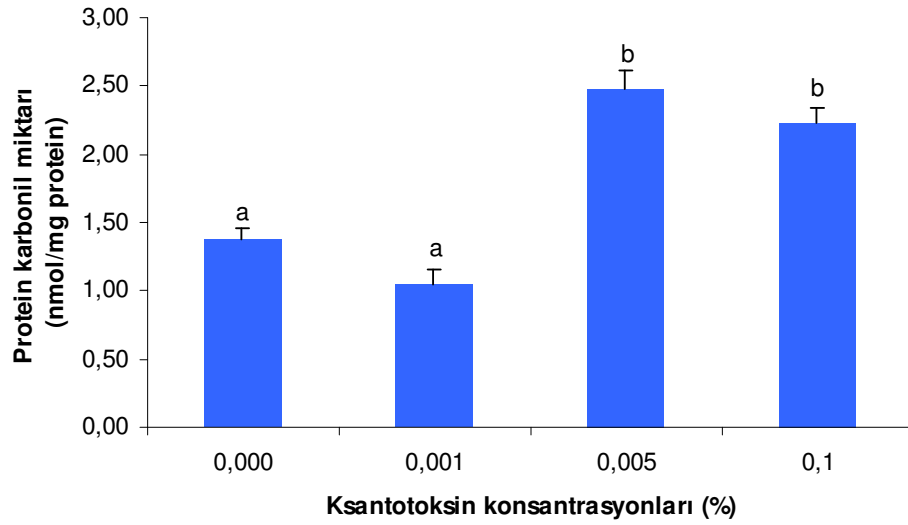
Ksantotoksin içermeyen kontrol besine göre ksantotoksinin denenen en düşük konsantrasyonu olan % 0,001'lik miktarı erginlerin MDA miktarını  $0,005 \pm 0,0005$ 'den  $0,028 \pm 0,001$  nmol/mg protein'e (yaklaşık 6 katı) yükseltmiştir. Diğer besinsel ksantotoksin konsantrasyonları (% 0,005 ve 0,1) % 0,001 ksantotoksin konsantrasyonuna göre MDA miktarında daha az artışa neden olmuştur. Ksantotoksinin bu yüksek konsantrasyonları MDA miktarını  $0,016 \pm 0,0005$  nmol/mg protein'e yükseltmiş olup kontrole göre ortalama 3 katı oranında artışa neden olmuşlardır (Şekil 4.3).

Kontrol besini ile yetiştirilen erginlerin protein karbonil miktarı  $1,380 \pm 0,082$  nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Kontrol besini ile karşılaştırıldığında ksantotoksinin denenen en düşük konsantrasyonu (% 0,001) protein karbonil miktarını  $1,052 \pm 0,099$  nmol/mg protein'e istatistiksel olarak önemli olmayan derecede düşürmüştür. Ksantotoksinin % 0,005 ve 0,1'lik konsantrasyonları ise protein karbonil miktarını kontrole göre yaklaşık iki katı önemli derecede artırmışlardır. Ksantotoksinin % 0,005'i protein karbonil miktarını  $2,475 \pm 0,137$  nmol/mg protein'e, % 0,1'i ise  $2,234 \pm 0,105$  nmol/mg protein'e yükseltmiştir (Şekil 4.3).

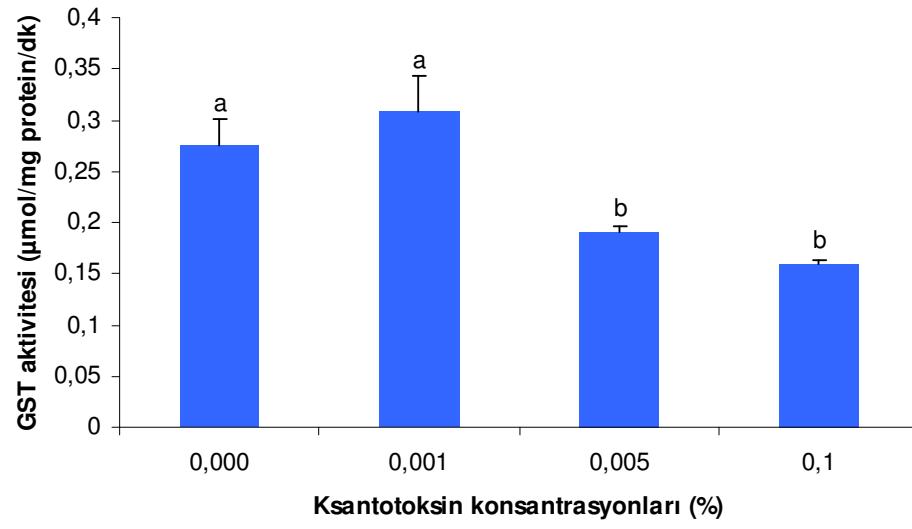
Ksantotoksin içermeyen kontrol besininde erginlerin GST aktivitesi  $0,276 \pm 0,025$   $\mu$ mol/mg protein/dk olarak bulunmuştur. Kontrol besini ile karşılaştırıldığında ksantotoksinin denenen en düşük konsantrasyonu (% 0,001) GST aktivitesi üzerinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir artışa sebep olmuştur. Buna karşılık, ksantotoksinin denenen yüksek konsantrasyonları (% 0,005 ve 0,1) ise GST aktivitesini kontrole göre önemli derecede düşürmüşlerdir. Ksantotoksinin en yüksek konsantrasyonunu içeren besin GST aktivitesini  $0,159 \pm 0,005$   $\mu$ mol/mg protein/dk'ya azaltmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.1 Ksantotoksinin *G. mellonella* erginlerinde MDA miktarına etkisi.



Şekil 4.2 Ksantotoksinin *G. mellonella* erginlerinde protein karbonil miktarına etkisi.



Şekil 4.3 Ksantotoksinin *G. mellonella* erginlerinde GST aktivitesine etkisi.



## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA

Ksantotoksinin böcekler üzerindeki patofizyolojik etkilerinin mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber bu bitkisel allelokimyasalın kuvvetli bir prooksidan olarak süperoksit radikallerinin oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Pritsos et al. 1990). Ksantotoksin ve diğer bazı furanokumarinler bazı böceklerin yaşama oranı ve gelişme süresini olumsuz yönde etkilemiştir (Chen 2008, Lampert et al. 2008).

Ksantotoksinin yüksek konsantrasyonları hem larval evrede hem de larva sonrası evrelerde *G. mellonella* (L.)'nın yaşama ve gelişmesi üzerinde olumsuz etki yapmıştır. Bu maddenin en yüksek konsantrasyonu (% 0,1) böceğin hem yaşama oranını hem de gelişme süresini olumsuz yönde etkilemiştir. Bu konsantrasyonu içeren besin ergin evreye ulaşma süresini yaklaşık 10 gün önemli derecede uzatmış olup kontrol besinindeki %  $77,7 \pm 1,96$  olan yaşama oranını %  $11,0 \pm 0,00$ 'e düşürmüştür. Ksantotoksinin bu konsantrasyonu dişilerin ömür uzunluğunu kısaltmış olup yumurta verimi ve açılma oranını önemli derecede düşürmüştür. Bu miktarı içeren besinlerden % 5,5 oranında erkek ve dişi ergin elde edilmiştir. Aynı türün farklı gelişim evrelerinde bile değişik fizyolojik koşullara gereksinim duyulduğu bilinmektedir (Grenier et al. 1986). Bu yüzden denenen ksantotoksinin etkisinin bu böceğin farklı gelişim evresine göre değişmesi de beklenen bir sonuçtur. Bunun yanında herhangi bir insektisit uygulama yöntemi, formülasyonu ve insektisit etkinliği de önemlidir (Appel et al. 2004).

Ksantotoksinin yüksek miktarlarını içeren besin, kontrol besinine göre *G. mellonella* (L.) erginlerinin MDA ve protein karbonil miktarını önemli derecede artırmıştır. Kontrol besine ksantotoksinin en düşük miktarının ilave edilmesi de oksidan etki göstermiş olup MDA seviyesinde kontrole göre önemli bir artışa sebep olurken protein karbonil miktarını önemli olmayan derecede düşürmüştür. Buna karşılık ksantotoksinin besinsel en düşük miktarı GST aktivitesinde önemli olmayan bir artışa sebep olmuştur.

Daha önceki bir çalışmada ksantotoksinin bu çalışmada kullanılan konsantrasyonları böceğin son evre larvalarının hemolenfinde MDA ve protein karbonil miktarları ile birlikte antioksidan enzimler SOD, CAT, GST ve GPx aktivitelerini önemli derecede artırmıştır (Büyükgüzel et al. 2010). Bu çalışma ile karşılaştırıldığında ksantotoksinin oksidatif etkisinin *G. mellonella* (L.)'nın gelişim evresine göre değişebileceği hatta farklı gelişim evresindeki bireyin dokularına göre de oksidatif etkinin farklılık gösterebileceği görülmüştür.

Besinle alınan ksantotoksinin *G. mellonella* (L.) larvaları üzerindeki toksitesinin yüksek olması larvaların besin ile aldığı ksantotoksinin sindirim fizyolojisini bozması sonucu olabilir. Benzer bir mekanizma, çeşitli besin ortamları ile uygulanan veya doğal yolla beslenen allelokimyasalların farklı böcekler üzerindeki olumsuz etkisi ile ilgili olarak da ileri sürülmüştür (Lee and Berenbaum 1990, Brown et al. 2005, Barbehenn et al. 2005 a,b, 2006, 2008). Daha önce bu konuda yapılan beslenme çalışmaları yapay besinlere ilave edilen ve besinsel değeri bulunmayan bir kimyasalın böcek üzerindeki etkisinin besin maddeleri ile etkileşimine bağlı olarak ortaya çıkabileceğini belirtmiştir. Bu çalışmalarda, fiziksel ve kimyasal düzeyde ortaya çıkan bu etkileşimlerin larvaların besin tüketim oranını değiştirebileceği ileri sürülmüştür (Büyükgüzel 2001).

Ksantotoksinin denenen besinsel karışımlarının hiç biri *G. mellonella* (L.) erkek erginlerinin ömür uzunluğu üzerinde istatistiksel olarak etkili olmamıştır. *G. mellonella* (L.)'nın ergin ömür uzunluğu mevsime (kış ve yaz ayları) göre değişmekte olup eşey oranları ise her mevsimde 1:1,1 (populasyon içi paylar %50:% 55) oranındadır (Chang and Hsieh 1992). Bu çalışmada erkek ve dişi bireylerin ömür uzunluğu ayrı ayrı ele alınmıştır. Kılınçer 'de (1976), yapmış olduğu çalışmasında belirli bir doğal konak ile yetiştirilen *Bracon hebetor* (Say, 1836) erginlerinden erkek bireylerin dişilere göre daha kısa yaşadığını, erkek bireylerin ömür uzunluğunun ortalama  $7,4 \pm 2,6$  (4-14) gün, dişi bireylerin ömür uzunluğunun ise ortalama  $19,7 \pm 2,6$  (10-30) gün olduğunu belirtmiştir. Bu sonuçlar, çalıştığımız böceğin Lepidoptera takımına ait bir tür olmasına rağmen elde ettiğimiz sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Ksantotoksinin en yüksek konsantrasyonu (% 0,1) ile beslenen *G. mellonella* (L.) dişileri daha kısa süre yaşamışlardır. Ksantotoksinin % 0,1'inde dişilerin erkeklere göre daha kısa yaşamaları dişilerin larval besin ile alınan yüksek konsantrasyonlarda ksantotoksine ergin sonrası hassas olduğunu göstermektedir. Bu görüş ksantotoksinin yüksek konsantrasyonları ile yetiştirilen dişilerin yumurta veriminin azalması ile destek bulmaktadır.

Bazı çalışmalarda çeşitli çevresel stres faktörlerine maruz kalan birkaç böcek türünün ömür uzunluğundaki artışın lipid peroksidasyonu düzeyinin düşmesi (Sestini et al. 1991) ve antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitelerinin yükselmesi (Bains et al. 1998, Sun et al. 2002) ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Ksantotoksinin en yüksek konsantrasyonunda *G. mellonella* (L.) erginlerinin MDA ve protein karbonil miktarında artış gözlenirken, dişi erginlerin ömür uzunluğu ise önemli derecede kısalmıştır. Antioksidan enzimler yüksek oksidatif stres durumunda oluşan reaktif moleküllere karşı hassas olduklarından (Pigeolet et al. 1990), ksantotoksinin yüksek konsantrasyonu tarafından üretilen serbest radikaller GST enziminde yapısal değişime sebep olarak enzimi inaktifleştirmiş olabilir. Elde edilen sonuçlar ksantotoksinin % 0,1'lik konsantrasyonunda ergin GST aktivitesi ile ergin ömür uzunluğu arasında doğru orantılı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu konsantrasyonda GST aktivitesi ve ergin ömür uzunluğunda azalma gözlenmiştir. *D. melanogaster* (Meign.)'de glutatyona bağımlı enzimlerin aktivitelerindeki artışın ömür uzunluğunda artışa neden olduğu ve oksidatif strese direncin arttığı gözlenmiştir (Sohal et al. 1995 a, Sun et al. 2002). Büyükgüzel (2006) organofosforlu insektisitlerin öldürücü olmayan dozlarına karşı bir tepki olarak *P. turionellae* (L.) erginlerinde SOD aktivitesinin ve ömür uzunluğunun arttığını göstermiştir. Elde edilen sonuçlar kısa yaşama süresinin ksantotoksinin öldürücü olmayan dozlarında ortaya çıkan aşırı oksidatif stresi önlemek için antioksidan enzim aktivitesinin yetersiz kalmasından ileri gelebileceğini göstermektedir. Buna karşılık, uzun süre fenitrotiyona maruz bırakılan lepidoptera takımına ait *S. exigua* (Hübner, 1808)'nin erginlerinde artan SOD aktivitesi ile birlikte yaşama oranının ve ömür uzunluğunun arttığı gözlenmiştir (Adamski et al. 2003). Aşırı oksidatif strese karşı antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerin sentezinin azalması durumunda, serbest radikaller, zarar vermek üzere hedef moleküllere saldırma fırsatı bulamayarak antioksidan enzimler ile karşılaşma ihtimalleri artabilir. Böylece oksidatif stresin olumsuz etkileri sonucu böceğin ömür uzunluğu kısalmıştır.

Bu çalışmada ksantotoksin ile yetiştirilen *G. mellonella* (L.) erginlerin ömür uzunluğunun tüm antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki değişimler ile ilişkisi incelenmemiştir. Daha önce yapılan bu çalışmaların sonuçları ve *G. mellonella* (L.) ile yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar birlikte ele alındığında oksidatif-antioksidatif tepki ile ilişkili olarak ömür uzunluğundaki değişim böceğin türü ile denenen oksidan maddenin türüne ve konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmektedir.

Ksantotoksin içeren besin ile beslenen larvalardan elde edilen erginlerin erkek ve dişi oranları önemli derecede azalmıştır. Dişi birey sayısının az olması bırakılan yumurta sayısının azalması sebebiyle zararlı böceklerin tarımsal alanlarda çoğalmasının sınırlanması ve sonraki döllerde bitkilere verilecek zararın azalması anlamına gelmektedir. Gülel (1988) bazı böceklerde eşey oranının fazlasıyla değişebildiğini belirtmiştir. Eşey oranındaki bu değişimler yumurta bırakan dişiye, erkek ve dişi larvalar arasındaki ölüm farkına, dişilerdeki çiftleşme sayısı gibi genetik olmayan faktörler yanında genetik faktörlere de bağlı olarak açıklanmaktadır.

İnsan veya diğer memelilerdeki erkek gamet ya da sperm hücreleri heterogametik olup iki tip eşey kromozomundan birini içerir. Bunlar X ve Y kromozomlarıdır. Lepidoptera takımına ait böcekler (güve ve kelebekler) ile yakın akraba olan Trichoptera takımına ait türler XX-XY eşey mekanizmasının aksine erkek eşeyin homogametik, dişi eşeyin ise heterogametik olduğu bilinmektedir. X yerine Z, Y yerine W harfi kullanılır. Buna göre erkekler ZZ, dişiler ZW gonozomlarını taşırlar (Traut et al. 2007). W kromozomu bir çok türde heterokromatiktir. Heterogametik eşey kromozomları içeren *Ephestia kuehniella* (Zell, 1879) ve *G. mellonella* (L.)'nin W kromozomunda da karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemi ile eşeyi tayin eden iki farklı bölge tespit edilmiştir (Sahara et al. 2003). Hamam böceği ve çekirgelerin dahil olduğu Ortoptera takımı ile Heteroptera takımının birçok türünde ise Y kromozomu tamamen ortadan kalkmıştır. Bu türlerde XX kromozomlarını taşıyan birey dişi, tek X kromozomu taşıyan birey ise erkek (X0) olmaktadır. Böylece XO bireyleri, *Drosophila*'dakinin aksine verimli erkeklerdir. X0 içeren *Drosophila* erkekleri ise kısırdır (De Falco et al. 2008).

Lepidoptera takımına ait türlerde kromozomal olarak genetik eşey belirlenmesinin dışında ekstrakromozomal şekilde dişi böcek tarafından yumurta aracılığıyla kalıtsal olarak nesilden nesile nakledilen *Wolbachia* cinsi bakteriler [*Wolbachia pipientis* (Hertig, 1936)] tarafından böceğin üreme şekli değiştirilmektedir. Bu türlerde *Wolbachia*'nın sitoplazmik enfeksiyonu sonucunda büyük oranda dişi birey oluşturulmaktadır. Bu mikroorganizma tarafından uyarılan aşırı dişi üretimi üç mekanizma ile gerçekleşmektedir (Kageyama et al. 1998). Mekanizmalardan birincisi, bu mikroorganizmaların partenogenezi uyararak büyük oranda dişi birey oluşumunu sağlaması, ikincisi, erken evrelerde seçici olarak erkeklerin ölümü (male killing) ve üçüncüsü ise erkeklerin genetik olarak dişileştirilmesidir. Dişi böcek tarafından kalıtsal olarak dölden döl geçirilen *Wolbachia* ile enfekte olan tamamen dişi döl meydana

getiren *Ostrinia scapularis* (Walker, 1859) dişileri tetrasiklin ve diğer bazı antibiyotikler ile birkaç nesil beslendiğinde eşey oranı erkek birey lehine değişmiştir (Kageyama et al. 2003).

Lepidoptera takımına ait türlerin çoğunluğu dişi eşey yönelimli döl vermesine rağmen en az 11 türün yabancı tipleri yalnızca dişi döl vermektedir (Ishihara 1992). Apollo kelebeği *Parnassius apollo* (Linnaeus, 1758)'nun yabancı tipi ise ağırlıklı bir şekilde erkek yönelimli döl vermekte olup eşey oranı 2:1 oranına oldukça yakındır (Pawel 2004). Eşey oranı genellikle populasyon yoğunluğuna göre de değişmektedir. Kelebek türü *Bolora aquilonaris* (Stichel, 1908) (Lepidoptera: Nymphalidae) erkekleri uçuş döneminin başlangıcında oldukça fazla iken dişiler bu periyodun sonuna doğru artmaktadır. Populasyon içerisindeki erkeklerin oranı populasyonun yoğunluğu azaldığında yükselme eğilimindedir (Gorbach 1998). Yaklaşık 1000 türü içine alan keseli kurt (bagworm) ailesinden (Lepidoptera: Psychidae) laboratuvarda yetiştirilen türlerde erkek yönelimli eşey oranı elde edilmektedir (Rhainds et al. 2009). Bu türlerin tarla populasyonlarında erkek birey oranı dişi oranına göre daha fazla, daha düşük ya da eşit yoğunluktadır. Ancak dişi larvaların erkeklerden daha fazla beslenmeye ihtiyaç duyması ve besin bakımından tür içi rekabete daha hassas olması sebebiyle populasyonun yoğunluğu genellikle erkek yönelimli eşey oranı ile ilişkilidir. Kır tırtılı güvesinin birkaç yıl boyunca düşük ve yoğun olduğu üç bölgeden toplanan yumurtalardan açılan larvaların laboratuvarda beslenilmesi sonucunda eşey oranı yumurtaların toplandığı populasyonun yoğunluğuna göre değişmiştir. Düşük yoğunluklu bölgeden toplanan yumurtalar yüksek yoğunluklu bölgeden toplanan yumurtalara göre daha fazla sayıda dişi birey oluşturduğu rapor edilmiştir (Myers et al. 1998). *Heliothis armigera* (Hübner, 1805)'da cinsiyet oranı (dişi:erkek) pupalarda ortalama 1,00:1,07, dişi ve erkeklerin populasyon içindeki payları ise sırasıyla % 48,3 ve % 51,7, erginler üzerindeki cinsiyet oranı ise ortalama 1,00-1,08, dişi ve erkeklerin populasyon içindeki payları ise % 47,9 ve % 52,1 olarak bulunmuştur (Kaya ve Kovancı 2000). Bu çalışmada ayrıca cinsiyet oranının yıllara göre, tarla ve laboratuvar populasyonuna göre değiştiğini, sonuç olarak cinsiyet oranının erkekler lehine olduğu, erkeklerin populasyondaki paylarının dişilere oranla biraz daha fazla olduğu belirtilmiştir. Yaprak delici kurdu *Perthida glyphopa* (Common, 1969) dişileri haziran ve eylül süresince yapraklar ile beslenme safhasında baskın olup eşey oranı 0,74:1,00 (erkek:dişi)'dir. Eylül ayının sonlarına doğru toprakta diyapoza giren larvaların eşey oranı 1,47:1,00, martta pupaların cinsiyet oranı 1,30:1,00 ve nisan-mayıs aylarında ise erginlerin eşey oranı 1,56:1,00 olarak erkek lehine artmıştır (Mazanec 2007). Tüm bu çalışmalardan anlaşıldığı gibi lepidoptera takımına ait böceklerin eşey oranı çok değişik faktörlerin etkisi altındadır.

Ksantotoksinin bazı konsantrasyonlarını içeren besinlerde *G. mellonella* (L.)'nın erkek eşey oranı aynı besindeki dişi eşey oranına göre artış göstermesine rağmen istatistiksel olarak önemli bir artış olmadığı görülmektedir. Genelde denenen ksantotoksin konsantrasyonlarının tümü kontrol ile karşılaştırıldığında erkek ve dişi eşey oranını önemli derecede düşürmüştür. Ancak ksantotoksinin eşey oranı üzerindeki muhtemel etkisini ortaya çıkarmaya yönelik daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Ksantotoksinin en yüksek miktarını (% 0,1) içeren besin dişilerin yumurta verimini ve yumurtaların açılma oranını olumsuz yönde etkilemiştir. Bu miktarları içeren besinde yetiştirilen dişilerin yumurta veriminde önemli bir azalma olmuş, bırakılan yumurtaların büyük bir çoğunluğunun embriyonik gelişimi tamamlayamadığı ve normal olarak açılmadığı görülmüştür. Böceklerin çoğunun kısa zaman aralıklarında çok sayıda yumurta bırakması yani üremelerinin çok hızlı olması bunlarla etkili mücadeleyi zorunlu hale getirmiştir. Örneğin baklagillere (Leguminosae) çok zarar veren bir tür olan *Nezera viridula* (Linnaeus, 1758) (Pentatomidae: Heteroptera) dişisinin bir defada 100 civarında yumurta bırakması bu konunun önemini ortaya koymaktadır (Candan 1997). Ekonomik olarak zarara sebep olan böceklerin yumurta sayısının azalması ve bu yumurtaların canlılık oranının düşük olması böceklerin kontrolünde önemlidir. Bazı çalışmalar çeşitli bitki allelokimyasallarının lepidoptera ve diğer takımlara ait zararlı türlerin yumurta üretimini çoğunlukla olumsuz yönde etkilediğini ortaya çıkarmıştır. Kimyasal mücadelede kullanılan bazı sentetik organik insektisitlerin heteropter böceklerden *Pyrrhocoris apterus* (Linnaeus, 1758)'da ve *Dysdercus cingulatus* (Fabricius, 1775)'da ovaryum ve folikül hücrelerinin yapısının bozulmasına, embriyo gelişimi için önemli olan vitellin proteininin sentezinin önlenmesine bağlı olarak embriyonik gelişimin gerilemesine sebep olmuştur (Slāma et al. 1983, Gelbič and Holy 1985, Šula et al. 1987, Socha et al. 1988). Bazı kimyasallar çeşitli böceklerde ovaryumlardaki yumurta verimini juvenil hormon (JH) titresini değiştirmek suretiyle etkilemektedir (Šula et al. 1987). JH ve ovaryum ekdisteroidleri yumurta hücresinin büyümesini, vitellus sentezi ve oluşumu, embriyo gelişimini düzenlemektedir (Gäde and Hoffmann 2005). Bu çalışmada ksantotoksinin besinsel karışımlarının *G. mellonella* (L.)'da merkezi sinir sistemini etkileyerek bu hormonların işlevinde önemli değişikliklere sebep olabilir. Diğer taraftan, bazı nükleozit türevi sentetik insektisitler *Pyrrhocoris apterus* (Linnaeus, 1758)'da hemolenf, yağ doku ve ovaryumdaki protein içeriğinde önemli değişikliğe sebep olmuş, yumurta oluşumunu tamamen önlemiştir (Gelbič and Šula 1990).

Birçok böcekte yumurta bırakma davranışının başlaması için ovaryumun gelişimi, yumurta üretimi ve olgunlaşmasına ihtiyaç duyulur. Ovaryumların gelişmesi ve yumurta hücrelerinin büyümesi vitellin proteininin sentezi sayesinde olup bunların hepsi hormonal kontrol altındadır (Engelman 1979, Zeng et al. 2000). Diğer taraftan yumurta bırakma davranışı çevresel sinir sisteminden daha çok merkezi sinir sistemi tarafından yönetilen ve hormonal seviyede gerçekleştirilen karmaşık bir aktivitedir (Loher et al. 1984). Bu yüzden *G. mellonella* (L.)'ya besinle verilen ksantotoksinin metabolizması sonucu oluşan ara ürünlerinin doğrudan hemolenfe karışarak kısa bir süre içinde yumurta üretimi, olgunlaşması, bırakımı ve bu yumurtaların açılması gibi fizyolojik davranışları olumsuz yönde etkilemesi beklenen durumdur. Larval besinle alınan ksantotoksinin ergin dişilerin yumurta verimi ve açılma oranı üzerindeki olumsuz etkisi yumurta üretimi ile ilgili organlarda ve üretilen yumurtalardaki embriyonal gelişim sırasında oksidatif hasarın artması sonucu olabilir. Bazı omurgalı türlerinde yumurta açılımının oksidatif stresin artışı ile ters orantılı olduğu bilinmektedir (Alonso-Álvarez et al. 2010).

Ksantotoksinin besindeki miktarının artışı ile böcek üzerindeki etkisi arasında orantılı bir ilişki ortaya çıkmamıştır. Örneğin ksantotoksinin % 0,005'lik konsantrasyonu bu prooksidanın en düşük miktarına göre böceğin 7. evreye ulaşan larva oranı ile pup olma oranını istatistiksel olarak önemli olmayan derecede artırmıştır. Ancak, ksantotoksinin en yüksek konsantrasyonu bu evrelerdeki yaşama oranını, diğer ksantotoksin konsantrasyonlarına ve kontrole göre önemli derecede düşürmüştür. Böceğin ömür uzunluğu, yumurta sayısı, erginlerdeki MDA, protein karbonil miktarları ve GST aktivitesinde de benzer sonuçlar gözlenmiştir. Lepidoptera takımına ait bir tür olan *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758)'nin besinine ilave edilen fenolik bir glikozitin böceğin gelişme süresi ve büyüme oranı gibi bazı biyolojik özellikleri ile detoksifikasyon enzimleri üzerine etkisi bu glikozitin besindeki artan konsantrasyonları ile uyumlu bir değişim göstermemiştir. Bu böcekteki GST ve esteraz enzimi besine ilave edilen glikozitin düşük miktarları ile artarken yüksek miktarları bu enzimlerin aktivitelerini düşürmüştür (Hemming and Lindroth 2000). Benzer bir sonuç holometabol böceklerden Diptera takımına ait bir tür olan *Agria affinis* (Fallen, 1817) ve hymenoptera takımına ait *P. turionellae* (L.) larvalarını beslemek için kullanılan kimyasal yapısı bilinen yapay besine ilave edilen bazı antibiyotikler ile de elde edilmiştir (Singh and House 1970 a, Büyükgüzel and Yazgan 2002). Tam başkalaşım geçiren (holometabol) böceklerde besin maddelerinin sindirimi genellikle alkali bir ortama sahip olan orta bağırsakta gerçekleştirilmektedir (Terra 1990). Besinle alınan ksantotoksin miktarlarının *G. mellonella* (L.)'nın orta bağırsağında

ozmotik dengeyi ve ortamın reaksiyonunu (pH) etkilemesi sonucu farklı oranlarda emilimi gerçekleştirebilir. Böylece denenen miktarların böcek üzerindeki etkisi de farklı olabilir. Lepidoptera takımına ait böceklerde besinsel maddelerin ve bitkisel allelokimyasalların sindirim kanalında (özellikle orta bağırsak) emilme oranlarının bunların bağırsaktaki miktarlarına, ortamın ozmotik ve iyonik dengesine ve indirgenme-yükseltgenme potansiyeline bağlı olduğu bilinmektedir (Krishnan and Kodrik 2006). Fitofaj böceklerde ortabağırsaktaki pH ve redoks düzeyi bitkisel allelokimyasallarının metabolizmasını etkileyerek sindirilen bitkinin toksik özelliğini veya besinsel kalitesini büyük oranda değiştirmektedir (Appel and Martin 1990, Appel 1993, 1994). Kinon ve fenolik maddeler gibi birçok bitkisel allelokimyasallar oksitlendiğinde toksik kinonlar veya süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri veya hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri oluşturabilmekte ve bu ürünler doğrudan orta bağırsak epiteline zarar vererek böceklerde oksidatif stresi uyarmaktadır (Pritsos et al. 1991, Ahmad 1992, Felton and Summers 1993, Summers and Felton 1994, Bi and Felton 1995). Ayrıca reaktif oksidatif ürünler nükleofilik bölgeleri alkilleyerek, lizin amino asiti içeriğini azaltarak ve proteinin parçalanmasına ve polimerizasyonuna sebep olarak böceklerin besinindeki proteinin kalitesini düşürebilir (Felton et al. 1989, 1992, Felton and Summers 1993, Bi et al. 1994). Böyle oksidasyon reaksiyonları pH ve redoks potansiyeli ile güçlü olarak etkilenebileceğinden böcek ortabağırsağının fizikokimyasal özelliklerindeki değişiklikler bitkilerin böceklere karşı oksidatif kimyasal savunmasının derecesini belirtebilir (Appel 1994). Diğer taraftan *G. mellonella* (L.) larvalarının bağırsağından emilerek dokulara yayılan ksantotoksinin metabolizma ürünlerinin olumsuz etkisi detoksifikasyon enzimleri tarafından devamlı olarak ortadan kaldırılabilir. Diğer bir ifade ile denenen bu maddenin düşük konsantrasyonlarda *G. mellonella* (L.)'nın en azından gelişme süresi, ergin ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranı üzerinde olumsuz etkilerinin düşük olması böceğin detoksifikasyon veya antioksidan enzimleri sayesinde bu zararlı ürünleri ortadan kaldırmaları sonucu olabilir. Alman hamam böceği *Blattella germanica* (Linnaeus, 1767)'da insektisitlerin düşük konsantrasyonlarına karşı detoksifikasyon enzimi sitokrom P450 monooksijenaz miktarında artış olduğunun tespit edilmesi ile bu düşünce önem kazanmıştır (Scharf et al. 1999). Bizim çalışmamızda, ksantotoksinin düşük miktarları ile beslenen *G. mellonella* (L.) erginlerinin GST enziminde istatistiksel olarak önemli olmasa da bir yükseliş gözlenmiştir. Liu ve Chen (2000) bir kitin sentezi inhibitörü olan buprofezinin nöroptera takımına ait bir tür *Chrysoperla rufilabris* (Burmeister, 1839) 'in larval evresindeki olumsuz etkisinin çok az olmasını böceğin güçlü antioksidan kapasitesine bağlamıştır.

Besine ilave edilen yüksek miktarlardaki ksantotoksinin böceğin yaşama ve gelişimi üzerindeki olumsuz etkileri bu maddenin beslenme ortamının besinsel kalitesini ve fiziksel yapısını değiştirmesinden de ileri gelebilir. Daha önceki çalışmalar herhangi bir besinsel değeri olmayan bir katkı maddesinin öldürücü olmayan (subletal) etkilerinin bu maddenin besinsel bileşenler ile etkileşimine dayanarak larvaların besin tüketim oranını değiştirmesine bağlı olduğunu belirtmiştir (Büyükgüzel and İçen 2004, Büyükgüzel and Kalender 2007). Bir antibiyotik insektisit olarak denenen novobiyosinin yüksek miktarları ile beslenen endoparasitoid bir hymenopter tür *P. turionellae* (L.) larvalarının yaşama ve gelişimi de olumsuz yönde etkilenirken bu maddenin denenen en düşük miktarı böceğin yaşama oranını önemli derecede artırmıştır (Büyükgüzel 2001). Singh ve House (1970 a,b,c) besine ilave edilen antimikrobiyal maddelerin meydana getirdiği koku ve tat değişikliğinin larvaların besin tüketimi oranının değişiminde etkili olduğunu belirtmiştir. Delgarde ve Rouland-Lefevre (2002) nikotin benzeri bir insektisit olan tiyometoksam'ın bazı termit türleri, *Trinervitermes trinervius* (Rambur, 1842) ve *Odontotermes smeathmani* (Fuller), *Amitermes evuncifer* (Silvestri) 'e karşı besin almayı önleyici etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Larval evrede alınan besin maddelerinin kalitesi ve besinsel dengesi birçok böceğin üreme ve ömür uzunluğu üzerinde etkilidir (Slansky and Scriber 1985, Eischen and Dietz 1987, Ridgway and Mahr 1990). Akdeniz meyve sineği *C. capitata* (Wiedemann, 1824)'nın larval evrede aldığı besinin ergin oluşumu, vücut büyüklüğü, eşeyssel olgunluğu, yumurta bırakma davranışı ve yaşama süresini etkilediği bilinmektedir (Chang et al. 2001).

Belirtilen bu çalışmalardan anlaşıldığı gibi ksantotoksin (Lee and Berenbaum 1990, Timmermann et al. 1999) veya diğer bitkisel allelokimyasalların Lepidoptera takımına ait bazı böcekler ile diğer takımlara ait bazı böceklerin orta bağırsak ve genelde sindirim dokuları üzerine oksidatif etkileri detaylı çalışılmıştır (Peric-Mataruga et al. 1997, Barbehenn 2002, Krishnan and Kodrik 2006). Bu çalışmada böceklerin orta bağırsağında oksidatif strese kaynaklanan oksidatif hasarın stresin önemli nedeninin süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) radikallerinden ileri geldiği belirtilmiştir (Peric-Mataruga et al. 1997, Büyükgüzel et al. 2007). Süperoksit oluşumunu katalizleyen çeşitli maddeler ile maruz bırakılan Lepidoptera takımına ait bazı böceklerde SOD, CAT ve GPx enzimlerinin önemli derecede yükseldiği belirtilmiştir (Pritros et al. 1988, 1990). Buna karşılık bu bitki allelokimyasallarının erginlerdeki oksidatif etkileri ile antioksidatif veya detoksifikasyon kapasitesi üzerine etkileri çalışılmamıştır. Besine çeşitli amaçlarla ilave edilen kimyasal maddelerin böcek üzerindeki etkilerinin tespit edilmesi için farklı evrelerdeki toplam vücut bileşenlerinin biyokimyasal

analizlerinin yapılması ve fizyolojik değişimlerin ortaya konulması önemli kriterlerdir (Ferkovich et al. 1999, Wang et al. 2002, Zapata et al. 2005). Bu çalışmada kullanılan ksantotoksinin besine ilave edilen miktarları genel olarak erginlerin lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu düzeyi ve GST aktivitesini etkilemiştir. Aynı zamanda besin kalitesinin düşük olması böceklerde birçok fizyolojik ve davranışsal değişime sebep olur (Slansky and Scriber 1985). Çeşitli toksinlere maruz kalarak besinsel değeri azalmış doğal besin ile beslenen predatör bir örümcek türü *Pardosa prativaga* (L. Koch, 1870)'da GST enziminin aktivitesi oldukça düşük bulunmuştur (Nielsen and Toft 2002). Böceklerin serbest radikallerden ve genel oksidatif stresten etkilendiği bilinmektedir (Timmermann et al. 1999). Böcekleri yetiştirmek için kullanılan yapay besinlerin besin bileşenleri kendi aralarında ve besine ilave edilen madde ile etkileşerek endojen ve eksojen kaynaklı reaktif oksijen türevlerinin (ROT) oluşmasına sebep olurlar. Besinlerde oluşan serbest radikaller toksitenin artmasına bağlı olarak larvaların besin tüketim oranını değiştirmektedir (Cohen and Crittenden 2004).

Canlıların kimyasal maddeler veya çevre kirliliğine neden olan maddeler gibi çeşitli yabancı maddelerin etkileri altında kalmaları, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna ve dolayısıyla da metabolik olayların bozulmasına neden olur. Serbest oksijen radikalleri sahip oldukları paylaşılmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktif atom ve moleküllerdir. Bu radikaller hücre zarının doymamış yağ asitleri ve protein bileşimi üzerine zarar vermektedir. (Halliwell 1994, Heinle and Betz 1994). Oluşan serbest radikaller sonucu hücre zarının ve diğer hücresel lipid ve proteinlerin yapısının bozulmasıyla bir dizi reaksiyon gerçekleşir ve sonuçta aldehit türevleri özellikle MDA ile protein karbonil ürünleri oluşur. MDA miktarının yükselmesi lipid peroksidasyonu seviyesinin önemli bir göstergesidir (Mano et al. 1995). Çeşitli kimyasal ve biyolojik ajanların bazı böceklerin hücre kültürü hatlarında lipid hidroperoksit ve protein karbonil miktarlarını artırdığı ve oksidan strese sebep olduğuna yönelik çalışmalar mevcuttur (Wang et al. 2001). Bu çalışmada, lipid peroksidasyonunun önemli bir belirteci olan MDA seviyesi ksantotoksinin *G. mellonella* (L.) larvaları için belirlenen konsantrasyonları ile larvalar beslendikten sonra erginlerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede artış göstermiştir. MDA miktarının artması, besin ile alınan prooksidana (ksantotoksin) bağlı olarak reaktif oksijen radikallerinin üretiminin oluşması ve buna bağlı olarak da lipid peroksidasyonun artmasından kaynaklanabilir. Ksantotoksin uygulanan erginlerde protein oksidasyonunun daha fazla arttığı görülmüştür.

Böceklerde insektisitlerin toksik etkisini azaltıcı ve hatta yok edici direnç mekanizmaları gelişmiştir. Fizyolojik strese karşı dirençte etkili olduğu bilinen önemli enzim grubu GST 'dır (Yu 2004). Böceklerde bu enzim ailesi (teta sınıfı) insektisitlerin toksik etkilerine karşı temel bir savunma olarak bilinir. GST bir faz II detoksifikasyon enzimi olup ksenobiyotikleri glutatona (GSH,  $\gamma$ -glutamil-sisteinil-glisin) bağlayarak toksitesini azaltır. Erginlerde ksantotoksinin en düşük miktarına karşı GST aktivitesindeki bazal seviyenin yükselişi lipid peroksidasyonu sonucu artan MDA miktarından kaynaklanan oksidatif stresten ileri gelebilir. İndirgenmiş (redükte) glutasyon (GSH) miktarının düşmesi ile paralel olarak bu enzimin aktivitesi artmış olabilir. GSH bu enzimin kofaktörü olup bazı organik ve inorganik peroksitlerin ve diğer serbest radikallerin konjuge edilerek zararlı etkisinin ortadan kaldırılmasında kullanılır (Dandapat et al. 2003). Ksantotoksinin en düşük konsantrasyonunda *G. mellonella* (L.) erginlerinde GST aktivitesinin artması, ksantotoksinin toksitesine ve serbest radikal üretiminin kaçınılmaz bir sonucu olan lipid peroksidasyon seviyesinin yükselmesine karşı böceğin metabolik bir adaptasyon göstermesinin sonucu olabileceği düşünülmektedir. Yüksek GST aktiviteleri ergin dokularında lipid hidroperoksitleri, protein karbonilleri ve diğer reaktif oksijen türlerini uzaklaştırabilir. Hücresel antioksidan savunma sistemi artan lipid peroksitleri ve reaktif oksijen türlerini uzaklaştıramayacak şekilde zayıfladığında hücresel hasar ortaya çıkmaktadır. Yani artan lipid peroksidasyon düzeyine bağlı olarak sitozolik bileşenlerin dağılması ve sonuçta hücre ölümüne sebep olacak düzeyde hücre zarı lipidlerinde bozulma görülebilir (Büyüküzet et al. 2007).

Lepidoptera takımına ait böceklerin larvaları çeşitli oksidan maddelerle beslendiği zaman orta bağırsaklarında peroksit radikalleri başta olmak üzere çeşitli ROT'lar oluşmaktadır. Bu peroksitler ya besinle alınan veya besin kanalında daha önceden bulunan demir gibi çeşitli aktif metal iyonları ile etkileşerek (Fenton reaksiyonu) OH $\cdot$  ve diğer ROT'ları oluşturabilir (Barbehenn et al. 2005 b). Bu reaktif türevler orta bağırsak epitel dokusunda ve peritrofik zarda protein ve lipid oksidasyonuna bağlı oksidatif hasar meydana getirmektedir (Barbehenn and Stannard 2004). Denenen ksantotoksinin yüksek konsantrasyonlarını içeren besinler ile beslenen böceğin erginlerindeki GST aktivitesindeki düşüş, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu sonucu oksidatif hasarın artmasından kaynaklanabilir. Aşırı serbest radikal oluşumuna bağlı olarak GST enzim aktivitesinde bir azalma meydana geldiği düşünülmektedir. Ksantotoksinin toksitesi sonucunda serbest radikal oluşumunun artışı ile erginlerin GST enzimi aktivitesinin düşmesi bu enzimlerin serbest radikaller tarafından inaktive edilmesinden kaynaklanabilir. Artan serbest radikaller bu enzimin substratı olan

glutatyon ile veya enzim yapısındaki aktif aminoasitlerle etkileşerek enzimlerin aktivitesini düşürmüş olabilir (Saraswathy et al. 1998). Ksantotoksinin, *G. mellonella* (L.) erginlerinde MDA ve protein karbonil düzeyini artırırken ters orantılı olarak GST aktivitesini düşürmesi bu yorumu desteklemektedir.

GST enziminin önemli derecede düşüş göstermesi erginlerin ksantotoksinin oluşturduğu serbest radikalleri ortadan kaldırmaya yönelik bir savunma mekanizmasından ileri gelebilir. Böyle bir savunma mekanizması sonucunda enzim serbest radikallerin ve lipid hidroperoksitlerin zararlı etkisine maruz kalmış olabilir. *G. mellonella* (L.) erginlerinde ksantotoksine karşı böyle bir mekanizmayla tolerans geliştirilmiş olabilir. Besin ile alınan ksantotoksin ve bunun böceklerdeki ara metabolizma ürünleri lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu meydana getirebilecek derecede güçlü bir etkiye sahip olabilir. Bu nedenle GST enziminin ROT ve diğer organik hidroperoksitlerin zararlı etkilerini yok etmek için bir dereceye kadar aktivitesi yükselmiş daha sonra aşırı oksidatif stres karşısında kendisi de zarar görmüş olabilir (Halliwell and Gutteridge 1999). Besinsel kalitesi düşük olan doğal besinlerle beslenen bir lepidopter tür *Lymantria dispar* (Linnaeus,1758)'ın orta bağırsağında antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığı ve bu enzim aktivitesindeki artışın farklı larval evrelere bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir (Peric-Mataruga et al. 1997). Benzer sonuçlar farklı prooksidanlara maruz kalan *M. domestica* (L.), *T. ni* (Hubn.), *Spodoptera eridania* (Stoll) gibi çeşitli böcek türlerinin farklı gelişme evrelerinde de gözlenmiştir (Ahmad and Pardini 1990 b, Zaman et al. 1994, Ahmad et al. 1995).

Antioksidan veya detoksifikasyon enzimlerinin aktivitelerinin genellikle türe, gelişme evresine ve dokuya özgü olarak değiştiği gözlenmiştir (Ahmad and Pardini 1990 a, Ahmad et al. 1995). *G. mellonella* (L.)'nın erginlerinde denenen ksantotoksinin etkisi farklı şekilde ortaya çıkmıştır. Ksantotoksinin yüksek konsantrasyonları genellikle erginlerde MDA ve protein karbonil miktarını artırırken GST aktivitesini düşürmüştür. Bu değişimin konsantrasyona bağlı bir şekilde ortaya çıkmadığı görülmektedir. Bu sonuçlar denenen ksantotoksinin lipid peroksidasyonuna sebep olması sonucu artan oksidatif strese bağlı olarak etkili olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada larva sonrası evrelerdeki enzim aktivitelerinin değişimleri incelenmemiştir. Ancak ksantotoksinin pup ve ergin evrelerdeki yaşama ve gelişme üzerindeki etkilerinin de farklı olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar ksantotoksinin prooksidan etkisinin ve böceğin antioksidan savunma sisteminin evrelere göre değişebileceğini işaret etmektedir. Çeşitli insektisitlere maruz kalmış pamuk kurdu *Heliothis*

*armigera* (Hübner, 1805) 'daki detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesinin larval ve ergin evreye göre değiştiği bilinmektedir (Leonova and Slynko 1996). Bu sebeple ksantotoksinin ergin öncesi evrelerdeki antioksidan veya detoksifikasyon savunma sistemine etkisini belirlemek amacıyla detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Diğer ökaryotik organizmalar gibi böcekler de oksidatif radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için antioksidan enzim sistemine sahiptir (Ahmad 1992). Böceklerin düşük moleküler ağırlığa sahip antioksidanlar, peritrofik zar ve çeşitli antioksidan enzimlerden oluşan dokuya özgü bir antioksidatif savunma mekanizmasına sahiptir (Ahmad 1992, Felton and Summers 1995, Barbehenn and Stannard 2004). Böceklerde başlıca bulunan antioksidan enzimler SOD, CAT, GPx, GST ve APOX'dır (Ahmad 1995). Bu çalışmada ksantotoksin ile beslenen erginlerin glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz ve GST'nin peroksidaz aktifliği (GSTPx) gibi glutatyonu bağımlı diğer antioksidan enzimlerin aktiflikleri ile SOD, CAT aktivitelerindeki değişimler incelenmemiştir. Ancak *G. mellonella*'da ksantotoksine karşı gösterilen toleransta bu enzimlerin rolü kaçınılmazdır. GR oksitlenmiş glutatyonu indirgenmiş formuna dönüştürürken, GPx oksidatif stres sonucu oluşan toksik hidroperoksitleri indirger. Bu özelliklerinden dolayı GPx ve GR birbirini tamamlayıcı enzim çifti olarak iş görür. Lepidoptera takımına ait türler *Trichoplusia ni* (Hubn.), *Papilio polyxenes* (Fabr.), *Spodoptera eridania* (Stoll) gibi herbivor böcekler, memelilerle karşılaştırıldığında (Ahmad et al. 1987, 1988, Pritsos et al. 1988) çok düşük GPx aktivitesine sahip oldukları gösterilmiştir. Memeli dokuları için tipik olan GPx aktivitesinin böceklerde düşük olması glutatyon transferazın peroksidaz (GSTPx) aktivitesinin gelişimi gibi özel biyokimyasal adaptasyonlara neden olmuştur. Weinhold et al. (1990) bahsedilen 3 lepidopter türü *T. ni* (Hubn.), *P. polyxenes* (Fabr.), *S. eridania* (Stoll)'da glutatyon-S-transferazın konjugatif ve peroksidatif aktivitesini belirtmişlerdir. Lukasik ve Golawska (2007) tahıl afiti *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758) ve *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775)'de GSTPx aktivitesinin varlığını belirtmişlerdir. Monofaj tohum afiti için belirlenen GSTPx aktivite seviyesi, çeşitli prooksidant allelokimyasal içeren bitkilerle beslenen *T. ni* (Hubn.) için tespit edilen GSTPx aktivitesi ile kıyaslanabilir düzeydedir. Ancak, *T. ni* (Hubn.)'ye göre daha yaygın polifaj özellik gösteren *S. eridania* (Stoll)'da GSTPx aktivitesi daha yüksektir. Diğer çalışılan lepidopter böcekler arasında siyah Kırlangıçkuyruk kelebeği *Papilio polyxenes*'de 2-5 kat daha yüksek GSTPx aktivitesi tespit edilmiştir (Weinhold et al. 1990). Bu durum muhtemelen, ksantotoksin gibi, fotodinamik prooksidantlarca zengin olan Rutaceae ve Apiaceae bitki ailelerine ait türlerde beslenmek için özelleşmiş *P. polyxenes* (Fabr.) için karakteristiktir (Downum 1986, Downum

and Rodriquez 1986). GR enzimi için benzer sonuçlar tahıl afitleri ve belirtilen lepidopter türler *T. ni* (Hubn.), *P. polyxenes* (Fabr.), *S. eridania* (Stoll) larvalarında da elde edilmiştir. Lukasik (2007) o-dihidroksifenol ile beslenen tahıl afitlerinde diğer antioksidan enzimler süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinin yaprak öğütücü lepidopter larvalardakinden çok daha düşük olduğunu göstermiştir. *G. mellonella* ile yapılan bu çalışmada ksantotoksinin yüksek konsantrasyonlarda böceğin yaşama oranını, eşey oranını düşürdüğü, dişi ömür uzunluğunu kısalttığı, gelişme süresini geciktirdiği, yumurta verimi ve açılma oranını azalttığı görülmüştür. Ayrıca besine ilave edilen bu güçlü prooksidan bitki allelokimyasalı erginlerin lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu düzeyini yükseltmiş, GST aktivitesini önemli derecede düşürmüştür. GST enziminin aktivitesinin artan lipid ve protein hasarını gösteren yüksek MDA ve protein karbonil karşısında düşmesi enzimin artan konjugatif işlevinin aşırı oksidatif hasarı yok etmede yetersiz kalmasının sonucu olabilir. Diğer taraftan aşırı ksantotoksin toksisitesi karşısında GST'nin yetersiz kalması bu enzimin peroksidaz aktifliğini artırmış olabilir. Bu görüş hidroksumik asit ve o-dihidroksifenol gibi gibi tahıl allelokimyasalları ile beslenen afit dokularındaki yüksek GR ve GSTPx seviyesinin, muhtemelen glutatyon-S-transferazın yüksek konjugatif aktivitesi ile bağlantılı olduğunun ileri sürülmesi (Leszczyński and Dixon 1992, Leszczyński et al. 1994, Laskowska et al. 1999, Lukasik 2006) ile destek bulmaktadır.

Bizim sonuçlarımızla zıt olarak bazı afit türlerinde antioksidan enzim aktiviteleri oldukça yüksek bulunmuştur. Bu türler konak bitkilerde koloni oluşturduklarından büyük ölçüde çeşitli bitki allelokimyasalları ile temas halinde olabilirler (Lukasik 2006, 2007). Diğer taraftan quersetin gibi prooksidan bitki allelokimyasalına maruz kalan bazı lepidopter böceklerin GST aktifliği yalnızca GSTPx aktivitesi ile telafi edilmeyip, metabolizması sırasında diğer detoksifikasyon enzimlerine ve enzimatik olmayan oksidasyona da bağlıdır (Pritsos et al. 1988).

*G. mellonella* (L.) larvalarının denenen ksantotoksin ile beslenmesi sonucunda GST enziminin aktivitesindeki azalma besinsel ksantotoksin konsantrasyonlarının prooksidatif etkilerine ve yüksek ksantotoksin konsantrasyonlarında ortamdaki indirgenmiş glutatyon miktarının düşmesine de bağlı olabilir. Prooksidan o-dihidroksifenollere maruz kalan tahıl afitlerinde oksidatif stresin göstergeleri olarak protein tiyol gruplarının ve glutatyonun azaldığı tespit edildiğinden (Lukasik and Leszczyński 2005, Lukasik 2006) dolayı bu görüşün doğru olabileceği görünmektedir. Summers ve Felton (1994), kafeik asit ve klorojenik asit gibi o-

dihidroksifenollerin toksik etkisinin, prooksidan etkilerinin farklı olması ile ilgili olabileceğini öne sürmüştür.

GSTPx ve GR aktivitesinde bitki fenolik bileşiklerinden kaynaklanan benzer azalmalar, lepidopter larvaları (Pritsos et al. 1988, Ahmad et al. 1988, 1989, Ahmad and Pardini 1990 b, Lee 1991) ve çekirgeler (Barbehenn 2002) için de kaydedilmiştir. Tahıl afitlerinde, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi diğer antioksidant enzimlerin aktiviteleri üzerine *o*-dihidroksifenollerin önleyici etkisi de gösterilmiştir (Lukasik 2007).

GST enzim aktivitesinin yüksek ksantotoksin konsantrasyonlarında inhibisyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Diğer taraftan bir bitki allelokimyasalları fenolik maddeler, birçok enzimin inhibitörleri olarak bilinir ve enzim inaktivasyonu hidrojen veya kovalent bağlar ile fenollerin proteinler ile kompleks oluşturmalarından dolayı olabilir (Van Sumere et al. 1975). Ahmad ve Pardini (1990a) tarafından fitofaj böcekler için ileri sürüldüğü gibi antioksidan enzimlerin diğer bir inhibisyon mekanizması, fenolik bileşikleri gibi bitki allelokimyasalları tarafından üretilen çok reaktif semikinon radikallerinin, proteinler ve farklı katalik merkezli ve kofaktör ihtiyacı enzimleri çapraz bağlaması ile ilgili olabilir (Ahmad and Pardini 1990 a). Ek olarak, oksijenli ortamda oluşan radikaller hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine dönüştürülebilen süperoksit anyon radikalleri oluşturur. Bu durum sonuçta, organik hidroperoksitlerin oluşumu ve lipid peroksidasyonuna neden olabilir (Pritsos et al. 1990).

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre ksantotoksinin erginlerde sebep olduğu oksidatif hasara bağlı olarak antioksidan savunma sistemini bozması sonucu böceğin yaşama, gelişimi ve bazı ergin özellikleri üzerinde olumsuz etki gösterdiği anlaşılmaktadır. Ksantotoksinin denenen en yüksek konsantrasyonlarında GST enziminin aktivitesindeki azalma, MDA ve protein karbonil miktarındaki yükselme ile birlikte yaşama oranının ve ömür uzunluğunun azalması, gelişim süresinin uzaması, yumurta verimi ve açılma oranında düşme bu düşüncüyü destekleyen önemli sonuçlardır. Ksantotoksinin düşük konsantrasyonlarında ise genelde GST aktivitesinin bazal seviyesinin artışı, erginlerin oksidatif strese bir adaptasyon davranışı göstermesi sonucu olabilir. Ksantotoksin yüksek miktarlarda GST enziminin aktivitesi üzerindeki bu önleyici etkisini oksidatif stresi artırarak göstermiş olabilir. Ergin dokularında artan oksidatif stres ile ters orantılı olarak GST aktivitesinin önemli derecede düşmesi bu görüşü desteklemekte olup *G. mellonella* (L.) larvalarının bitkisel kaynaklı bitki prooksidan

maddeleri ile bulaşması sırasında biyokimyasal adaptasyonundan sorumlu olabileceği ileri sürülebilir. Bitkisel allelokimyasallar ile beslenen diğer böcekler ile ve bu çalışmada *G. mellonella* (L.) ile elde edilen sonuçlar ksantotoksinin böceğin ergin biyolojik etkinlik parametreleri üzerindeki olumsuz etkisinde oksidatif stresin önemli rol oynadığını açıkça göstermektedir. Bitkisel allelokimyasalların böceklerin farklı evreleri üzerinde gösterdiği toksik etki mekanizmasının tam olarak anlaşılması zararlı böceklerin konak bitkiler ile etkileşimlerinin fizyolojik, biyokimyasal ve ekolojik temeli hakkında daha fazla bilgi edinmemize sebep olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Adamski Z, Ziemnicki K, Fila K, Žikić R and Štajn A** (2003) Effects of long-term exposure to fenitrothion on *Spodoptera exigua* and *Tenebrio molitor* larval development and antioxidant enzyme activity. *Biol. Lett.*, 40: 43-52.
- Ahmad M** (1994) Biological control of greater wax moth, *Galleria mellonella* L. *J. Apic. Res.*, (Pakistan), 32 (3): 319-323.
- Ahmad S, Pritsos C A, Bowen S M, Kirkland K E, Blomquist G J and Pardini R S** (1987) Activities of enzymes that detoxify superoxide anion and related toxic oxyradicals in *Trichoplusia ni*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 7: 85-96.
- Ahmad S, Capps C and Pardini R S** (1988) Response of the antioxidant enzymes of the cabbage looper moth (*Trichoplusia ni*) larvae to superoxide-generating plant prooxidants, quercetin and xanthotoxin. *J. Cell Biol.*, 107: 418a.
- Ahmad S, Beilsen M A and Pardini R S** (1989) Glutathione peroxidase activity in insects: a reassessment. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 12: 31-49.
- Ahmad S and Pardini R S** (1990a) Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radic. Biol. Med.*, 8: 401-413.
- Ahmad S and Pardini R S** (1990b) Antioxidant defense of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*: Enzymatic responses to the superoxide-generating flavonoid, quercetin, and photodynamic furocoumarin, xanthotoxin. *Photochem. Photobiol.*, 51: 305-311.
- Ahmad S, Duval D L, Weinhold L C and Pardini R S** (1991) Cabbage looper antioxidant enzymes: Tissue Specificity. *Insect Biochem.*, 21: 563-572.
- Ahmad S** (1992) Biochemical defence of prooxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochem. Syst. Ecol.*, 20: 269-296.
- Ahmad S** (1995) Oxidative stress from environmental pollutants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 29: 135-157.
- Ahmad S, Zaman K, MacGill R S, Batcabe J P and Pardini R** (1995) Dichlone-induced oxidative stress in a model insect species, *Spodoptera eridania*. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.*, 29: 442-448.
- Ahmad S, Pritsos C A, Bowen S M, Heisler C R, Blomquist G J and Pardini R S** (2005a) Subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in the southern armyworm, *Spodoptera eridania*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 7: 173-18.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Ahmad S, Pritsos C A, Bowen S M, Kirkland K E, Blomquist G J and Pardini R S** (2005b) Activities of enzymes that detoxify superoxide anion and related toxic oxyradicals in *Trichoplusia ni*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 6 (2): 85-96.
- Akyol E, Yeninar H, Şahinler N ve Ceylan D A** (2009) Büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella* L.'nin (Lepidoptera: Pyralidae) kontrolünde karbondioksitin (CO<sub>2</sub>) kullanımı. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 9: 26-31.
- Al-Izzi M A J, Al-Maliki S K and Jabbo N F** (1987) Culturing the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), on an artificial diet. *J. Econ. Entomol.*, 80: 277-280.
- Alonso-Álvarez C, Pérez-Rodríguez L, García J T, Viñuela J and Matteo R** (2010) Age and Breeding Effort as Sources of Individual Variability in Oxidative Stress Markers in a Bird Species. *Physiol. Biochem. Zool.*, 83 (1):110-118.
- Anderson T D and Zhu K Y** (2004) Synergistic and antagonistic effects of atrazine on the toxicity of organophosphorodithioate and organophosphorothioate insecticides to *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 80: 54-64.
- Ansari K A, Kaplan E and Shoeman D** (1989) Age Related Changes in Lipid Peroxidation and Protective Enzymes in The Central Nervous System. *Growth Develop. Aging*, 53 (3): 117-21.
- Appel A G, Gehret M J and Tanley M J** (2004) Effects of moisture on the toxicity of inorganic and organic insecticidal dust formulations to *German cockroaches* (Blattodea: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.*, 97: 1009-1016.
- Appel H M** (1993) Phenolics in ecological interactions the importance of oxidation. *J. Chem. Ecol.*, 19: 1521-1552.
- Appel H M** (1994) The chewing herbivore gut lumen: physicochemical conditions and their impact on plant nutrients, allelochemicals and insect pathogens. *Insect-Plant Interactions*, ed. E. A. Bernays, CRC Pres, Boca Raton, FL, pp. 209-223.
- Appel H M and Martin M M** (1990) Gut redox conditions in herbivorous lepidopteran larvae. *J. Chem. Ecol.*, 16: 3277-3290.
- Apperson C S and Georghiou G P** (1975) Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. *J. Econ. Entomol.*, 68 (2) :153-157.
- Aucoin R, Guillet G, Murray C, Philogène B J R and Arnason J T** (1995) How do insect herbivores cope with the extreme oxidative stress of phototoxic host plants? *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 29 (2): 211-226.
- Bains J S, Garg S K and Sharma S P** (1998) Effect of butylated hydroxyanisole on catalase activity and malondialdehyde content in aging *Zaprionus paravittiger* (Diptera). *Gerontology*, 44: 262-266.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Barata C, Baird D J, Soares A M V M and Guilhermino L** (2001) Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* straus exposed to ethyl parathion. *Ecotox. Environ. Safe.*, 49: 155-163.
- Barbehenn R V** (2002) Gut-Based antioxidant enzymes in a polyphagous and a Graminivorous grasshopper. *J. Chem. Ecol.*, 28: 1329-1347.
- Barbehenn R V** (2003) Antioxidants in grasshoppers: higher levels defend the midgut tissues of a polyphagous species than a graminivorous species. *J. Chem. Ecol.*, 29 (3): 683-702.
- Barbehenn R V** (2005) Grasshoppers efficiently process the bundle sheath cells in a C<sub>4</sub> grass: implications for patterns of host plant utilization. *Entomol. Exp. Appl.*, 116: 209-217.
- Barbehenn R V, Poopat U and Spencer B** (2003) Semiquinone and ascorbyl radicals in the gut fluids of caterpillars measured with EPR spectrometry. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33: 125-130.
- Barbehenn R V and Stannard J** (2004) Antioxidant defense of the midgut epithelium by the peritrophic envelope in caterpillars. *J. Insect Physiol.*, 50: 783-790.
- Barbehenn R V, Cheek S, Gasperut A, Lister E and Maben R** (2005a) Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midguts of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* caterpillars. *J. Chem. Ecol.*, 31(5): 969-988.
- Barbehenn R V, Dodick T, Poopat U and Spencer B** (2005b) Fenton-type reactions and iron concentrations in the midgut fluids of tree-feeding caterpillars. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 60: 32-43.
- Barbehenn R V, Jones C P, Hagerman A E and Karonen M** (2006) Ellagitannins have greater oxidative activities than condensed tannins and galloyl glucoses at high pH: potential impact on caterpillars. *J. Chem. Ecol.*, 32 (10): 2253-2267.
- Barbehenn R V, Maben R E and Knoester J J** (2008) Linking phenolic oxidation in the midgut lumen with oxidative stress in the midgut tissues of a tree-feeding caterpillar *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Env. Entomol.*, 37: 1113-1118.
- Berenbaum M R** (1978) Toxicity of a furanocoumarin to armyworms a case of biosynthetic escape from insect herbivores. *Science* (Wash. D.C.), 201: 532-534.
- Berenbaum M R** (1995) Phototoxicity of plant secondary metabolites insect and mammalian perspectives. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 29: 119-134.
- Bernardi E B, Haddad M L and Parra J R P** (2000) Comparison of artificial diet for rearing *Corcyra cephalonica* (Stainton, 1865) (Lepidoptera: Pyralidae) for *Trichogramma mass* production. *Rev. Brasil. Biol.*, 60 (19): 45-52.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Bernays E A, Chamberlain D and McCarthy P** (1980) The differential effects of ingested tannic acid on different species of Acridoidea. *Entomol. Exp. Appl.*, 28: 158-166.
- Bhavan-Saravana P and Geraldine P** (2001) Biochemical responses in tissues of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to endosulfan. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2531: 1-15.
- Bi J L and Felton G W** (1995) Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *J. Chem. Ecol.*, 21: 1511-1530.
- Bi J L, Felton G W and Mueller A J** (1994) Induced resistance in soybean to *Helicoverpa zea*: role of plant protein quality. *J. Chem. Ecol.*, 20: 183-198.
- Bokov A, Chaudhuri A and Richardson A** (2004) The Role of Oxidative Damage and Stress in Ageing. *Mech. Ageing Dev.*, 125: 811-826.
- Bourdon E, Loreau N and Blache D** (1999) Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *Faseb J.*, 13: 233-244.
- Bronskill J** (1961) A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Lep. Soc.*, 15: 102-104.
- Brown R P, McDonnell C M, Berenbaum M R and Schuler M A** (2005) Regulation of an insect cytochrome P450 monooxygenase gene (CYP6B1) by aryl hydrocarbon and xanthotoxin response cascade. *Gene*, 26: 39-52.
- Büyükgüzel E and Kalender Y** (2007) Penicillin-induced oxidative stress: Effects on antioxidative response of midgut tissues in larval instars of *G. mellonella*. *J. Econ. Entomol.*, 100: 1533-1541.
- Büyükgüzel E, Tunaz H, Stanley D W and Büyükgüzel K** (2007) Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. *J. Insect Physiol.*, 53: 99-105.
- Büyükgüzel E, Hyrsi P and Büyükgüzel K** (2010) Eicosanoids mediate hemolymph oxidative and antioxidative response in larvae of *Galleria mellonella* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 156 (2): 176-183.
- Büyükgüzel K** (2001) DNA gyrase inhibitors: Novobiocin enhances the survival of *Pimpla turionellae* larvae reared on an artificial diet but other antibiotics do not. *J. Appl. Entomol.*, 125: 583-587.
- Büyükgüzel K** (2006) Malathion-induced oxidative stress in a parasitoid wasp: Effect on adult emergence, longevity, fecundity, oxidative and antioxidative response of the *Pimpla turionellae*. *J. Econ. Entomol.*, 99: 1225-1234.
- Büyükgüzel K and İcen E** (2004) Effects of gyrase inhibitors on the total protein content of *Pimpla turionellae* L. reared on an artificial diet. *J. Entomol. Sci.*, 39 (1): 108-116.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Büyükgüzel K and Yazgan Ş** (2002) Effects of antimicrobial agents on survival and development of larvae of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) reared on an artificial diet. *Turk. J. Zool.*, 26: 111-119.
- Büyükgüzel K, Tunaz H, Putnam S M and Stanley D W** (2002) Prostaglandin biosynthesis by midgut tissue isolated from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec.*, 32: 435-443.
- Campos F, Donskov N, Arnason J T, Philogene B J R, Atkinson P M and Werstuik N H** (1990) Biological effects and toxicokinetics of DIMBOA in *Diadegma terebrans* (Hymenoptera: Ichneumonidae), an endoparasitoid of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralide). *J. Econ. Entomol.*, 83: 356-360.
- Candan S** (1997) *External morphology of eggs of some Pentatomidae (Heteroptera: Insecta)*. Ph.D. dissertation, University of Gazi, Turkey. 223 p.
- Chang C L, Albrecht C, El-Shall S S A and Kurashima R** (2001) Adult reproductive capacity of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) on a chemically defined diet. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 94: 702-706.
- Chang C P and Hsieh F K** (1992) Morphology and bionomics of *Galleria mellonella* L. *Chin. J. Entomol.*, 12: 121-129.
- Charriere J D and Imdorf A** (1997) Protection of honeycombs from moth damage, swiss bee research center federal dairy research station. *Communication*, 24: 16.
- Chen M S** (2008) Inducible direct plant defence against insect herbivores: A review. *Insect Science*, 15 (2): 101-114.
- Chen Y H and Welter S C** (2002) Abundance of a native moth *Homoeosoma electellum* (Lepidoptera: Pyralidae) and activity of indigenous parasitoids in native and agricultural sunflower habitats. *Environ. Entomol.*, 31 (4): 626-636.
- Chesemann K H and Slater T F** (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.*, 49: 481-493.
- Clark A G, Dick G L, Martindale S M and Smith J N** (1985) Glutathione S-transferases from the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*. *Insect Biochem.*, 15: 35-44.
- Cohen A C and Crittenden P** (2004) Deliberately added and “cryptic” antioxidants in three artificial diets for insects. *J. Econ. Entomol.*, 97: 265- 272.
- Dandapat J, Chainy G B N and Rao K J** (2003) Improved post-larval production in giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* through modulation of antioxidant defence system by dietary vitamin-E. *Indian J. Biotechnol.*, 2 (2): 195-202.
- De Falco T, Camara N, Le Bras S and Van Doren M** (2008) Nonautonomous sex determination controls sexually dimorphic development of the *Drosophila* gonad. *Dev. Cell.*, 14: 275-86.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- De Waard M A, Georgopoulos S G, Hollaman D W, Ishii H, Leroux P, Ragsdale N N and Schwinin F J** (1993) Chemical control of plant diseases: Problem and prospects. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31: 403-421.
- Dean R T, Fu S, Stocker R and Davies M J** (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.*, 324: 1-18.
- Delaware M** (2000) *New Jersey, Pennsylvania, Westingia and the USDA Cooperating*. MAAREC Publication, 4.5.
- Delgarde S and Rouland-Lefevre C** (2002) Evaluation of the effects of thiamethoxam on three species of African termite (Isoptera: Termitidae) crop pests. *J. Econ Entomol.*, 95 (3): 531-536.
- Dere E, Bakır S ve Atalay S** (1995) Malathion'un fare (*Mus musculus*) karaciğer heksokinaz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, malat dehidrogenaz ve laktat dehidrogenaz aktiviterine etkisi. *Turk J. Biol.*; 19 (1): 19-27.
- Djordjevic V B** (2004) Free radicals in cell biology. *Int. Rev. Cytolo.*, 237: 57-89.
- Downer R G H** (1985) Lipid metabolism. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, eds. G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, Pergamon Press, Oxford, pp. 77-113.
- Downum K R** (1986) Photoactivated biocides from higher plants. *Natural Resistance to Pests. Roles of Allelochemicals*, eds. M. B. Green and P. A. Hedin, ACS Symp. Ser. 296, American Chemical Society, Washington, pp. 197-205.
- Downum K R and Rodriguez E** (1986) Toxicological action and ecological importance of plant photosensitizers. *J. Chem. Ecol.*, 12: 823-834.
- Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G and Board P** (2001) The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *Biol. Chem.*, 276: 3319-3323.
- Eischen F and Dietz A** (1987) Growth and survival of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larva fed diets containing honey bee-collected plant resins. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 80: 74-77.
- Engelman F** (1979) Insect vitellogenin: identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis. *Adv. Insect Physiol.*, 27: 49-108.
- Evans P, Lyras L and Halliwell B** (1999) Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Meth. Enzymol.*, 300: 145-156.
- Felton G W and Duffey S S** (1991) Protective action of midgut catalase in lepidopteran larvae against oxidative plant defenses. *J. Chem. Ecol.*, 17: 1715-1732.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Felton G W and Summers C B** (1993) Potential role of ascorbate oxidase as a plant defense protein against insect herbivory. *J. Chem. Ecol.*, 19: 1553-1568.
- Felton G W and Summers C B** (1995) Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 29: 187-197.
- Felton G W, Donato K, Del Vecchio R J, Duffey S S** (1989) Activation of plant polyphenol oxidases by insect feeding damage reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *J. Chem. Ecol.*, 15: 2667-2694.
- Felton G W, Donato K, Del Vecchio R J, Duffey S S** (1992) Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore. *J. Insect Physiol.*, 38: 277-285.
- Fenske R A, Kedan G, Lu C S, Fisker-Andersen J A and Curl C L** (2002) Assessment of organophosphorous pesticide exposures in the diets of preschool children in Washington State. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, 12: 21-28.
- Ferkovich S M, Morales-Ramos J A, Rojas M G, Oberlander H, Carpenter J E and Greany P** (1999) Rearing of ectoparasitoid *Diapetimorpha introita* on an artificial diet: supplementation with insect cell line-derived factors. *Biocontrol*, 44: 29-45.
- Gäde G and Hoffmann K H** (2005) Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiol. Entomol.*, 30: 103-121.
- Gelbič I and Holy A** (1985) Effects of antiviral agent (RS)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenin on the larval development of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera). *Acta Entomol. Bohemoslov.*, 82: 22-27.
- Gelbič I and Šula J** (1990) Ovicidal and biochemical effects of hempa and a nucleoside analogue on *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Het., Pyrrhocoridae). *J. Appl. Entomol.*, 109: 401-409.
- Gorbach V V** (1998) Seasonal dynamics and sex ratio in a population of the butterfly *Boloria aquilonaris* (Lepidoptera, Nymphalidae). *Zoologičeskij žurnal*, 77: 576-581.
- Grenier S, Delobel B and Bannot G** (1986) Physiological considerations of importance to the success of in vitro culture: an overview. *J. Insect Physiol.*, 32: 403-408.
- Gullino M L and Kuijpers L A M** (1994) Social and political implication of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32: 559-579.
- Gupta P, Dillard C R and Frekovich S M** (1996a) Potential of an unnatural host, *G. mellonella* for rearing the corn earworm endoparasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Annu. Entomol. Soc. Am.*, 89: 103-108.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Gupta P, Sloan A, Dillard C R and Ferkovich S M** (1996b) Parasitism of factitious host, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) by an endoparasitoid: ovoposition and emergence of *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Fla. Entomol.*, 79 (2): 221-229.
- Gülbahar Ö** (2007) Protein oksidasyonun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilgisi. *Turk. J. Geriatrics*, 10: 43-48.
- Gülel A** (1988) Çiftleşmenin *Dibrachys boarmiae* (Hymenoptera: Pteromalidae) erkeklerinin hayat süresine ve eşey oranına etkileri. *Doğa Türk Zooloji Dergisi*, 12 (3): 225-2230.
- Habig W H, Pabst M J and Jakoby W B** (1974) Glutathione-s-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.
- Halliwell B** (1994) Free radicals, antioxidant, and human disease: curiosity. Cause or Consequence? *Lancet*, 344: 721-724.
- Halliwell B** (1996) Antioxidants in Human Health and Disease. *Annu. Rev. Nutr.*, 16: 33-50.
- Halliwell B and Gutteridge J M C** (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3<sup>rd</sup> edn. Oxford University Press, New York, USA. 936 p.
- Hamimy W, Ashour E and Afify M** (2004) Effect of regional epidural ropivacaine anesthesia on glutathione S-transferase: Comparison with low flow sevoflurane and total intravenous propofol anesthesia. *J. Biol. Sci.*, 4: 398-404.
- He F S, Chen S Y, Tang X Y, Gan W Q, Tao B G and Wen B Y** (2002) Biological monitoring of combined exposure to organophosphates and pyrethroids. *Toxicol. Lett.*, 134: 119-124.
- Heinle H and Betz E** (1994) Effects of dietary garlic supplementantation in rat model of atherosclerosis. *Arznei-for*, 44: 614-617.
- Hemming J D C and Lindroth R** (2000) Effects of phenolic glycosides and protein on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and forest tent caterpillar (Lepidoptera: Lasiocampidae) performance and detoxication activities. *Environ. Entomol.*, 29 (6): 1108-1115.
- Hermes-Lima M, Storey J M and Storey K B** (1998) Antioksidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Com. Biochem. Physiol.*, 120B: 437-448.
- Hu M L** (1994) Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Meth. Enzymol.*, 233: 381-385.
- Ishihara M** (1992) Persistence of females that produce only female progeny in Lepidoptera. *Res. Popul. Ecol.*, 34: 331-347.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- İçen E, Armutçu F, Büyükgüzel K and Gürel A** (2005) Biochemical stress indicators of greater wax moth *Galleria mellonella* L. exposure to organophosphorus insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 98 (2): 358-366.
- Jain S K and Levine S N** (1995) Elevated lipid Peroxidation and vitamin E-Quinone levels in heart ventricles of streptozotocin-treated diabetic rats. *Free Radic. Biol. Med.*, 18: 337-341.
- Jarosz J** (1989) Simplified technique for preparing germ-free specimens of greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *J. Econ. Entomol.*, 82: 1478-1481.
- Kageyama D, Hoshizaki S and Ishikawa Y** (1998) Female-biased sex ratio in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*: Evidence for the occurrence of feminizing bacteria in an insect. *Heredity*, 81: 311-316.
- Kageyama D, Nishimura G, Hoshizaki S and Ishikawa Y** (2003) Two kinds of sex ratio distorters in a moth, *Ostrinia scapulalis*. *Genome*, 46: 974-982.
- Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Açikgoz F, Durak D, Ulusoy Y, Kalender Y** (2005a) Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicol.*, 211 (3): 197-206.
- Kalender Y, Yel M and Kalender S** (2005b) Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats. The effects of vitamin E and catechin. *Toxicol.*, 209 (1): 39-45.
- Kalender Y, Uzunhisarcikli M, Ogutcu A, Acikgoz F and Kalender S** (2006) Effects of diazinon on pseudocholinesterase activity and haematological indices in rats: The protective role of vitamin E. *Environ. Toxicol. Phar.*, 22 (1): 46-51.
- Kalyanaraman B, Premovic P J and Sealy R C** (1987) Semiquinone action radicals from the addition of amino acids, peptides and proteins to quinones derived from the oxidation of catechols and catecholamines. *J. Biol. Chem.*, 262: 11080-11087.
- Kanaoka Y, Fujimori K, Kikuno R, Sakaguchi Y, Urade Y and Hayaishi O** (2000) Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthase: conservation of the ancestral genomic structure of sigma-class glutathione S-transferase. *Europ. J. Biochem.*, 267: 3315-3322.
- Kaya M ve Kovancı B** (2000) Bursa İlinde Yeşil Kurt *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)'nın Biyolojisi Üzerinde Araştırmalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 10: 37-43.
- Keena M A, Odell T M and Tanner J A** (1995) Effects of diet ingredient source and preparation method on larval development of laboratory-reared gypsy moth (Lepidoptera: Lymantridae). *Annu. Entomol. Soc. Am.*, 88: 672-679.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kılınçer N** (1976) *Dibrachys cavus* (Walk.) (Hymenoptera – Pteromalidae), *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera–Braconidae) ve *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera- Galleridae) Arasındaki Bazı Biyolojik ve Fizyolojik İlişkiler Üzerinde Araştırmalar. (Doçentlik tezi), Ankara.
- Kono Y and Shishido T** (1992) Distribution of glutathione s-transferase activity in insect tissues. *Appl. Entomol. Zool.*, 27: 391-397.
- Krishnan N and Kodrik D** (2006) Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress?. *J. Insect Physiol.*, 52: 11-20.
- Krishnan N and Sehnal F** (2006) Compartmentalization of oxidative stress and antioxidant defense in the larval gut of *Spodoptera littoralis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 63: 1-10.
- Krishnan N, Kodrik D, Kludkiewicz B and Sehnal F** (2009) Glutathione-ascorbic acid redox cycle and thioredoxin reductase activity in the digestive tract of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39: 180-188.
- Kumova U ve Korkmaz A** (2002) Peteklerin Büyük Bal Mumu Güvesi (*Galleria mellonella* L.)'ne Karşı Korunması Üzerine Bir Araştırma. Türkiye 3. Arıcılık Kongresi, Adana.
- Laing D R and Hagen K S A** (1970) Xenic, partially synthetic diet for the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Olethreutidae). *Can. Entomol.*, 102: 250-252.
- Lampert E C, Zangerl A R, Berenbaum M R and Ode P J** (2008) Tritrophic effects of xanthotoxin on the polyembryonic parasitoid *Copidosoma sosares* (Hymenoptera: Encyrtidae). *J. Chem. Ecol.*, 34 (6): 783-790.
- Laskowska I, Leszczyński B and Markowski J** (1999) Activity of glutathione transferase and reductase in tissues of bird cherry-oat aphid during its host-plant alternation. *Exp. Toxic. Pathol.*, 51: 357-359.
- Laughton M J, Halliwell B, Evans P J and Hault J R** (1989) Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem. Pharmacol.*, 38: 2859-2865.
- Lee K** (1991) Glutathione S-transferase activities in phytophagous insects: induction and inhibition by plant phototoxins and phenols. *Insect Biochem.*, 21: 353-361.
- Lee K and Berenbaum M R** (1989) Action of antioxidant enzymes and cytochrome P-450 monooxygenases in the *Cabbage looper* in response to plant phototoxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 10: 151-162.
- Lee K and Berenbaum M R** (1990) Defense of parsnip webworm against phototoxic furanocoumarins: role of antioxidant enzymes. *J. Chem. Ecol.*, 16: 2451-2460.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Leonova I N and Slynko N M** (1996) Comparative study of insecticide susceptibility and activities of detoxification enzymes in larvae and adults of cotton bollworm, *Heliothis armigera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 32: 157-172.
- Leszczyński B and Dixon A F G** (1992) Resistance of cereal aphids: The interaction between hydroxamic acids and glutathione S-transferases in the grain aphid *Sitobion avenae* (F.) (Hom., Aphididae). *J. Appl. Entomol.*, 113: 61-67.
- Leszczyński B, Matok H and Dixon A F G** (1994) Detoxification of cereal allelochemicals by aphids: The activity and molecular weights of glutathione S-transferase in three species of cereal aphids. *J. Chem. Ecol.*, 20: 387-394.
- Levine R L, Williams J A, Stadtman E R and Shacter E** (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.*, 233: 347-357.
- Li X, Berenbaum M R and Schuler M A** (2000a) Molecular cloning and expression of *CYP6P8*: a xanthotoxin inducible cytochrome P450 cDNA from *Helicoverpa zea*. *Insect Biochem. Mol. Bio.*, 30: 75-84.
- Li X, Zangerl A R, Schuler M A and Berenbaum M R** (2000b) Cross –resistance to  $\alpha$ -cypermethrin after Xanthotoxin ingestion in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 93 (1): 18-25.
- Liu T X and Chen T Y** (2000) Effects of the chitin synthesis inhibitor buprofezin on survival and development of immatures of *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae). *J. Econ. Entomol.*, 93 (2): 234-239.
- Loher W, Clark W H, Jr. Fischer A, Olive P J W and Nent D F** (1984) Behavioral and physiological changes in cricket-females after mating. *In Invertebrate Reproduction*, eds. Engles, Elsevier, Amsterdam, pp.189-201.
- Lopez J D Jr, Bull D L and Lmgren P D** (1996) Feeding of adult *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) on dry sucrose. *J. Econ. Entomol.*, 89 (1): 119-123.
- Lowry O H, Rosebrough N L, Farr A L and Randall R J** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Lukasik I** (2006) Effect of o-dihydroxyphenols on antioxidant defence mechanisms of cereal aphids associated with glutathione. *Pestycydy/Pesticides.*, 3 (4): 67-73.
- Lukasik I** (2007) Changes in activity of superoxide dismutase and catalase within cereal aphids in response to plant o-dihydroxyphenols. *J. Appl. Entomol.*, 131: 209-214.
- Lukasik I and Golawska S** (2007) Activity of Se-independent glutathione peroxidase and glutathione reductase within cereal aphid tissues. *Biol. Lett.*, 44 (1): 31-39.
- Lukasik I and Leszczyński B** (2005) Damage of cereal aphid HS-proteins causing by o-dihydroxyphenols and quinones. *Aphids And Other Homopterous Insects*, 11: 117-125.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Manach C, Referat F, Terier O, Agullo G, Demigne C and Remesy C** (1996) Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr. Res.*, 16: 517-544.
- Mandato C A, Diehl-Jones W L, Moore S J and Downer R G H** (1997) The effects of eicosanoids biosynthesis inhibitors on prophenoloxidase activation, phagocytosis and cell spreading in *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.*, 43 (1): 1-8.
- Manduzio H, Rocher B, Durand F, Galap C and Leboulenger F** (2005) The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate Survival Journal*, 2: 91-104.
- Mano T, Sinohora R, Sawai Y, Oda N, Nishida Y, Mokuno T, Kotake M, Hamada M, Masanuga R, Nakai A and Nagasaka A** (1995) Effects of thyroid hormone on coenzyme Q and other free radical scavengers in rat heart muscle. *J. Endocrin.*, 145: 131-136.
- Mathews M C, Summers C B and Felton G W** (1997) Ascorbate peroxidase: A novel antioxidant enzyme in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 34: 57-68.
- Mazanec Z** (2007) Studies on the sex ratio in the jarrah leafminer *Perthida glyphopa* (Lepidoptera: Incurvariidae). *Aust. J. Entomol.*, 23: 69-74.
- Melan K** (2004) *Tarımsal Savaşın İlkeleri: Zirai ücadele ilkeleri ve organik arımda kullanılacak yöntemler*. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. 30 s.
- Missirlis F, Rahlfs S, Dimopoulos N, Bauer H, Becker K, Hilliker A and Phillips J P** (2003) A putative glutathione peroxidase of *Drosophila* encodes thioredoxin peroxidase that provides resistance against oxidative stress but fails to complement a lack of catalase activity. *Biol. Chem.*, 384 (3): 463-472.
- Mockett R J, Orr W J, Rahmandar J J, Benes J J, Radyuk S N, Klichko V I and Sohal R S** (1999) Overexpression of Mn-containing superoxide dismutase in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 371: 260-269.
- Myers J H, Boetner G and Elkinton J** (1998) Maternal effects in gypsy moth: only sex ratio varies with population density. *Ecology*, 79: 305-314.
- Nielsen S A and Toft S** (2002) Responses of a detoxification enzyme to diet quality in the wolf spider. *Pardosa prativaga*. *European Arachnology*, eds. S. Toft and N. Scharff, Aarhus University Pres, Aarhus, pp. 65-70.
- O'Brien M L and Tew K D** (1996) Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Europ J. Cancer*, 32: 967-978.
- Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Kalender S, Durak D, Bayrakdar F and Kalender Y** (2006) The effects of organophosphate insecticide diazinon on malondialdehyde levels and myocardial cells in rat heart tissue and protective role of vitamin E. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 86 (2): 93-98.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Ortel J** (1995) Accumulation of cd and pb in successive stages of *Galleria mellonella* and metal transfer to the pupal parasitoid *Pimpla turionellae*. *Entomol. Exp. Appl.*, 77: 89-97.
- Parker J D, Parker K M and Keller L** (2004) Molecular phylogenetic evidence for an extracellular Cu Zn superoxide dismutase gene in insects. *Insect Mol. Biol.*, 13: 587-594.
- Parkes T L, Hilliker A J and Phillips J P** (1993) Genetic and biochemical analysis of Glutathione S-transferase in the oxygen defense system of *Drosophila melanogaster*, *Genome*, 36: 1007-1014.
- Pawel A** (2004) Sex ratio of apollo butterfly *Parnassius apollo* (Lepidoptera: Papilionidae)-facts and artifacts. *Euro. J. Entomol.*, 101: 341-344.
- Peric-Mataruga V, Blagojevic D, Spasic M B, Ivanovic J and Jankovic-Hladni M** (1997) Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut of *Lymantria dispar* L. caterpillars of different population origins. *J. Insect Physiol.*, 43: 101-106.
- Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary M D and Remacle J** (1990) Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.*, 51: 283-297.
- Pohlson E and Baldwin I T** (2001) Artificial diets 'capture' the dynamics of jasmonate-induced defenses in plants. *Entomol. Exp. Appl.*, 100: 127-130.
- Priester M T and Georghiou P G** (1978) Induction of high resistance to permethrin in *Culex pipiens quinquefasciatus*. *J. Econ. Entomol.*, 71 (2): 197-200.
- Pritsos C A, Ahmad S, Bowen S M, Elliot A J, Blomquist G J and Pardini R S** (1988). Antioxidant enzymes of the black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes*, and their response to the prooxidant allelochemical, quercetin. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 8: 101-112.
- Pritsos C A, Ahmad S, Elliott A J and Pardini R S** (1990) Antioxidant enzyme level response to prooxidant allelochemicals in larvae of the southern armyworm moth, *Spodoptera eridania*. *Free Radic. Res. Commun.*, 9 (2): 127-133.
- Pritsos C A, Pastore J and Pardini R S** (1991) Role of superoxide dismutase in the protection and tolerance to the prooxidant allelochemical quercetin in *Papilio polyxenes*, *Spodoptera eridania* and *Trichoplusia ni*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 16 (4): 273-282.
- Punzo F** (1993) Detoxification enzymes and the effects of temperature on the toxicity of pyrethroids to the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 105: 155-158.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Ranson H, Jensen B, Wang X, Prapanthadara L, Hemingway J and Collins F H** (2000) Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, 9: 499-507.
- Reznick A Z and Packer L** (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth. Enzymol.*, 233: 357-363.
- Rhainds M, Davis D R and Price P W** (2009) Bionomics of bagworms (Lepidoptera: Psychidae). *Annu. Rev. Entomol.*, 54: 209-226.
- Riba M, Mart J and Sans A** (2003) Influence of azadirachtin on development and reproduction of *Nezara viridula* L. (Het., Pentatomidae). *J. Appl. Entomol.*, 127: 37-41.
- Ridgway N M and Mahr D L** (1990) Reproduction, development, and longevity of *Pholetesor ornigis* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of spotted tentiform leafminer (Lepidoptera: Gracillaridae), in the laboratory. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 83: 790-794.
- Ritter W, Perschil F and Vogel R**, (1992) Comparison of the effect of various methods for the control of wax moths. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung*, 26 (1): 11-13.
- Roda A L, Oldham N J, Svatos A and Baldwin I T** (2003) Allometric analysis of the induced flavonols on the leaf surface of wild tobacco (*Nicotiana attenuata*). *Phytochem.*, 62: 527-536.
- Sahara K, Marec F, Eickhoff U and Traut W** (2003) Moth sex chromatin probed by comparative genomic hybridization (CGH). *Genome*, 46: 339-342.
- Saraswathy S D, Suja V, Gurumurthy P and Shyamala Devi C S** (1998) Effect of Liv.100 against antitubercular drugs (Isoniazid, rifampicin and pyrazinamide) induced hepatotoxicity in rats. *Indian. J. Pharmacol.*, 30: 233-238.
- Schaeffer F and Stainer R Y** (1978) Glucose-6-phosphate dehydrogenase, kinetics and molecular properties. *Arch. Microbiol.*, pp.116-119.
- Scharf M E, Lee C Y, Neal J J and Bennett G W** (1999) Cytochrome P450 MA expression in insecticide-resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.*, 92: 788-793.
- Sestini E A, Carlson J C and Allsopp R** (1991) The effects of ambient temperature on life span, lipid peroxidation, superoxide dismutase, and phospholipase A<sub>2</sub> activity in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.*, 26: 385-395.
- Sevgiler Y** (2007) *Oreochromis niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında Fenthiyonun NAC ve BSO modülatörlüğünde glutatyon metabolizmasına oksidatif etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Türkiye.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Sheehan D, Meade G, Foley V M and Dowd C A** (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of none-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.*, 360: 1-16.
- Singh P and House H L** (1970a) Antimicrobials “safe” levels in a synthetic diet of an insect. *Agria affinis. J. Insect Physiol.*, 16: 1769-1782.
- Singh P and House H L** (1970b) Antimicrobial agents: their detrimental effects on size of an insect. *Agria affinis. Can. Entomol.*, 102: 1340-1344.
- Singh P and House H L** (1970c) Effects of streptomycin and potassium sorbate levels in relation to nutrient levels on the larvae of *Agria affinis*. *J. Econ. Entomol.*, 63: 449-454.
- Singh S P, Coronella J A, Benes H, Cochrane B J and Zimniak P** (2001) Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione s-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *Eur. J. Biochem.*, 268: 2912-2923.
- Sivori J L, Casabé N, Zerba E N and Wood E J** (1997) Induction of glutathione-s-transferase activity in *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92 (6): 797-802.
- Slāma K, Holý A and Votruba I** (1983) Insect sterility induced by a broad-spectrum antiviral agent (S)-9-(2,3-Dihydroxypropyl) adenine. *Entomol. Exp. Appl.*, 33: 9-14.
- Slansky F J and Scriber J M** (1985) Food consumption and utilization. *Compr. Insect Phys., Biochemistry and Pharmacology IV.*, eds. G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, Pergamon, Press, Oxford, pp. 87-163.
- Snedecor G S and Cochran W G** (1989) *Statistical Method*. 8<sup>th</sup>, ed. I. A. Ames, Iowa State University Pres.
- Socha R, Gelbič I and Šula J** (1988) Histopatological effects of (R,S)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenine on the ovaries of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *Acta Entomol. Bohemoslov.*, 85: 408-417.
- Sohal R S, Agarwal S, Sohal B H** (1995a) Oxidative stress and aging in the Mongolian Gerbil. *Mech. Ageing Dev.*, 81: 15-25.
- Sohal R S, Sohal B H and Orr W C** (1995b) Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. *Free Radic. Biol. Med.*, 19: 499-504.
- Spiteller G** (2001) Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. *Mech. Ageing Dev.*, 122: 617-657.
- SPSS Inc** (1997) User’s manual, version 10. SPSS Inc., Chicago, IL.
- Stadtman E R** (1992) Protein oxidation and aging. *Science*, 257: pp. 1220-1224.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Šula J, Gelbič I and Socha R** (1987) The effects of (RS)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenine on the reproduction and protein spectrum in hemolymph and ovaries of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *Acta. Entomol. Bohemoslov.*, 84: 1-9.
- Summers C B and Felton G W** (1994) Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera:Noctuidae): potential mode of action for phenolic compounds in plant antiherbivore chemistry. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 24: 943-953.
- Sun J, Folk D, Bradley T J and Tower J** (2002) Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life Span of adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 161: 661-672.
- Suwalsky M, Ramos P, Villena F, Cardenas H, Norris B, Cuevas F and Sotomayer C P** (2001) The organophosphorus insecticide parathion changes properties of natural and model membranes, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 70: 74-85.
- Syvanen M, Zhou Z, Wharton J, Goldsbury C and Clark A** (1996) Heterogeneity of the glutathione transferase genes encoding enzymes responsible for insecticide degradation in the housefly. *J. Mol. Evol.*, 43: 236-240.
- Takenaka Y, Miki M, Yasuda H and Mino M** (1991) The effect of  $\alpha$ -tocopherol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols induced by free radicals generated in different sites. *Arch. Biochem. Biophys.*, 285: 344-350.
- Terra W R** (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Ann. Rev. Entomol.*, 35: 181-200.
- Timmermann S E, Zangerl A R and Berenbaum M R** (1999) Ascorbic and uric acid responses to xanthotoxin ingestion in a generalist and a specialist caterpillar. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 42: 26-36.
- Traut W, Sahara K and Marec F** (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Development*, 1: 332-346.
- Tunaz H, Park Y, Büyükgüzel K, Bedick J C, Nor Aliza A R and Stanley D W** (2003) Eicosanoids in insect immunity: Bacterial infection stimulates hemocytic phospholipase A<sub>2</sub> activity in *Tobacco hornworms*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 52 (1): 1-6.
- Tutkun E, Çakmakçı L ve Bosgelmez A** (1987) Bal arısı kolonilerinde *Bacillus thuringiensis* preparatlarının büyük mum güvesi (*G. Mellonella*) larvalarına karşı kullanım olanakları üzerinde araştırmalar. *TÜBİTAK, Tarım ve Ormanlık Araştırma Grubu, Tarımsal Mikrobiyoloji Ünitesi* Proje no: Tarmik, s. 8-34.
- Ursini F, Maiorino M, Valente M, Feri L and Gregolin C** (1982) Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta.*, 710: 197-211.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Uzunhisarcikli M, Kalender Y, Dirican K, Kalender S, Ogutcu A and Buyukkomurcu F** (2007) Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 87 (2): 115-122.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M and Scoullou M** (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64: 178-189.
- Van Sumere C F, Albrecht J, Dedoner A, De Pooter H and Pe I** (1975) Plant proteins and phenolics. *The Chemistry and Biochemistry of Plant Proteins*, eds. J. B. Harborne and C. F. Van Sumere, Academic Press, New York, pp. 211-256.
- Vasseur P and Leguille C** (2004) Defense systems of benthic invertebrates in response to environmental stressors. *Environ. Toxicol.*, 19: 433-436.
- Vontas J G, Small G J and Hemingway J** (2001) Glutathione-S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *J. Biochem.*, 357: 65-72.
- Wadleigh R W** (1988) Metabolism of an organothiocyanate allelochemical by glutathione transferase in three lepidopterous insects. *J. Econ. Entomol.*, 81: 776-780.
- Wang Y, Oberley L W and Murhammer D W** (2001) Evidence of oxidative stress following the viral infection of two lepidopteran insect cell lines. *Free Rad. Biol. Med.*, 31: 1448-1455.
- Wang Q, Shi G, Song D, Rogers D J, Davis L K and Chen X** (2002) Development, survival, body weight, longevity, and reproductive potential of *Oemena hirta* (Coleoptera: Cerambycidae) under different rearing conditions. *J. Econ. Entomol.*, 95: 563-569.
- Wei S H, Clark A G and Syvanen M** (2001) Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione-S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 1145-1153.
- Weinhold L C, Ahmad S and Pardini R S** (1990) Insect glutathione-S-transferase: predictor of allelochemical and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95: 355-363.
- Whitcomb W J** (1946) Feeding bees for comb production. *Glean. Bee Cult.*, 74: 198-202.
- Wiedenmann R N, Smith J W and Darnell P O** (1992) Laboratory rearing and biology of the parasite *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) using *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) as a host. *Environ. Entomol.*, 21: 1160-1167.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Yacobson B, Navarro S, Donahaye E J, Azrielli A, Sloyevsky Y and Ephrati H** (1997) Control of beeswax moths using carbondioxide in flexible plastic and metal structure. *In: Proc. Int. Conf., Controlled Atmosphere and Fumigation in Grain Storages*, 21-26 April 1996, Nicosia Cyprus, pp. 169-174.
- Yu S J** (1993) Induction of detoxification enzymes in phytophagous insects: Roles of insecticide synergists, larval age, and species. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 24: 21-32.
- Yu S J** (1996) Insect glutathione-S-transferase. *Zool. Stud.*, 35: 9-19.
- Yu S J** (2004) Induction of detoxification enzymes by triazine herbicides in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 80: 113-122.
- Zalucki M P, Clarke A R and Malcolm S B** (2002) Ecology and behavior of first instar larval lepidoptera. *Ann. Rev. Entomol.*, 47: 361-393.
- Zaman K, MacGill R S, Johnson J E, Amad S and Pardini R S** (1994) An insect model for assessing mercury toxicity: effect of mercury on antioxidant enzyme activities of the housefly (*Musca domestica*) and the cabbage looper moth (*Trichoplusia ni*). *Arch. Environ. Cont. Toxicol.*, 26: 114-118.
- Zapata R, Specty O, Grenier S, Febvay G, Pageaux J F, Delobel B and Castane C** (2005) Carcass analysis to improve a meat, based diet fort he artificial rearing of the predatory mirid bug *Dicyphus tamaninii*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 60: 84-92.
- Zeng F, Shu S, Ramaswamy S B and Srinivasan A** (2000) Vitellogenin in pupal hemolymph of *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 93: 291-294.
- Zeren O, Dikmen N, Kumbur H ve Taga S** (1998) İçel İlinde Tarımsal Kesimde Çalışan Bazı Kişilerin Plazmalarında Kolinesteraz Aktivite Değişiminin Araştırılması. *Turk J. Entomol.*, 22: 199-205.
- Zhou H A and Syvanen M** (1997) A complex glutathione transferase gene family im the housefly *Musca domestica*. *Mol. Gen. Genet.*, 256: 187-198.

## ÖZGEÇMİŞ

Meltem ERDEM 1986'da Zonguldak'da doğdu, İlk ve orta öğrenimini aynı ilde tamamladı. Zonguldak Atatürk Anadolu Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2005 yılında Samsun Ondokuzmayıs Üniversitesi (OMÜ) Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne girdi, 2009 yılında Samsun Ondokuzmayıs Üniversitesinden mezun olduktan sonra aynı yıl girdiği ZKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programını sürdürmektedir.

### **ADRES BİLGİLERİ:**

Adres: Bahçelievler Mah. Dr. Aslanebiri Sok.

Fatih Apt. No: 14

Merkez / ZONGULDAK

Tel : (372) 257 69 16

E-posta: meltemerdem1927@hotmail.com

---

Meltem ERDEM