

**KONAK UN GÜVESİ *Ephestia kuehniella* ZELLER, 1879
(LEPIDOPTERA: PYRALİDAE) LARVALARININ
HEMOLENF PROTEİNLERİ ÜZERİNE
EKTOPARAZİTOİD *Bracon hebetor* SAY, 1836
(HYMENOPTERA: BRACONİDAE)'UN PARAZİTİK
ETKİLERİ**

Hülya ALTUNTAŞ

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak – 2007

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hülya ALTUNTAŞ'ın " Konak Un Güvesi *Ephestia Kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarının Hemolenf Proteinleri Üzerine Ektoparazitoid *Bracon Hebetor* Say, 1836 (Hymenoptera: Braconidae)'un Parazitik Etkileri " başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 22.12.2006 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı):	Prof. Dr. A. YAVUZ KILIÇ
Üye:	Prof. Dr. AHMET ÖZATA
Üye:	Yrd. Doç. Dr. EYLEM GÜNDÜZ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi**

**KONAK UN GÜVESİ *Ephestia kuehniella* ZELLER, 1879
(LEPIDOPTERA: PYRALİDAE) LARVALARININ HEMOLENF
PROTEİNLERİ ÜZERİNE EKTOPARAZİTOİD *Bracon hebetor* SAY, 1836
(HYMENOPTERA: BRACONİDAE)'UN PARAZİTİK ETKİLERİ**

Hülya ALTUNTAŞ

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman : Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ

II. Danışman : Doç. Dr. Hülya SİVAS

2007, 50 sayfa

Bu çalışmada, gregar, idiobiont ve ektoparazitoid *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae)'un, konak un güvesi *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) olgun larvalarının hemolenf plazma proteinleri üzerindeki parazitik etkileri, spektrofotometrik ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez yöntemleri ile araştırılmıştır.

Hemolenfteki total plazma protein konsantrasyonu parazitlenmeden 24 ve 48 saat sonra giderek azalmıştır. Elektroforetik olarak ayrılan hemolenf proteinlerinde parazitlenmeye bağlı yeni protein belirlenmemiştir. Densitometrik olarak analiz edilen toplam 25 protein bandından 55.3, 39.4, 37.2, 35.6, 33.9, 29.6, 24.6, 23.1, 14.5 kDa'luk proteinler parazitlenmeye bağlı olarak %50'nin üzerinde azalırken; 52.0, 44.6, 19.0, 24.6 kDa'luk protein bantları parazitlenmeye bağlı olarak artış göstermişlerdir.

Sonuç olarak parazitizmin, konak hemolenf plazma proteinleri üzerinde kantitatif olarak değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bracon hebetor*, *Ephestia kuehniella*, Hemolenf Proteinleri, Ektoparazitoid.

ABSTRACT**Master of Science Thesis****EFFECTS OF PARASITISM BY ECTOPARASITOID *Bracon hebetor* SAY,
1836 (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) ON HOST HEMOLYMPH
PROTEINS OF THE MEDITERRANEAN FLOUR MOTH *Ephestia
kuehniella* ZELLER, 1879 (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)****Hülya ALTUNTAŞ****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor : Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ****Co-supervisor : Assoc. Prof. Dr. Hülya SİVAS****2007, 50 pages**

In this study, the effects of parasitism by gregarious, idiobiont and ectoparasitoid *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) on host hemolymph plasma proteins of the mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) last instar larvae were investigated. Hemolymph plasma proteins were analyzed by using spectrophotometric and Sodium Dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) methods.

Total amount of plasma proteins in host hemolymph were reduced gradually on 24 and 48 hours after parasitization treatment. 55.3, 39.4, 37.2, 35.6, 33.9, 29.6, 24.6, 23.1, and 14.5 kDa proteins in total 25 protein bands, which were analyzed as densitometric, reduced over the 50%, on the other hand, four bands as 52.0, 44.6, 19.0 and 24.6 kDa protein bands pointed out related to the parasitism were increased.

As a result, parasitism of *E. kuehniella* by *B. hebetor* was demonstrated to cause quantitative changes in the plasma proteins of host hemolyph.

Keywords: *Bracon hebetor*, *Ephestia kuehniella*, Hemolymph proteins, Ectoparasitoid.

TEŞEKKÜR

Çalışma konumun belirlenmesinde ve yaptığım çalışma süresince desteğini esirgemeyen tez danışmanlarım sayın Prof. Dr. A.Yavuz KILIÇ ve sayın Doç. Dr. Hülya SİVAS'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada kullandığım canlı materyali edindiğim ve bir çok konuda bana yardımcı olan sayın Yard. Doç. Dr. Eylem AKMAN GÜNDÜZ'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuar çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Meral YILMAZ ve Araş. Gör. Rasime DEMİREL'e teşekkür ederim.

Çalışma süresince benden maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen çok değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Hülya ALTUNTAŞ
Ocak - 2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	7
1.1.1. <i>Bracon hebetor</i> Say, 1836	7
1.1.1.1.Sistematikteki yeri	7
1.1.1.2.Sinonimleri <i>Bracon hebetor</i> Say, 1836	8
1.1.1.3.Yumurta	8
1.1.1.4.Larva	8
1.1.1.5.Pupa	9
1.1.1.6.Ergin	10
1.1.1.7.Konakları	10
1.1.2. <i>Ephestia kuehniella</i> Zeller, 1879 (Un güvesi, Değirmen güvesi).....	11
1.1.2.1.Sistematikteki yeri	11
1.1.2.2.Yumurta	12
1.1.2.3.Larva	12
1.1.2.4.Pupa	12
1.1.2.5.Ergin	13
2. MATERYAL VE YÖNTEM	14
2.1. Materyal	14
2.1.1. Konak ve parazitoid stok kültürleri	14
2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	14

2.1.3. Deneyde kullanılan stok çözeltilerin içerikleri ve hazırlanmaları	14
2.2. Yöntem.....	18
2.2.1. Stok konak <i>Ephestia kuehniella</i> kültürlerinin yetiştirilmesi.....	18
2.2.2. Stok parazitoid <i>Bracon hebetor</i> kültürünün yetiştirilmesi.....	18
2.2.3. Hemolenf örneklerinin toplanması	19
2.2.3.1.Parazitlenmemiş konak larvalarından hemolenf toplanması	19
2.2.3.2.Parazitlenmiş konak larvalarından hemolenf toplanması	20
2.2.4. Total hemolenf protein analizi	21
2.2.4.1.Spektrofotometrenin sıfırlanması için kör çözeltilerin hazırlanması	21
2.2.4.2.Standart eğrinin hazırlanması	22
2.2.4.3.Hemolenf örneklerinin total protein analizi	22
2.2.5. Hemolenf örneklerinin elektroforetik analizi	23
2.2.5.1.Elektroforez için protein örneklerinin hazırlanması	23
2.2.5.2.Jellerin hazırlanışı.....	23
2.2.5.3.Hemolenf örneklerinin uygulanması ve elektroforez işlemi	24
2.2.5.4.Fotoğrafı çekilen jeldeki bantların moleküler ağırlıklarının hesaplanması	25
3. BULGULAR	27
3.1. Parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak hemolenf örneklerinde spektrofotometrik yöntem ile belirlenen total protein değişimi	27
3.2. SDS-PAGE yöntemi ile belirlenen parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak hemolenf örneklerindeki protein değişimi.....	28

4. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
5. ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

1.1. Larval konağı parazitlemekte olan ergin dişi <i>B. hebetor</i> ve bırakılan yumurtalar.....	9
1.2. Konak üzerinde gelişmekte olan olgun <i>B. hebetor</i> larvaları	9
1.3. <i>B. hebetor</i> 'un olgun pupa dönemi	10
1.4. <i>Ephestia kuehniella</i> 'nın olgun larval dönemi	12
1.5. <i>Ephestia kuehniella</i> 'nın pupa dönemi	13
1.6. <i>Ephestia kuehniella</i> 'nın ergin dönemi	13
2.1. <i>E. kuehniella</i> olgun larvasından hemolenfin alındığı üçüncü ön abdomen ekstremitesi.....	20
3.1. Parazitlenmeye bağlı olarak <i>E. kuehniella</i> larvalarının hemolenfindeki total protein değişimi	27
3.2. <i>B. hebetor</i> tarafından parazitlenmiş ve parazitlenmemiş <i>E.kuehiella</i> larvalarında hemolenf proteinlerinin SDS-PAGE analizi	29
3.3. Parazitlenmemiş <i>E. kuehniella</i> larvalarında hemolenf proteinlerinin densitometrik analizi.....	30
3.4. <i>E. kuehniella</i> larvalarında parazitlenmeden 24 saat sonra larval hemolenf proteinlerinin densitometrik analizi	31
3.5. <i>E. kuehniella</i> larvalarında, parazitlenmeden 48 saat sonra hemolenf proteinlerinin densitometrik analizi.....	32
3.6. Parazitlenmiş ve parazitlenmemiş <i>E. kuehniella</i> larvalarında bulunan hemolenf proteinlerinin densitometrik olarak karşılaştırmalı analizi	33

ÇİZELGELER DİZİNİ**Sayfa**

2.1. Standart protein çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan miktarlar	22
3.1. Ektoparazitoid <i>B.hebetor</i> tarafından parazitlenen konak <i>E. kuehniella</i> larvalarının hemolenf proteinlerindeki densitometrik farklılıkların parazitlenmemiş konak larvalarındaki protein değerlerine göre %'lik değişimleri	34

1. GİRİŞ

Giderek artan dünya nüfusu, beslenme problemini de beraberinde getirmiştir. Bu problem, besin kaynaklarının ve bu kaynaklardan elde edilen besin maddelerinin en iyi şekilde kullanılma ve korunmasını zorunlu kılmaktadır [1].

Beslenme ihtiyacının karşılanması için tarımsal alanların genişletilmesi, başka sorunlar yaratacağından, birim alandan elde edilen ürün miktarının artırılması problemin bir çözüm yoludur. Özellikle de elde edilen tarımsal ürünlerin depolanmaları sürecinde, hastalık ve zararlılardan meydana gelecek kayıpların önlenmesi gerekmektedir [2].

Hasat sonrası tarımsal ürünler, satış, tohumluk, yemeklik ve yemlik olarak kullanılmak amacıyla farklı tiplerdeki depolarda uzun veya kısa süreli olarak depolanmaktadır. Bu depolama süresince, ürünlerde kalite ve kantite yönünden önemli kayıplara neden olan birçok hastalık ve zararlı bulunmaktadır. FAO (Food and Agriculture of United Organization)'ya göre, hasat sonrası kayıpların ortalama % 10 kadar olduğu ve bu kayıpların da yarısının böceklerden kaynaklandığı bildirilmektedir [3].

Tarımsal zararlı böcekler, üründe gıda kalitesi eksikliği, ağırlık kaybı, çimlenme gücü noksanlığı gibi doğrudan veya dolaylı zararlara yol açmaktadır [2].

Depolarda görülen fitofag böceklerin çoğalma kapasitelerinin ve zarar derecelerinin yüksek oluşu, bu organizmalarla etkili mücadele yönteminin geliştirilmesi gündeme getirmiştir. Tüm tarımsal alanlarda olduğu gibi depolarda da zararlılara karşı en fazla başvurulan mücadele şekli kimyasal mücadeledir [3].

Zararlı popülasyonun %95'i kimyasal yöntemle yok edilebilmektedir. Pestisit kullanımı ile zararlının ekolojik kökeni hakkında bilgi edinmeye gerek duyulmaması ve zararlı popülasyonlarına ait fazla sayıda bireyin öldürülmesiyle zararlının geçici olarak yaptığı etkilerin bastırılması sağlanmaktadır. Kimyasal mücadele, bütün bu olumlu yönlerine karşılık bir çok önemli sorunları da beraberinde getirmektedir. Bunlardan en önemlileri, direncin gelişimi, pestisit maliyetinin yüksek oluşu, faydalı türlerin yok oluşu, insanlar üzerindeki uzun süreli etkileri, çevre ve besin kirliliği gibi çevresel faktörlerdir. Ayrıca zararlıların

tamamen yok edilmesi mümkün değildir. Ancak, en uygun yöntem ya da yöntemler dizisi kullanılarak kontrol altında tutulmaları mümkündür. Bu yüzden tarım ürünlerini zararlıların etkisinden korumak için farklı yöntemler geliştirilmiştir [4].

Besinsel kaynakların ve maddelerinin zararlı böceklerle karşı korunmasında kimyasal yöntemlerin dezavantajlarının fazla olması, kimyasal mücadelenin dışında bir çözüm olarak, parazitoid böcekler ile zararlı böceklerin kontrolü çalışmalarına yani biyolojik savaş çalışmalarına ağırlık verilmesine neden olmuştur [5].

Biyolojik savaş, genel olarak zararlı bir türün popülasyonunun, onun doğal düşmanı olan bir başka canlı türün popülasyonu tarafından baskılanmasını ifade etmektedir [6-8].

Biyolojik savaşta baskılama aracı olarak kullanılan tür, **biyolojik kontrol ajanı** olarak adlandırılmaktadır. Biyolojik kontrol ajanı olarak parazitler, parazitoidler, predatörler, bakteriler ve virüsler kullanılabilir. Parazitoidler bu biyolojik kontrol ajanlarından sadece bir tanesini oluşturmaktadır. Parazitoitlere ergin öncesi evredeki gelişimleri süresince gerekli besini temin eden canlıya **konak** adı verilir. Parazitoidlerin konakları Hymenoptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera, Heteroptera, Homoptera ordolarına ait türler olabilirler. Parazitoidler, yumurtalarını bıraktıkları konağın evresine göre; **yumurta, larva, prepup, pup** yada **ergin** parazitoidler olarak adlandırılırlar [6, 7]. Ayrıca parazitoidler, bir konaktan çıkan ergin sayısına göre de **soliter** yada **gregar** olarak da adlandırılırlar. Soliter parazitoidlerde konağa sadece bir yumurta bırakılır ve gelişim sonucunda bir ergin parazitoid meydana gelir. Gregar parazitoidlerde ise konağa çok sayıda yumurta bırakılarak çok sayıda ergin birey gelişir [6, 8].

Vinson (1975)'e göre parazitoidler, konakları ile olan ilişkilerinin evrimsel tarihi süresince konaklarını kendi çıkarları için kullanmayı sağlayacak özel mekanizmaları oldukça başarılı şekillerde geliştirmişlerdir [9].

Askew ve Shaw (1986), parazitoidlerini yumurta bırakmadan önce konağı etkileme durumlarına göre **koinobiont** ya da **idiobiont** olarak sınıflandırmışlardır. İdiobiont parazitoidler, konağa yumurta bırakımından yani ovipozisyonundan önce

konağın gelişmesini durduran parazitoidlerdir. İdiobiont parazitoidler, konağın gelişimini durdurmak için konağı paralize (felç) ederler. İdiobiont parazitoidler konağın fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarını durdurduklarından ergin öncesi gelişimleri için gerekli besinler sınırlandırılmıştır. Koinobiont parazitoidler ise ovipozisyondan sonra konağın gelişmesine ve beslenmesine izin veren böceklerdir. Bu ilişkide konak, hareketine devam edebilir ve kendini savunabilir. Özellikle de larval konaklar parazitoid pupa oluncaya kadar ölmezler [8-11].

İdiobiont ektoparazitoidler yumurta bırakmadan önce konaklarını geçici veya sürekli olarak felç edecek toksin veya zehir enjekte ederler. Böylece hareket etmeyen konağa yumurta bırakımı kolaylaştırıldığı gibi yumurtaların konak üzerinden düşmesi de engellenir [7, 8, 11].

Parazitoidlerin konaklarına bağlı gelişimlerinde farklı biçimler vardır. Çoğunlukla rastlanılan parazitoid-konak ilişkisinde, endoparazitoidler yumurtalarını konağın içine yani vücut boşluğuna bırakırlar. Endoparazitoidlerin ergin öncesi dönemleri yarı-sıvı besinle beslenmeye adapte olmuş, vücutları silindirik, ince kutikula ve hareket yetenekleri çok azdır. Parazitoid-konak ilişkisindeki diğer bir durumda ise parazitoidler, yumurtalarını konağın yüzeyine bırakarak ektoparazitoid olarak canlılıklarını devam ettirirler [8, 10, 11].

Ektoparazitoidler çoğunlukla idiobiont, endoparazitoidler ise koinobiontturlar [12]. Ektoparazitoidlerin konak aralığı endoparazitoidlere göre daha geniştir. Bunun nedeni ise konaklarının içinde gelişmediklerinden özel bir çevreye gereksinim duymamalarıdır [8].

Quicke (1997), taksonomik olarak parazitoidlerin yaklaşık %80'inin Hymenoptera ordosuna ait olduğunu bildirmektedir [11]. Ayrıca Godfray (1994), tanımlanan türler içinde yaklaşık ellibin parazitoid türün Hymenoptera'ya ait olduğunu bildirmiştir. Hymenopter parazitoidler, biyolojik mücadele çalışmalarında özellikle de Lepidoptera takımına ait zararlıların mücadelesinde kullanılmaktadırlar [13].

Hymenoptera ordosuna dahil parazitoid türlerin büyük bir çoğunluğu haplodiploid türlerdir. Bunlarda genel olarak dişiler diploit, erkekler haploittir. Bu parazitoid türlerin dişileri, oğul döllerindeki eşey oranlarını, konağa bırakacakları yumurtaların döllenmiş veya döllenmemiş olmalarına göre tayin edebilirler.

Parazitoid dişiler, ovipozitör olarak adlandırılan uzun túbüler yapıda bir yumurta bırakma borusuna sahiptirler. Böylece dişiler, yumurtalarını konağın üzerine yada içine ovipozitörleri aracılığı ile bırakırlar [8].

Parazitik bir türün biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmasında ortaya çıkan en önemli problem, parazitin laboratuvar koşullarında kitle halinde yetiştirilmesidir. Bunu sağlayabilmek için parazitin beslenmesi sırasında doğadan aldıklarının yerini tutabilecek sentetik besinlerin hazırlanması gerekmektedir. Bu yüzden kullanılacak böcek türünün besinsel ihtiyaçlarının iyi bilinmesi gerekmektedir [5].

Parazitoidlerle konakları arasındaki ilişki, sonu ölümle biten bir saklambaç oyununa benzer. Bu oyun onlar arasında sürekli bir mücadeleye ve birbirlerine karşı sürekli savunma sistemleri geliştirmelerine neden olur. Parazitoid ile konak arasındaki fizyolojik ilişkiler, biyolojik kontrolün temelini oluşturmaktadır. Bu nedenle, laboratuvar koşullarında parazitoidlerin kitlesel olarak üretilmesinde ve biyolojik kontroldeki başarı her şeyden önce, konak ve parazitoide ait biyolojik özelliklerin, konak ile parazitoid arasındaki davranışsal ve fizyolojik ilişkilerin, bu ilişkilerde etkili olan fiziksel, kimyasal ve mekanik etkileşimlerin iyi bilinmesine bağlıdır [1, 6, 7, 13].

Sminth ve Pimentel (1969)'e göre parazitoid ve konağın özellikleri sadece ergin öncesi gelişim süresini değil parazitoidin ergin olduktan sonraki bazı fizyolojik aktivitelerini de etkilemektedir [13]. Özellikle de holometabol türlerin ergin öncesi evrelerdeki besinsel ihtiyaçları fazlasıyla değiştiğinden, besin çeşidi ergin büyüklüğü ve eşeyssel verim gibi birçok fizyolojik aktivite üzerinde etkilidir [6, 8, 14].

Parazitoidin ergin öncesi gelişiminde vücudunda depolanan besin miktarı, konağının ona sağladığı besin miktarı ile yakından ilgilidir. Canlıların değişik fizyolojik faaliyetlerinin ortaya çıkmasında, aldıkları temel besin maddeleri (karbohidrat, lipit ve proteinler) ve depoladıkları diğer besin elemanları etkili olmaktadır. Ergin parazitoidlerin bir çoğu yaşamlarını sürdürebilmek, üreyebilmek ve diğer bir çok biyolojik aktiviteyi gerçekleştirebilmek için karbohidrat, lipit ve proteine ayrıca belirli tuzlara ihtiyaç duyarlar. Bu

ihtiyaçlarının bir kısmı çevredeki kaynaklardan karşılarken bir kısmı ergin öncesi evrede depoladıkları temel besin maddelerinden sağlanmaktadır [6].

Gross (1993)'e göre, konak, parazitoidin saldırılarına karşı zavallı bir kurban gibi, tepkisiz kalarak ona uygun bir yem ve yetişme ortamı olmaz. Konak, konak-parazitoid ilişkilerinin ilk evrelerinden itibaren, parazitoidlere karşı hem davranış yoluyla hem de fizyolojik olarak tepki gösterir [6].

Parazitoidlerin konaklarının fizyolojik ve endokrinolojik faaliyetleri üzerine etkili oldukları bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda parazitliğin karbonhidrat, protein, amino asit , yağ asitlerinin konsantrasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır [15-20].

Parazitoidlerin in vitro ortamda hazırlanma tekniklerinin kullanılması ile doğal düşmanların besinsel biyokimyası belirlenmiş ve doğal düşmanların kalitatif ve kantitatif gereksinimleri tespit edilmiştir. Ayrıca parazitoidlerin davranışsal, genetiksel, besinsel ve fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi de bu teknikler sayesinde gerçekleşmiştir [21].

Böceklerin yağ dokusu, temel besin maddelerinin yani karbohidratların, yağların ve proteinlerin sentezlenmesinden ve depo edilmesinden sorumludur [22, 23].

Yağ doku en gelişmiş halini birçok holometabol böceğin larvasında gösterir. Arıların gelişmiş larvalarında tüm vücut ağırlığının %60-65'i yağ dokudan oluşmuştur. Yağ doku, omurgalı hayvanların karaciğerine analog bir organdır [24].

Böceklerin hemolenfi gelişimsel, fizyolojik ve immunolojik faaliyetlerde önemli görevleri olan çok sayıda protein içermektedir. Özellikle de bazı proteinler hemolenfin fonksiyonları üzerinde oldukça etkilidirler [25]. Hemolenfteki protein miktarı, gelişme sırasında, özellikle de metamorfozdan önce yada metamorfoz sırasında büyük değişimler gösterir [24].

Levenbook (1985) böceklerde protein granüllerinin pup evresinde yağ dokuda depo edildiğini belirtmiştir. İlk defa larvanın yağ dokusunda sentezlenen bu proteinler, özellikle son larval evrenin beslenme fazı boyunca hemolenfte bol miktarda bulunmuştur. Holometabol böceklerin gelişim dönemlerinde larval evrenin plazma proteinleri, başkalaşımın devam edebilmesi için oldukça önemlidir.

Hemolenf proteinlerinin büyük bir bölümü özellikle de depo proteinleri, böceğin larval gelişimi sırasında yağ doku tarafından sentezlenirler ve hemolenfe salınırlar. Böceğin gelişiminin devam etmesi ile birlikte, bu proteinler pupal dönemde yağ doku içerisinde protein granülleri şeklinde çökerler. Daha sonra da ergin gelişiminde gerekli olan amino asit kaynaklarını sağlayabilmek için proteolitik olarak amino asitlerine parçalanırlar [26].

Böcek hemolenfi çeşitli proteinler içermektedir. Bunlar vitellogenler, depo proteinleri, enzimler, hormonlar ve konağın hücre sel savunma reaksiyonları ile ilgili proteinlerdir [27].

Birçok Hymenopter parazitoidlerin parazitliğindeki ortak özellik konaklarının hemolenf kompozisyonunda değişiklikler meydana getirmeleridir [28].

Lepidoptera larvalarının Braconidae ve Ichneumonidae'ye ait parazitoidler tarafından parazitlenmeleri, bu konakların hemolenf proteinleri üzerinde ve buna bağlı olarak konak fizyolojisi üzerinde oldukça etkili olmuştur. Parazitliğin konağın plazma proteinleri üzerinde meydana getirdiği değişiklikler birçok çalışmada araştırılmıştır [16-18,26,29,30].

Bazı parazitler, peptit veya proteinler salgılayarak konağın fizyolojisi ve gelişimini bozmaktadır. Parazitlenmiş erginlerde, vitellogen sentezi çoğunlukla engellenmiş ve premetamorfik evrelerde arilforin (depo proteini) sentezi önlenmiştir. Sonuçlar parazitin konak böceklerde protein sentezi ve kullanımı üzerine bir çok etkisinin olduğunu göstermektedir [17,20].

Parazitlenmeden sonra, konak hemolenfinde, elektroforetik yöntemle ayrışabilen proteinlerin sayısında, protein konsantrasyonlarında, farklı amino asit tiplerinde, hormonal faktörlerde, donma noktasında, kuru ve spesifik ağırlıkta değişikliklerin olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, parazitlenmeye bağlı olarak hemolenf melaninleşmesinin inhibisyonu, hemolenfteki hemositlerin dağılımı ve trehaloz şeker düzeyleri üzerinde de değişiklikler meydana gelmektedir [30,31].

İdiobiont parazitoidlerin gelişimleri sırasında konakları çok az yada hiç biyokimyasal veya fizyolojik değişimler göstermediği halde koinobiont parazitoidlerin konaklarından faydalanmaları sırasında, konak ve parazitoid

arasında oldukça kompleks değişimler devam etmektedir [9]. Endoparazitoidin gelişimine bağlı olarak konak hemolenfinde biyokimyasal tepkiler veren özel işaretler meydana gelmektedir [30].

Hymenopter endoparazitoidler, konakta bazı biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklere neden olmakta ve bu değişiklikler konağın gelişim oranına, besin kullanımına ve başkalaşımına etki etmektedir [19].

Bu çalışmanın amacı bir ektoparazitoid olan *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae)'un konak un güvesi *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarındaki hemolenf plazma proteinleri üzerine parazitik etkisinin olup olmadığını belirlemektir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. *Bracon hebetor* Say, 1836

B. hebetor (Hymenoptera: Braconidae), larval gelişimini Lepidoptera takımının değişik türlerinde tamamlayan gregar, larval, ektoparazitoiddir. Parazitoidin gelişimini tamamladığı Lepidopter türleri, yani konakları tarım ürünlerinde ekonomik yönden oldukça büyük zarar meydana getirmektedir [1]. *B. hebetor* hızlı ve kısa zamanda gelişimini tamamladığı için oldukça önemli bir doğal düşmandır ve depo zararlılarının mücadelesinde başarıyla kullanılmaktadır [32].

1.1.1.1. Sistematikteki yeri

Şube : Arthropoda

Sınıf: Insecta (Hexapoda)

Altsınıf: Pterygota (Metabola)

Takım : Hymenoptera (Zar kanatlı)

Alttakım: Apocrita

Üst familya : Ichneumonoidea

Familya : Braconidae

Altfamilya : Braconinae

Cins : *Bracon* Fabricius, 1804

Tür : *Bracon hebetor* Say, 1836 [32]

1.1.1.2. Sinonimleri *Bracon hebetor* Say, 1836

Bracon dorsator Say, 1836

Bracon brevicornis Kirby, 1884

Bracon juglandis Ashmead, 1889

Habrobracon hebetor Johnson, 1895

Bracon (Habrobracon) honestor Riley and Howard, 1895

Habrobracon beneficentior Viereck, 1911

Habrobracon brevicornis Cushman, 1914

Habrobracon juglandis Cushman, 1922 [31]

1.1.1.3. Yumurta

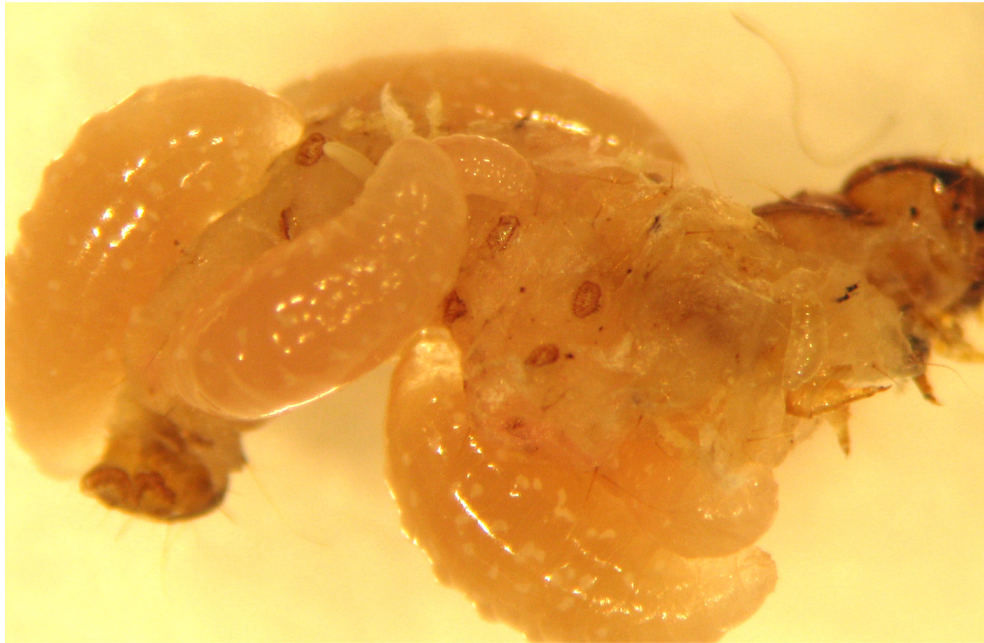
B. hebetor'un yumurtaları kaygan, parlak ve oval biçimde olup, uçları hafif şeffaf olmak üzere rengi beyazdır [34].

1.1.1.4. Larva

Larvaların rengi, üzerinde beslendiği konağa göre değişmekle birlikte, genellikle beyaz-krem, sarı veya pembedir [34].



Şekil 1.1. Larval konağı parazitlemekte olan ergin dişi *B. hebetor* ve bırakılan yumurtalar [33].



Şekil 1.2. Konak üzerinde gelişmekte olan olgun *B. hebetor* larvaları

1.1.1.5. Pupa

Pupa, serbest pupa tipinde olup, krem sarı renktedir ve kokon içinde hafifçe hareket edebilir [34].



Şekil 1.3. *B. hebetor*'un olgun pupa dönemi

1.1.1.6. Ergin

Erginlerin vücut ölçüsü ve rengi beslenme ve sıcaklık derecesine göre değişmektedir. Erginlerin rengi, sarıdan koyu kahverengine kadar değişen renklerde dir. Kanat çevresi kısa tüylü olup, kanatlar kirli sarı ve kahverengi görünüştendir. Dişiler ortalama $2,482\pm 0,026$ mm, erkekler ise $2,436\pm 0,037$ mm uzunluğundadır [34].

1.1.1.7. Konakları

Kılınçer (1976)'e göre *B. hebetor*'un Lepidoptera, Coleoptera ve Hymenoptera takımlarının çeşitli familyalarına bağlı otuzu aşkın konağı vardır. Bu konakların büyük çoğunluğu Lepidoptera takımına aittir. Bazı önemli konak türleri aşağıda verilmiştir;

Carpocapsa pomonella L. (Lep: Tortricidae)

Ephestia cautella Walk. (Lep: Pyralidae)

Ephestia elutella Hb. (Lep: Pyralidae)

Ephestia kuehniella Zell. (Lep: Pyralidae)

Galleria mellonella L. (Lep: Galleriidae)
Grapholitha molesta Busck (Lep: Tortricidae)
Pectinophora gossypiella Saund. (Lep: Gelechiidae)
Plodia interpunctella Hb. (Lep: Pyralidae)
Polychrosis viteana Clem. (Lep: Tortricidae)
Pyrausta nubilalis Hb. (Lep: Pyraustidae)
Sitotroga cerealella Ol. (Lep: Gelechiidae) [33]

1.1.2. *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 (Un güvesi, Değirmen güvesi)

Ephestia türlerinin tümü sadece depo zararlısıdır. Depo edilmiş tahıl, un ve bitki tohumları zarar verdikleri başlıca maddeler arasındadır. Tipik birçok fizyolojik ve anatomik özellik göstermeleri ve aynı zamanda çoğalma yeteneklerinin fazla olmasından dolayı da araştırmalarda deney hayvanı olarak tercih edilmektedir [4].

E. kuehniella, unda birinci derecede, tahıllarda ikinci derecede zararlı olarak bilinmektedir. Tahıl ve tahıl ürünlerini yenemez hale getirmesi yönünden ve ürünün azda olsa bulaşık olmasının ticari problemlere yol açması bakımından bu türlerle mücadele büyük önem kazanmaktadır [34].

1.1.2.1. Sistematikteki yeri

Şube : Arthropoda

Sınıf : Insecta (Hexapoda)

Alt sınıf : Pterygota (Metabola)

Takım : Lepidoptera (Kelebekler)

Alt takım : Frenata (Heteroneura)

Familya : Pyralidae

Cins : *Ephestia*

Tür : *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 (Un güvesi) [33].

1.1.2.2. Yumurta

Dişi, un ya da diğer larval gıdalara ayrı ayrı 100 yumurta bırakır. Açık sarımsı renkte olan bu yumurtalar 27°C de 3-5 günde açılır [24].

1.1.2.3. Larva

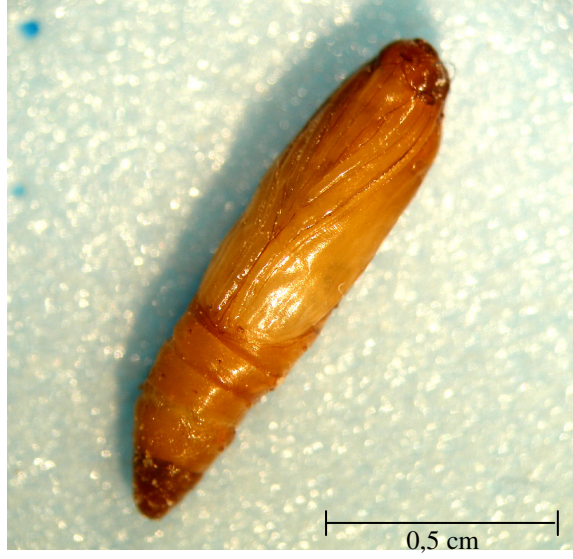
Yumurtadan çıkan larvalar beyazımsı renktedir. Bazı protoraks ve sonuncu abdomen segmenti üzerinde kahverengi lekeler bulunur. Larva süresi 40 gündür ve bu 40 gün sonunda tam kahverengi olurlar, olgun larva yaklaşık 15 mm uzunluğundadır. Larva 5 kez deri değiştirir (5 instar dönemi vardır) [24].



Şekil 1.4. *E. kuehniella*'nın olgun larval dönemi.

1.1.2.4. Pupa

Olgunlaşan larva, bir kokon içerisinde pup olur. Yaklaşık olarak 9 mm boyundadırlar. Pupa evresi yaklaşık 8-12 gün sürer. Bu sürenin sonunda ergin hale geçerler [24].



Şekil 1.5. *E. kuehniella*'nın pupa dönemi.

1.1.2.5. Ergin

Ergin, koyu kül rengindedir [33]. Ergin güve 7-12 mm uzunluğunda ve bu uzunluk kanatlar açıkken 24 mm'ye kadar çıkabilir. Ön kanatlar soluk gri renktedir ve kanatlar üzerinde koyu renkte zig zag bantlar bulunmaktadır. Arka kanatlar ise kirli beyazdır. Dinlenme halinde vücudun ön bölümü, karakteristik olarak, kemer şeklindedir [24].



Şekil 1.6. *E. kuehniella*'nın ergin dönemi.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Konak ve parazitoid stok kültürleri

Bu çalışmada parazitoid olarak idiobiont bir ektoparazitoid olan *B. hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae), konak olarak da un güvesi *E. kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) kullanılmıştır. Konak ve parazitoidin laboratuvar stok kültürleri 19 Mayıs Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hayvan Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarından sağlanmıştır.

2.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler

1-Fenil-2-tioüre (Sigma), Sığır serum albumin (Sigma), Coomassie Blue G-250 (Sigma), Akrilamid+N.N'-Metilen Bis Akrilamid (%30, Sigma), Tris base (Sigma), Sodyum dodesil sülfat (Fluka), Amonyumpersülfat (Sigma), Sodyum hidroksit (Fluka), Hidrojen klorür (Fluka), Gliserol (Amresco), 2-merkaptoetanol (Sigma), Bromfenol mavisi (Sigma), Tetra Etil Metilen Diamin (Sigma), N-butanol (Sigma), Glisin (Fluka), Metanol (Fluka), Glasiyel Asetik asit (Sigma), Geniş aralıklı protein moleküler ağırlık standartı (Sigma) ve Düşük aralıklı protein moleküler ağırlık standartı (Sigma).

2.1.3 Deneyde kullanılan stok çözeltilerin içerikleri ve hazırlanmaları

Stok standart protein çözeltisi

Kullanım: Total protein analizi deneyi (konsantrasyonu 1mg/ml olarak).

Sığır serum albumin.....1 mg

Deiyonize su.....1 ml

Standart distile su içinde çözündürülür. Stok kullanımdan hemen önce hazırlanır ve +4°C'de bekletilir.

1.5 M Tris pH 8.8

Kullanım amacı: SDS-PAGE deneyi, ayırma jeli tamponu.

Tris base..... 18.16 gr

Deiyonize su 100 ml'ye tamamlanır.

Tris, deiyonize su içinde çözdürülerek 3N HCL ile pH'ı 8.8'e ayarlanır.

Hazırlanan çözelti Whatman no:1 filtre kağıdından filtre edilerek, otoklav edilir ve oda sıcaklığında karanlıkta saklanır.

1 M Tris pH 6.8

Kullanım amacı: SDS- PAGE deneyi, yükleme jeli tamponu.

Tris base..... 12.11 gr

Deiyonize su..... 100 ml'ye tamamlanır.

Tris, deiyonize su içinde çözdürülerek 3 N HCL ile pH'ı 6.8'e ayarlanır.

Hazırlanan çözelti Whatman no:1 filtre kağıdından filtre edilerek, otoklav edilir ve oda sıcaklığında karanlıkta saklanır.

% 10 Sodyum dodesil sülfat

Kullanım amacı: SDS- PAGE deneyi

Sodyum dodesil sülfat.....5 gr

Deiyonize su.....50 ml'ye tamamlanır.

Sodyum dodesil sülfat, deiyonize su içinde çözdürülerek oda sıcaklığında karanlıkta saklanır.

% 10 Amonyumpersülfat

Kullanım amacı: SDS- PAGE deneyi, polimerizasyon başlatıcısı.

Amonyumpersülfat.....0.1 gr

Deiyonize su.....1 ml'ye tamamlanır.

Kullanılmadan hemen önce hazırlanır, amonyumpersülfat, deiyonize su içinde çözdürülerek

5X Koşturma tamponu (pH 8.3)**Kullanım amacı:** SDS- PAGE deneyi.

Tris base.....3.75 gr

Glisin.....18 gr

Sodyum dodesil sülfat.....5 gr

Deiyonize su 250 ml'ye tamamlanır.

Kullanımdan hemen önce, tris base, glisin ve SDS tartılıp 250 ml.'lik balon jolye konularak deiyonize su ile çözündürülür. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 1 N NaOH veya 1 N HCL kullanarak 8.3'e ayarlanır. Tampon 5X olarak hazırlandığı için kullanılmadan önce 5 kez sulandırılarak 1X'e ayarlanır.

2X Örnek uygulama tamponu (0.125 M Tris, % 4 SDS, % 20 Gliserol, % 10 2-merkaptotanol, % 0.2 Bromfenol mavisi pH 6.8)**Kullanım amacı:** SDS- PAGE deneyi.

1M Tris2.5 ml

%10 SDS.....4 ml

Gliserol.....2 ml

2-merkaptotanol.....1 ml

Bromfenol mavisi.....0.02 gr

Deiyonize su.....10 ml'ye tamamlanır.

Yukarıdaki maddeler deiyonize su içinde karıştırılıp çözündürülür ve pH' 6.8'e 1 N HCL ile ayarlanır. Hazırlanan çözelti küçük eppendorflara eşit hacimlerde bölünerek -20°C'de saklanır.

Boyama çözeltisi**Kullanım amacı:** SDS- PAGE deneyi, jel boyanması.

Coomassie Brilliant Blue.....1 gr.

Metanol500 ml

Glasiyel asetik asit.....100 ml

Deiyonize su.....1 litreye tamamlanmıştır.

Boya çözüldükten sonra Whatman No:1 filtre kağıdından filtre edilerek karanlıkta oda sıcaklığında saklanır.

Yıkama çözeltisi

Kullanım amacı: SDS- PAGE deneyi, jel yıkanması.

Metanol.....125 ml

Glasiyal Asetik Asit.....175 ml

Deiyonize su.....2200 ml

Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında, karanlıkta saklanır.

Geniş moleküler ağırlıklı protein standart (6.5 – 205 kDa)

Kullanım amacı: SDS- PAGE deneyi, jelde bant analizinde standart olarak.

Miyozin205.0 Kilo Dalton (kDa)

β -Galaktosidaz.....116.0

Fosforilaz b.....97.0

Laktoferrin.....90.0

Sığır serum albumin.....66.0

Glutamik dehidrogenaz.....55.0

Ovalbumin.....45.0

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz.....36.0

Karbonik anhidraz.....29.0

Tripsinojen.....24.0

Tripsin inhibitör.....20.0

α -laktalbumin.....14.2

Aprotinin.....6.5

Yukarıdaki içeriğe sahip standart protein kiti 100 μ l steril deiyonize su içinde çözdürülerek, eşit hacimlerde eppendorf tüplere bölünür ve -20 °C'de saklanır.

Düşük moleküler ağırlıklı protein standart (6.5 – 66 kDa)

Kullanım: SDS- PAGE deneyi, jelde bant analizinde standart olarak.

Sığır serum albumin.....66.0

Glutamik dehidrogenaz.....55.0

Ovalbumin.....45.0

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz.....36.0

Karbonik anhidraz.....29.0

Tripsinojen.....	24.0
Tripsin inhibitör.....	20.0
α -laktalbumin.....	14.2
Aprotinin.....	6.5

Yukarıdaki içeriğe sahip standart protein 100 μ l steril deiyonize su içinde çözdürülerek, eşit hacimlerde eppendorf tüplere bölünür ve -20 °C’de saklanır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Stok konak *E. kuehnielle* kültürlerinin yetiştirilmesi

Bu çalışmada kullanılan un güvesi *E. kuehniella* kültürlerinin oluşturulmasında ana kaynağı, 19 Mayıs Üniversitesinden sağlanan ergin dişi ve erkek bireyler oluşturmuştur. Un güvesi, 25±2 °C sıcaklıkta, % 60±10 bağıl nemde ve sürekli fotoperyot uygulanan etüvlerde yetiştirilmiştir. Besin olarak, 2:1 oranında buğday kepeği ve undan oluşan karışım 60°C’de 3 saat steril edildikten sonra kullanılmıştır. Hazırlanan besin 500 ml’lik cam kavanozlara konularak, her bir cam kavanoza yaklaşık 10’ar adet erkek ve dişi ergin bireyler konulmuştur. Kavanozlar çift katlı tülben ile kapatılarak etiketlenmiştir. Bu işlemler her üç günde bir tekrarlanarak *Ephesia* kültürünün devamlılığı sağlanmıştır. Bu kültürlerden yaklaşık 20-30 gün sonra olgun larvalar ve 35-40 gün sonrada ergin bireyler ortaya çıkmaya başlamıştır. Ergin bireylerden yeni kültürler hazırlanırken, olgun larvaların bir kısmı deneyler için ve bir kısmı da parazitoid *B. hebetor* kültürlerinin oluşturulması için kullanılmıştır.

2.2.2. Stok parazitoid *B. hebetor* kültürünün yetiştirilmesi

Bu çalışmada kullanılan *B. hebetor* kültürlerinin kurulmasında ana kaynağı, 19 Mayıs Üniversitesinden sağlanan ve *E. kuehniella*’nın parazitlenmiş larvalarından elde edilen ergin dişi ve erkek bireyler sağlamıştır. *B. hebetor* 25 ± 2 °C sıcaklıkta, % 55 ± 10 bağıl nemde ve sürekli fotoperyot uygulanan etüvlerde yetiştirilmiştir. Bu yetiştirme ortamlarında erginlerin beslenme gereksinimlerini sağlayacak olan beslenme çözeltilerini % 50 oranında sulandırılmış ve otoklavda

steril edilmiş çiçek balı oluşturmuştur. Bu çözelti nohut büyüklüğündeki pamuklara emdirilerek ergin bireylere verilmiştir. Pupadan çıkan ergin dişi ve erkek çiftlerinin her biri 1x16 cm büyüklüğündeki cam tüplere alınmışlardır. Bu bireylerin beslenmelerine devam edebilmeleri için % 50 bal solusyonuna emdirilmiş birer pamuk taneleri de cam tüplere aktarılmıştır. Dişilerin çiftleştikten sonra yumurta bırakabilmeleri için konak *Ephestia*'nın son dönem olgun larvalarından her tüpe bir tane olacak şekilde konulmuştur. Bu tüplerin ağzı ortasında pamuk bulunan ince kumaş parçası ile kapatılmıştır. Bu işlemler her iki günde bir tekrarlanarak hem kültürün devamı sağlanmıştır hem de çalışmalar için yeterli miktarda bireyler elde edilmiştir Her bir deney serisi için parazitlenme işleminden 24 ve 48 saat sonra onbeşer adet konak larvasından hemolenf toplanmıştır. Hemolenf toplamak için kullanılmayan parazitlenmiş larvalardan ise yaklaşık 9-13 gün sonra yeni ergin dişi ve erkek parazitoid bireyler ortaya çıkmıştır. Bu yeni bireyler de aynı işlemler yapılarak parazitlenme ve kültürün devamlılığı için kullanılmışlardır.

2.2.3. Hemolenf örneklerinin toplanması

B. hebetor'un parazitlemek için kullandığı son dönem olgun konak larvalarından parazitlenme gerçekleşikten 24 ve 48 saat sonra hemolenf toplanmıştır. Deneysel kontrol amacıyla parazitlenmemiş olgun konak larvalarından da hemolenf toplanmıştır.

2.2.3.1 Parazitlenmemiş konak larvalarından hemolenf toplanması

Bu çalışmada yapılan her bir deney için on beş adet konak larvası kullanılmıştır. Konak larvaları -20°C'de 10 dakika tutularak anestezi edilmişlerdir. Anestezi işleminden sonra larvaların yüzeyi % 70'lik etil alkolde yaklaşık 5 dakika süreyle tutularak steril edilmişler ve distile su ile 5 dakika süreyle yıkanmışlardır. Yıkanma işleminden sonra kurutma kağıdı üzerine konulan larvalar işaret ve baş parmak arasında çok fazla sıkmadan tek tek tutularak larvanın ön abdomen ekstremitelerinden üçüncü ekstremit

belirlenmiştir (Şekil 2.1). Bu bacak kaide bölgesinden steril bir cerrahi ince uçlu makas ile kesilmiştir. Kesme işleminden hemen sonra bacağın kaidesinde bulunan mikropiller damarlardan ortaya çıkan yeşil renkli damla halindeki hemolenf, mikropipet ile çekilerek buz içinde bekleyen 1.5 ml'lik eppendorf tüp içine alınmıştır. Tek bir larvadan yaklaşık 2-3 µl hemolenf elde edilmiştir. Hemolenf toplamada kullanılan ve buz içinde bekleyen tüm eppendorf tüplerin içerisine, çok az bir miktarda kristal 1-fenil-2-tioüre konulmuştur. Bu şekilde yeterli miktarda hemolenf toplandıktan sonra hemolenf örnekleri, eppendorf santrifüjde +4°C'de 10.000 g'de 10 dakikada santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant bölümünde bulunan hemolenfin plazma kısmı, hızlı bir şekilde steril bir eppendorf tübe alınmıştır. Bu plazma örnekleri, protein konsantrasyonları ve protein bileşimleri belirleninceye kadar kontrol örnekleri (K) şeklinde etiketlenip toplanma tarihi yazılarak -20°C'de saklanmışlardır.



Şekil 2.1. *E. kuehniella* olgun larvasından hemolenfin alındığı üçüncü ön abdomen ekstremitesi.

2.2.3.2. Parazitlenmiş konak larvalarından hemolenf toplanması

Bu işlemler için iki farklı grup oluşturulmuştur. Birinci grupta, parazitlenme üzerinden 24 saat geçmiş on beş adet konak larvasından hemolenf

toplanmıştır. İkinci grupta ise parazitlenme üzerinden 48 saat geçmiş on beş adet konak larvaları kullanılmıştır. Konak larvaları parazitoid *B. hebetor* tarafından paralyze edildikleri için her iki grupta da larvalara anestezi işlemi yapılmamıştır. Direkt olarak larvaların sterilizasyonu işlemine geçilmiştir. Sterilizasyonda parazitlenmiş larvaların dış yüzeyinde parazitoid yumurta ve larvalarına ait yapıların kalmamasına dikkat edilmiştir. Bu yüzden larvalar % 70'lik etil alkolde 5 dakika süreyle tutulduktan sonra steril distile su içerisinde 10 dakika süresince yıkanmışlardır. Her iki grup için de hemolenf toplanması kontrol örnekleri için anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Santrifüjden sonra temiz eppendorf tüplere alınan plazma örnekleri 24 ve 48 saatlik grup olarak, alınış tarihleri etiketlendikten sonra analiz edilinceye kadar -20°C'de saklanmışlardır.

2.2.4. Total hemolenf protein analizi

Toplanan hemolenf örneklerindeki total protein konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla Bradford (Boya-Bağlama veya Coomassie brilliant blue) yöntemi kullanılmıştır [35]. Bu yöntemde Coomassie brilliant blue G-250 boyasının, farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde 595 nm'de mavi renk ortaya koyması esasından yararlanılmıştır. Standart protein stoğu hazırlandıktan sonra konsantrasyonları bilinen protein çözeltileri hazırlanması için spektrofotometreye gerekli parametreler kaydedilmiştir.

2.2.4.1 Spektrofotometrenin sıfırlanması için kör çözeltilerin hazırlanması

Kör çözeltiler tek kullanımlık protein küvetinde hazırlanmıştır. Küvete 500 µl Coomassie Brilliant Blue G-250 ve 500 µl deiyonize su konularak, karıştırılmıştır. Hazırlanan kör, 5 dakika süreyle bekletildikten sonra 595 nm'de spektrofotometrede okutulmuş ve spektrofotometre sıfırlanmıştır. Bütün okumalar köre karşı yapılmıştır.

2.2.4.2. Standart eğrinin hazırlanması

Standart eğri grafiğinin çıkarılabilmesi ve kaydedilmesi için 7 adet tek kullanımlık protein küvetine çizelge 2.1’de verilen ölçülerde standart protein çözeltileri hazırlanmıştır.

Çizelge 2.1 Standart protein çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan miktarlar

Küvet No	1	2	3	4	5	6
BSA	5 µl	10 µl	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl
Distile su	495 µl	490 µl	480 µl	460 µl	440 µl	420 µl
Coomassie Brilliant Blue G-250	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl

Her küvet tablodaki gibi hazırlanıp, karıştırıldıktan sonra 5 dakika süreyle beklenmiştir. Beş dakikanın sonunda birinci küvetten başlanarak tüm küvetler köre karşı 595 nm’de okunmuştur. Deney sonunda tüm küvetlerdeki protein miktarlarının okuma değerleri (Absorbans değerleri) ve konsantrasyon (µg/ml) değerleri belirlenmiştir.

2.2.4.3. Hemolenf örneklerinin total protein analizi

Analizler için toplanan ve işlem gören hemolenf örnekleri -20°C’den çıkarıldıktan sonra buza alınmışlardır. Üç farklı tek kullanımlık küvet kontrol, parazitlenmiş 24 saatlik ve parazitlenmiş 48 saatlik olarak etiketlenmişlerdir. Etiketlenen her bir küvete 1:10 oranında sulandırılmış kendi hemolenf örneklerinden 10 µl alınarak üzerlerine 490 µl deiyonize saf su ve 500 µl Coomassie Brilliant Blue G-250 konulmuştur. Hazırlanan örnekler 5 dakika bekletildikten sonra köre karşı 595 nm’de okutulmuştur. Bu analiz için “Eppendorf Biophotometer” kullanılmıştır. Deney sonunda spektrofotometrede kayıtlı olan standart eğriye bağlı olarak hemolenf örneklerindeki total protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu konsantrasyon değerlerine uygun olarak da jele yükleme yapılmıştır.

2.2.5. Hemolenf örneklerinin elektroforetik analizi

Toplanan hemolenf örneklerindeki protein bileşiminin belirlenmesi amacıyla yapılan elektroforez işlemi Laemmli (1970)'e göre yapılmıştır. Bu yöntemde “Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforetik (SDS-PAGE)” ayırım yöntemi kullanılmıştır [36].

2.2.5.1. Elektroforez için protein örneklerinin hazırlanması

Analizler için toplanan ve işlem gören hemolenf örnekleri -20°C 'den çıkarıldıktan sonra buza alınarak steril deiyonize su ile 1:10 oranında sulandırılmışlardır. Spektrofotometrik sonuçlar kullanılarak sulandırılmış örneklerden her bir kuyucukta 20 μg olacak şekilde hesaplama yapılmıştır. Bu sonuçlara göre örnek alınarak, üzerlerine hemolenfin üç katı oranında örnek yükleme tamponu eklenerek eppendorf içindeki son hacim steril distile su ile 30 μl 'ye tamamlanmıştır. Eppendorflar içerdikleri hemolenfe göre etiketlenerek, 100°C 'de kaynatılmış su içinde beş dakika süreyle bekletilmişlerdir. Bu sürenin sonunda hemolenf örnekleri yükleme jelindeki kuyucuklara yüklenmişlerdir.

2.2.5.2. Jellerin hazırlanışı

% 11 Ayırma jeli (5 ml)

Akrilamid / Bis akrilamid (% 30).....	1.835 ml
Distile su.....	1.763 ml
1.5 M Tris pH: 8.8.....	1.3 ml
%10 SDS.....	0.05 ml
Amonyum Persülfat (APS).....	0.05 ml
Tetra Etil Metilen Daimin (TEMED).....	0.002 ml

Yukarıdaki çözeltilerden APS ve TEMED haricindekiler steril bir cam behere konulduktan sonra karıştırılmış ve vakumlu hava ile karışımın havası

alınmıştır. Bu işlemten hemen sonra APS ve TEMED hızlı bir şekilde ilave edilip karıştırılmıştır. Elde edilen karışım Mini Jel elektroforezin 0.75 mm aralığa sahip iki cam plağı arasına dökülerek, üst kısma jelin yüzeyinin düz olması ve polimerizasyon için üst kısma su ile doyurulmuş n-bütanol dökülmüştür. Bu işlemler tamamlandıktan sonra polimerizasyon için beklenmiştir.

% 5 Yükleme jeli (3 ml)

Akrilamid / Bis akrilamid (%30).....	0.5 ml
Distile su.....	2.1 ml
1M Tris pH: 6.8.....	0.38 ml
%10 SDS.....	0.03 ml
Amonyum Persülfat (APS).....	0.03 ml
Tetra Etil Metilen Daimin (TEMED).....	0.003 ml

Ayırma jeli polimerizasyonu tamamlandıktan sonra, jelin üzerinde bulunan n-bütanol distile su ile yıkanmıştır. Bu yıkama işlemi üç kez tekrarlanarak n-bütanolün iyice uzaklaşması sağlanmıştır. Yükleme jeli için hazırlanan yukarıdaki karışım, ayırma jelinin üzerine dökülerek hemen tarak yerleştirilmiştir ve polimerizasyonun tamamlanması beklenmiştir. Polimerizasyon gerçekleşikten sonra cam plaklar elektroforez tankına yerleştirilerek tarağın meydana getirdiği çukurlukların seviyesini geçecek şekilde 1X koşturma tamponu konulmuştur.

2.2.5.3. Hemolenf örneklerinin uygulanması ve elektroforez işlemi

1X tamponu elektroforez tankına konulduktan sonra tarak bir uçtan başlayarak kuyucukların bozulmamasına dikkat edilerek yavaşça kaldırılmıştır. Tarak çıkartıldıktan sonra boşalan kuyucuklar tampon ile dolduğundan akımın tam olarak geçmesi için elektroforez tankına bir miktar daha 1X koşturma tamponu eklenmiştir. Daha sonra kuyucuklardan dördüncü kuyucuğa mikropipetör ile (örnek uygulama tamponu ile 3:1 oranında hazırlanmış) geniş aralıklı (Wide range sigma) moleküler ağırlık standardından (MW) 10 µl yüklenmiştir. beşinci kuyucuğa düşük ağırlıklı moleküler ağırlık standardından (low range Sigma) (LM) 10 µl (örnek uygulama tamponu ile 3:1 oranında

hazırlanmış) yüklenmiştir. Birinci kuyucuğa 4.2 bölümünde anlatıldığı gibi hazırlanmış kontrol grubuna ait hemolenf örneği 10 µl yüklenmiştir. İkinci kuyucuğa yine 4.2 bölümünde anlatıldığı gibi hazırlanmış 24 saatlik gruba ait hemolenf örneği 10 µl yüklenmiştir. Üçüncü kuyucuğa ise 4.2 bölümünde anlatıldığı gibi hazırlanmış 48 saatlik gruba ait hemolenf örneği 10 µl yüklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra tankın kapağı kapatılarak sistem güç kaynağına bağlanmıştır. Jelin yürümesi sırasında, boya, yükleme jelinden ayırma jeline gelene kadar güç kaynağı 90 volta, ayırma jelinden sonra 120 volta ayarlanmıştır. Yaklaşık 2.5 saat kadar jel yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonlandırıldıktan sonra jel, cam plaklar arasından çıkartılarak kapaklı plastik bir kaba alınmıştır ve boyama işlemine geçilmiştir. Jelin üzerini tamamen kaplayacak şekilde boyama çözeltisi dökülerek jel, bu şekilde bir gece boyunca 20 devir/dakika hızında çalkalanarak boyanmıştır. Gece boyunca boyanan jeldeki boyama çözeltisi dökülerek jel 1 saat boyunca yıkama çözeltisinde çalkalanmıştır. 1 saat sonra yıkama çözeltisi dökülerek tekrar yıkama çözeltisi ilave edilmiş ve jel 1 saat daha yıkanmıştır. Bu işlem jelin zeminindeki boya tamamen çıkana kadar bu şekilde devam ettirilmiştir. Yıkama işlemi sona erdikten sonra jel üzerindeki bantların moleküler ağırlıklarının hesaplanması için jelin X-ray fotoğrafı çekilmiştir. Daha sonra bu jel % 7 asetik asit çözeltisi içinde saklanmıştır.

2.2.5.4. Fotoğrafi çekilen jeldeki bantların moleküler ağırlıklarının hesaplanması

Bu analizler için polipeptidlerin, moleküler ağırlığının logaritması ile jeldeki rölatif göç hızları (R_f değerleri) arasındaki doğrusal ilişki esasından yararlanılmıştır. Jeldeki göç hızının bir fonksiyonu olan Rölatif göç hızı (R_f değeri), jelin üst kısmından bandın bulunduğu yere kadar olan uzaklığın, jelin üst kısmından işaret boyasının olduğu yere kadar olan uzaklığa olan oranıdır. Bu formüle uygun olarak standart proteinlerin R_f değerleri belirlenmiştir ve milimetrik kağıdın ordinat bölgesine yazılmıştır. Bu proteinlerin moleküler ağırlıkları da absise yerleştirilerek standart bir grafik elde edilmiştir. Hemolenf örneklerine ait bantların da R_f değerleri aynı şekilde ölçülmüşlerdir ve standart

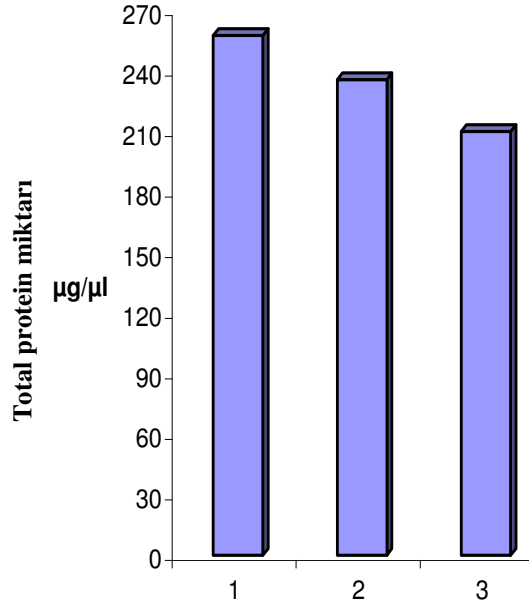
grafik üzerindeki doğruda kesiştirilerek bu bantların tahmini moleküler ağırlıkları tespit edilmiştir. Ayrıca fotoğrafı çekilmiş olan jelin üzerindeki protein bantlarının moleküler ağırlıkları ve densitometrik analizleri Gel-Pro Analyzer Version:4 programı kullanılarak % 99 hassasiyetle tekrarlanmıştır.

3. BULGULAR

3.1 Parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak hemolenf örneklerinde spektrofotometrik yöntem ile belirlenen total protein değişimi

Bu çalışmada *B. hebetor* tarafından parazitlenen konak un güvesi *E. kuehniella*'nın larval hemolenf örnekleri, parazitlenmeden 24 ve 48 saat sonra alınmıştır. Çalışmada kontrol grubu olarak parazitlenmemiş konak un güvesi *E. kuehniella* larvalarından alınan hemolenf örnekleri kullanılmıştır. Bu örneklerin total protein analizleri 595 nm'de spektrofotometrik olarak yapılarak protein miktarları ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) belirlenmiştir. Çalışma sırasında yapılan tüm analizler üç kez tekrarlanmış ve sonuçların aritmetik ortalaması alınmıştır. Şekil 3.1'de gösterildiği gibi son dönem *E. kuehniella* larvalarına ait hemolenfin 257.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ protein içerdiği belirlenmiştir. Parazitlenmiş konak örneklerinde ise hemolenfin, parazitlenmeden 24 saat sonra 235.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 48 saat sonra 210 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ protein içerdiği belirlenmiştir.

Şekil 3.1'de de görüleceği gibi, parazitlenmeye bağlı olarak larval konak hemolenfindeki total protein miktarı belirgin bir düşme göstermiştir.



Şekil 3.1. Parazitlenmeye bağlı olarak *E. kuehniella* larvalarının hemolenfindeki total protein değişimi. (1) parazitlenmemiş konak hemolenfi, (2) parazitlenmeden 24 saat sonra konak hemolenfi, (3) parazitlenmeden 48 saat sonra konak hemolenfi.

3.2 SDS-PAGE yöntemi ile belirlenen parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak hemolenf örneklerindeki protein değişimi

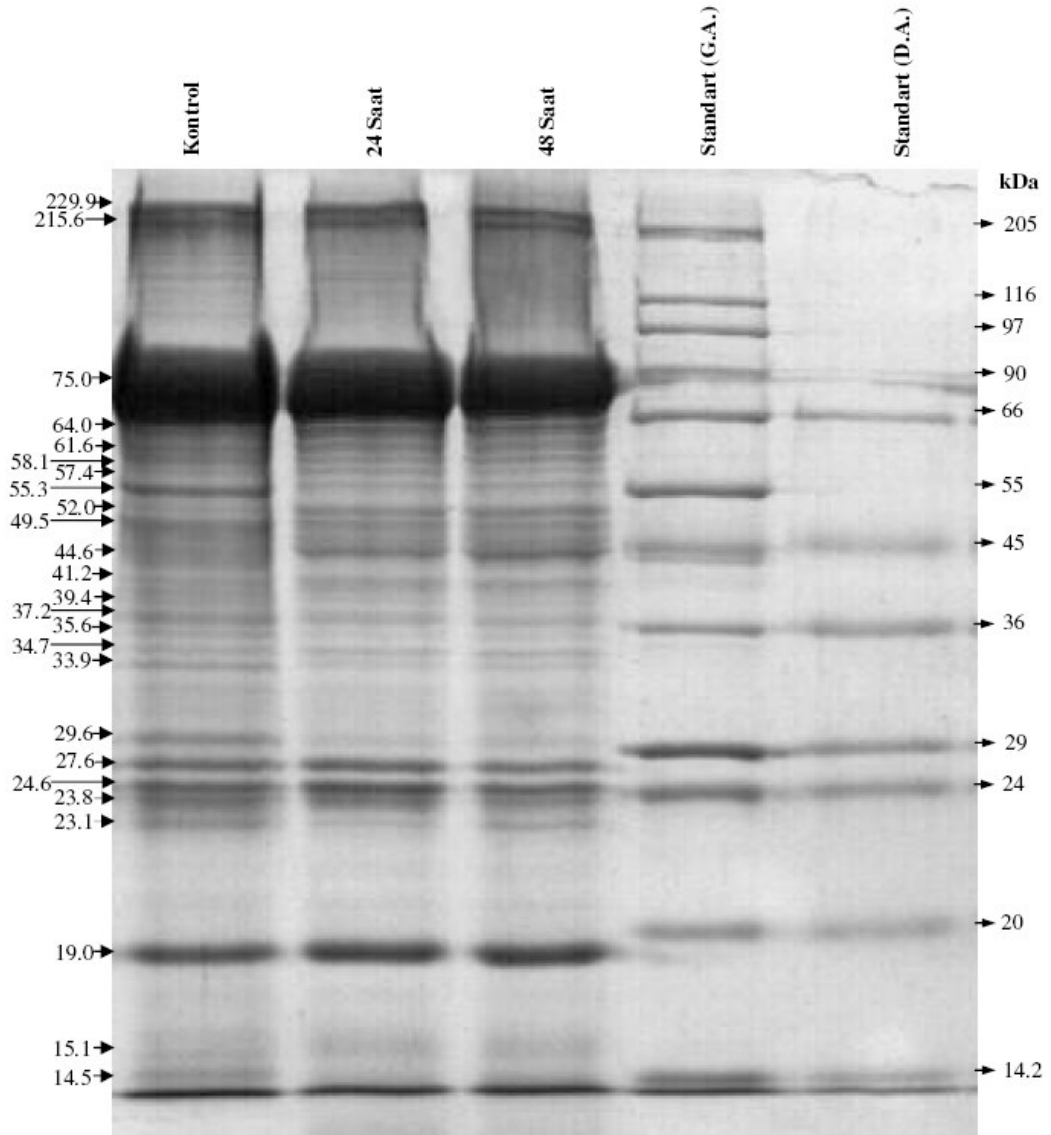
Parazitlenmiş ve parazitlenmemiş larvalara ait hemolenf örneklerindeki protein değişimlerinin belirlenmesi poliakrilamid sodyum dodesil sülfat (SDS-PAGE) elektroforetik yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemin standartizasyon çalışmalarında farklı por çapı aralığına sahip ayırma jelleri kullanılmıştır. Yapılan denemeler içinde hemolenf proteinlerinin en iyi elektroforetik ayırımı, % 11 gözenek değerine sahip ayırma jelinde sağlanmıştır. Bu nedenle % 11'lik ayırma jeli üzerinde yürütülmüş olan protein bantlarının analizi yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Şekil 3.2'de parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak hemolenf proteinlerinin SDS-PAGE analiz sonuçları gösterilmiştir. Jel üzerinde toplam 24 bant belirlenmiş ve tüm bantların moleküler ağırlıkları analiz edilmiştir.

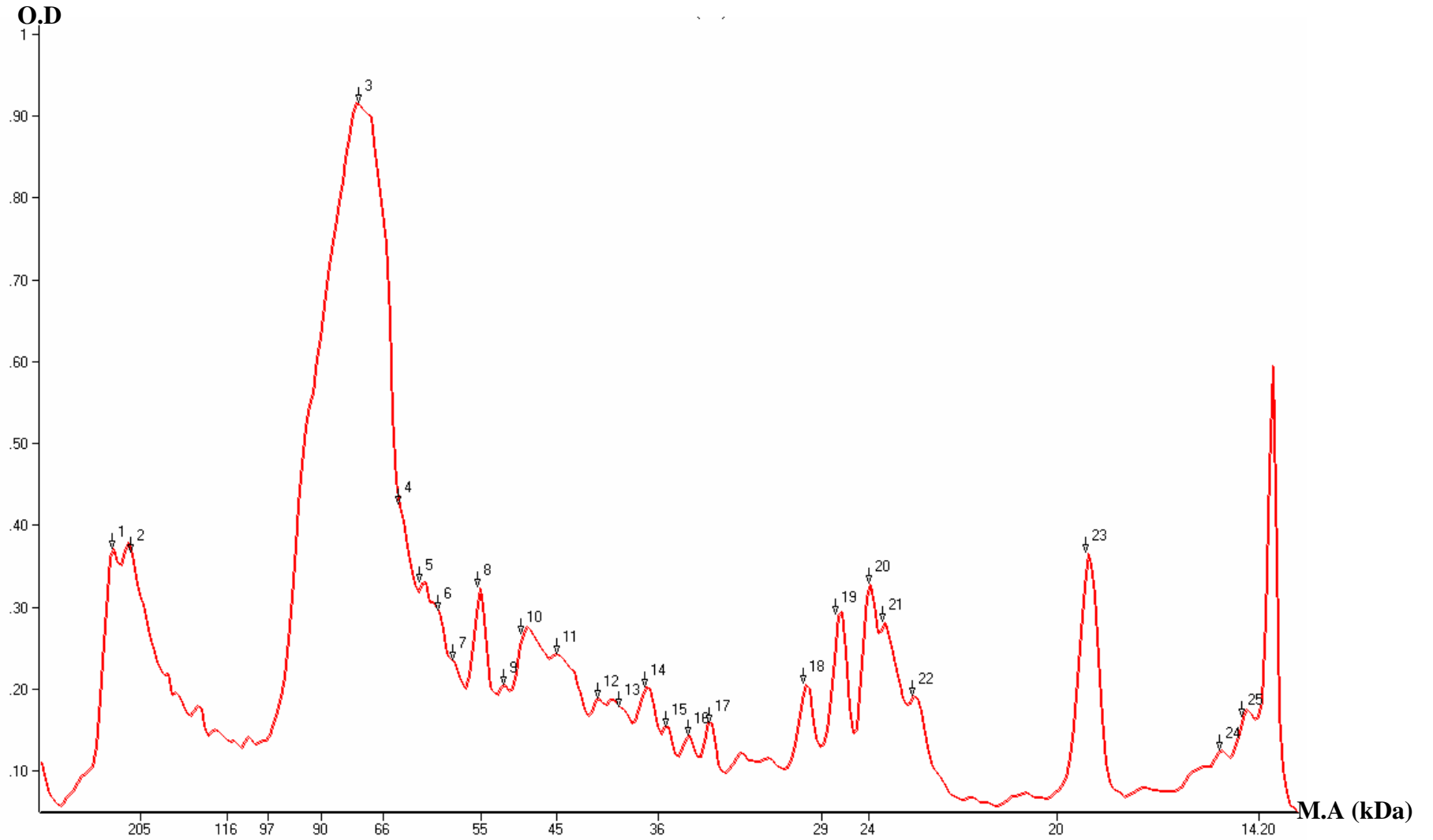
Parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak *E. kuehniella*'nın son dönem larval hemolenf proteinlerinin densitometrik analizleri Gel-pro analyzer Version:4 programı kullanılarak yapılmıştır ve analiz sonuçları şekil 3.3, 3.4 ve 3.5 'de verilmiştir. Şekil 3.6'da da parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak hemolenf proteinlerinin densitometrik analizleri karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Bu şekillerde protein bantları çizelge 3.1'deki numaralarına göre sıralanmıştır.

Hemolenf proteinlerindeki densitometrik farklılıkların parazitlenmemiş konak larvalarındaki protein değerlerine göre %'lik değişimleri çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

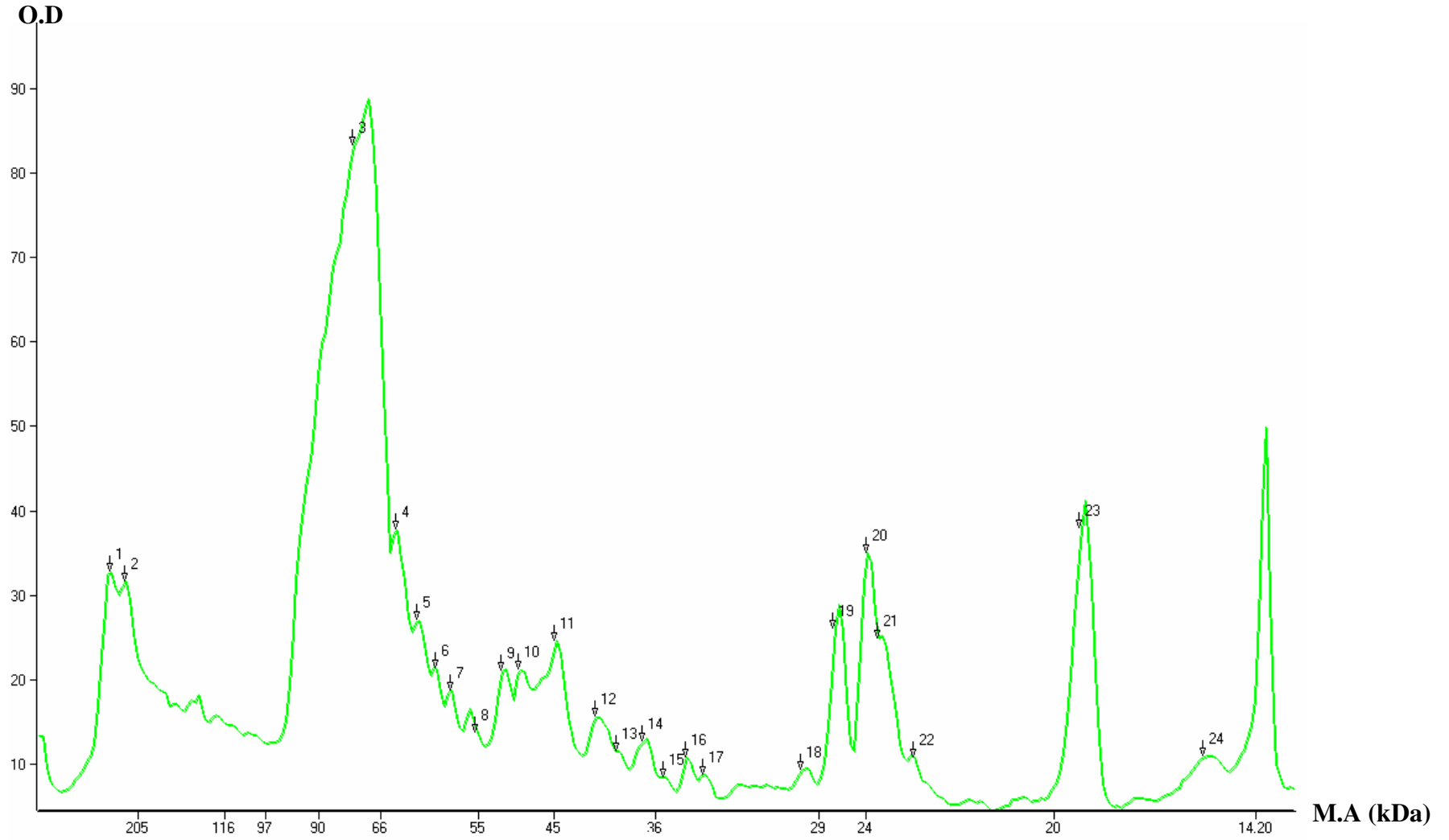
Şekil 3.2'de gösterildiği gibi parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak hemolenfi, ortak protein profiline sahip olup parazitlenmeye bağlı yeni bir protein bandı ortaya çıkmamıştır. Ancak densitometrik analiz sonuçlarında (çizelge 3.1) da gösterildiği gibi parazitlenmeye bağlı olarak bazı proteinlerde belirgin artış belirlenmiştir. Ayrıca bazı protein bantlarında parazitlenmenin süresine bağlı olarak değişiklik meydana gelmemiştir.



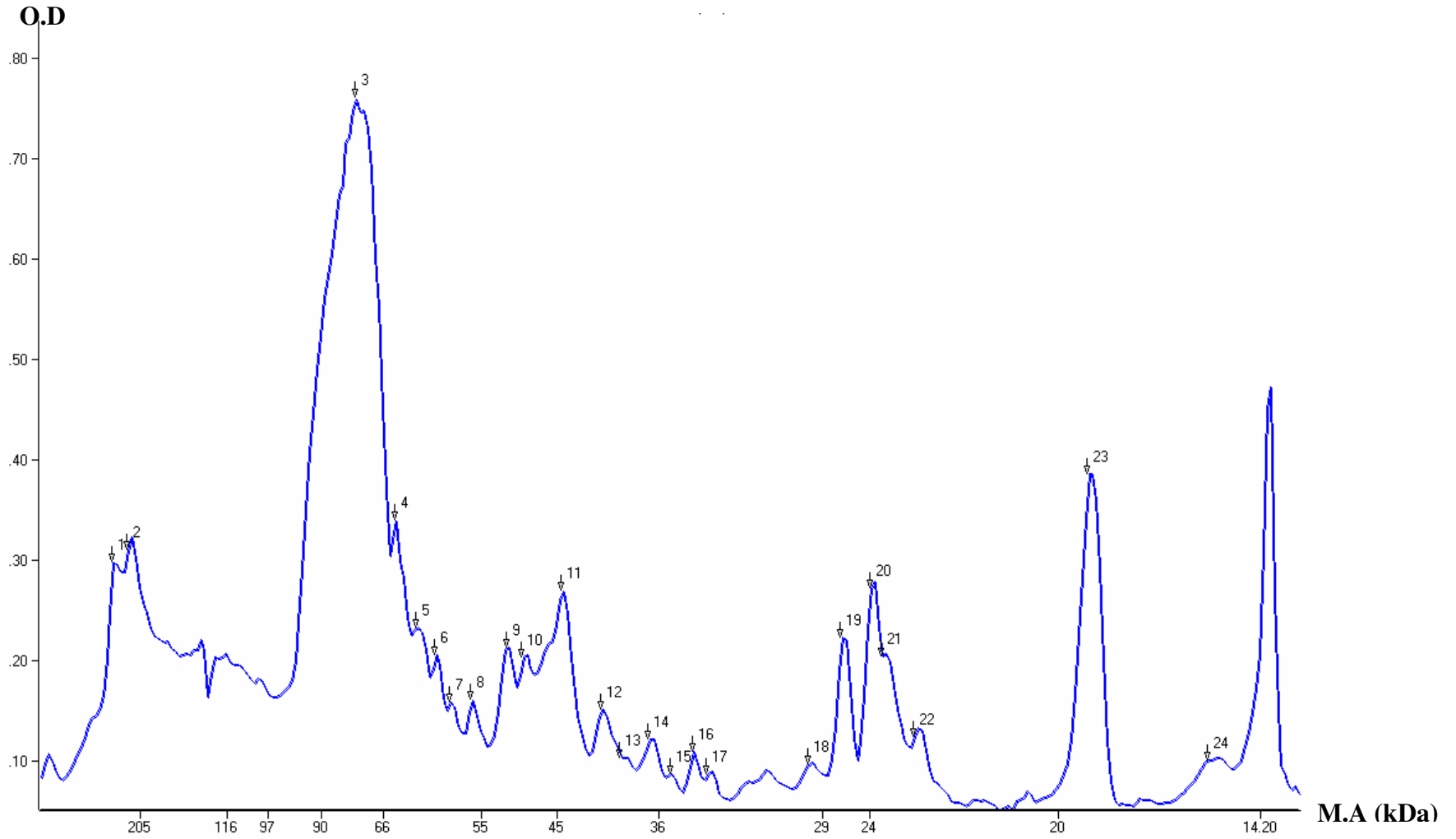
Şekil 3.2. *B. hebetor* tarafından parazitlenmiş ve parazitlenmemiş *E.kuehiella* larvalarında hemolenf proteinlerinin SDS-PAGE analizi. Kontrol: Parazitlenmemiş konak hemolenfi, 24 saat: Parazitlenmeden 24 saat sonra konak hemolenfi, 48 saat: Parazitlenmeden 48 saat sonra konak hemolenfi, Standart (G.A): Geniş aralıklı protein standart, Standart (D.A): Düşük aralıklı protein standart.



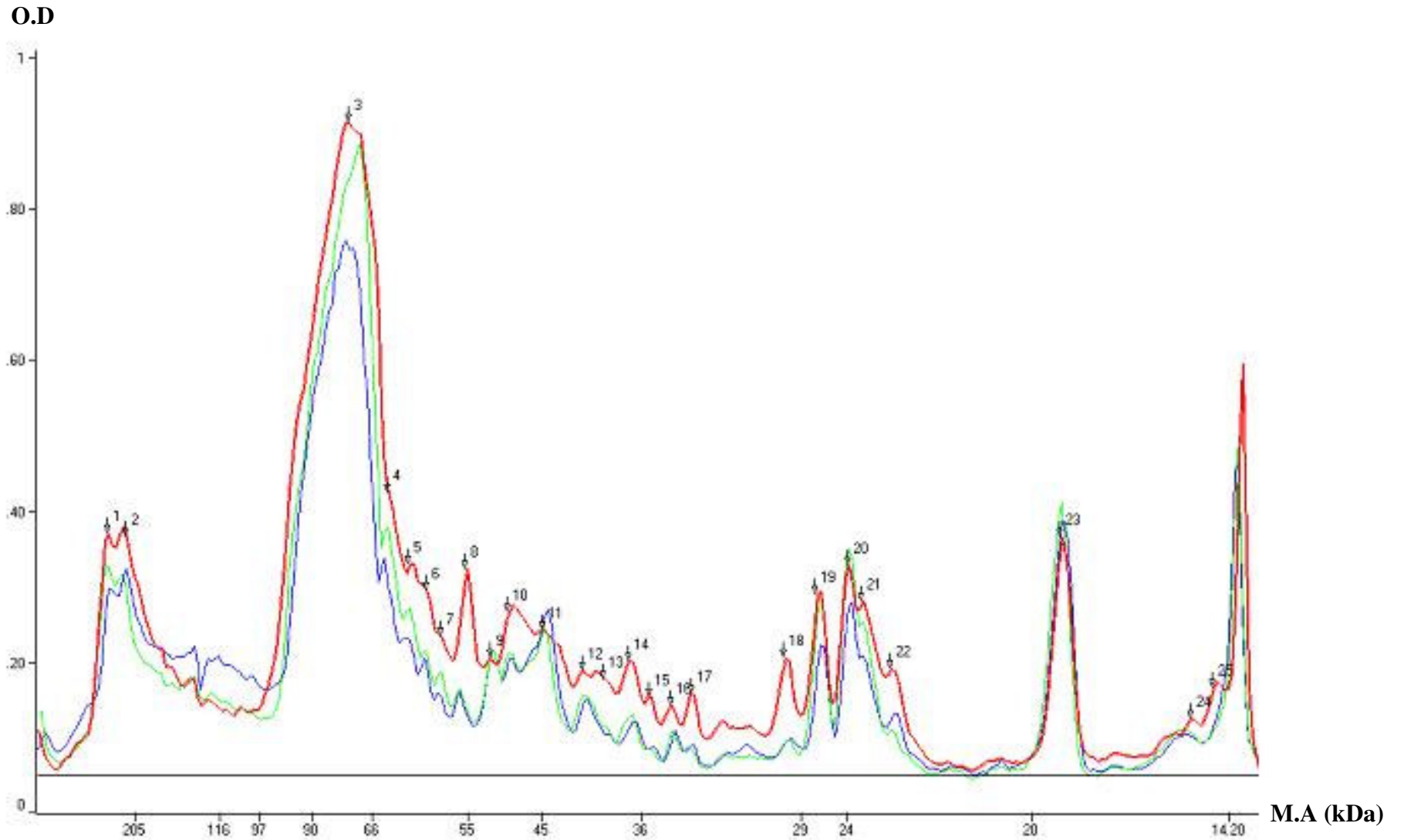
Şekil 3.3. Parazitenmemiş *E. kuehniella* larvalarında hemolenf proteinlerinin densitometrik analizi. O.D; Optik densitometri, M.A; Moleküler ağırlık.



Şekil 3.4. *E. kuehniella* larvalarında parazitlenmeden 24 saat sonra, hemolenf proteinlerinin densitometrik analizi. O.D; Optik densitometri, M.A; Moleküler ağırlık.



Şekil 3.5. *E. kuehniella* larvalarında parazitlenmeden 48 saat sonra, hemolenf proteinlerinin densitometrik analizi. O.D; Optik densitometri, M.A; Moleküler ağırlık.



Şekil 3.6. Parazitenmiş ve parazitenmemiş *E. kuehniella* larvalarında bulunan hemolenf proteinlerinin densitometrik olarak karşılaştırmalı analizi (Kırmızı; parazitenmemiş, Yeşil; parazitenmeden 24 saat sonra, Mavi; parazitenmeden 48 saat sonra). O.D; Optik densitometri, M.A; Moleküler ağırlık

Çizelge 3.1. Ektoparazitoid *B. hebetor* tarafından parazitlenen konak *E. kuehniella* larvalarının hemolenf proteinlerindeki densitometrik farklılıkların parazitlenmemiş konak larvalarındaki protein değerlerine göre %'lik değişimleri. 24 saat: parazitlenmeden 24 saat sonraki hemolenf proteinlerinin % değişimleri, 48 saat: parazitlenmeden 48 saat sonra hemolenf proteinlerinin % değişimleri (+; protein miktarında artış, -; protein miktarında azalma).

BANT NUMARASI	MOLEKÜER AĞIRLIK (kDa)	24 SAAT DEĞİŞİKLİK %	48 SAAT DEĞİŞİKLİK %
1	229.9	16 -	30 -
2	215.6	14 -	19 -
3	75.0	13 -	19 -
4	64.0	11 -	28 -
5	61.6	20 -	36 -
6	58.1	32 -	37 -
7	57.4	23 -	42 -
8	55.3	66 -	66 -
9	52.0	15 +	16+
10	49.5	31 -	38 -
11	44.6	11 +	17 +
12	41.2	24 -	32 -
13	39.4	51 -	62 -
14	37.2	50 -	58 -
15	35.6	62 -	75 -
16	34.7	40 -	60 -
17	33.9	61 -	66 -
18	29.6	69 -	71 -
19	27.6	11 -	29 -
20	24.6	8 +	21 -
21	23.8	12 -	33 -
22	23.1	55 -	49 -
23	19.0	17 +	7 +
24	15.1	13 -	28 -
25	14.5	100 -	100 -

Parazitlenmeye bağlı olarak % 50'nin üzerinde azalma veya artış gösteren proteinlerin moleküler ağırlıkları koyu renkli gösterilmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, ektoparazitoid *B. hebetor*'un konağı *E. kuehniella*'nın hemolenf proteinleri üzerine olan etkileri spektrofotometrik ve elektroforetik olarak kalitatif ve kantitatif yönlerden araştırılmıştır. Çalışmada ortaya konulan sonuçlara göre parazitliğin konak hemolenfi üzerinde kantitatif yönlerden etkili olduğu belirlenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda da parazitoidlerin konaklarının fizyolojik ve endokrinolojik faaliyetleri üzerine etkili oldukları belirlenmiştir. Bu çalışmalarda genel olarak parazitliğin karbohidrat, protein, amino asit ve yağ asitlerinin konsantrasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır [15-20, 38].

Hymenopter parazitoidlerin birçoğunun konaklarının hemolenf kompozisyonunda değişiklik meydana getirdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalarda Lepidoptera larvalarının Braconid ve Ichneumonid parazitoidler tarafından parazitlenmelerinin yanında, parazitliğin konak plazma proteinleri üzerinde meydana getirdiği değişiklikler belirlenerek, konak fizyolojisine olan etkileri ortaya konulmuştur [16-18, 20, 26, 29]. Ancak bu çalışmaların bir çoğunda endoparazitoidler ile konakları arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Bu durumun nedenleri ise endoparazitoidlerin, konağın hemolenfinden direkt olarak beslenmeleri ve parazitleme sırasında konağın savunma sistemini baskılayıcı protein yapıda yeni bileşikler enjekte etmelerinden kaynaklanmaktadır.

Endoparazitoidlik konak böceklerin fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları üzerinde etkili olmasının yanında parazitoidin davranışsal, hormonal ve gelişimsel özellikleri üzerinde belirgin değişikliklere neden olmaktadır. Günümüzde biyokimyasal ve moleküler tekniklerin kullanılmasıyla birlikte özellikle endoparazitlerin konağın protein sentezi üzerindeki etkileri yaygın olarak çalışılmaktadır. Parazitliğe bağlı olarak ortaya çıkan yeni proteinler bu tekniklerin geliştirilmesiyle bir çok çalışmada belirlenmiştir. Bu çalışmaların amacı parazitlenmiş böcekte büyük değişiklikler gösteren protein ve peptidlerin, parazit konak ilişkisi için biyolojik açıdan ne kadar önemli olduğunu göstermektir [18]. Bu çalışmada daha önceden endoparazitoidler ile konak arasında gösterilen bu

değişikliklerin ektoparazitoidler ile konakları arasında da gerçekleşip gerçekleşmediği belirlenmiştir. Çalışmada belirlenen sonuçlara göre, *B. hebetor* tarafından parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak larvalarının hemolenf protein profillerinde değişiklik bulunmamıştır. Daha önce yapılan benzer çalışmalarda parazitlenmiş larvaların hemolenflerinde bulunan bazı proteinlerin parazitlenmemiş larvalarda bulunmadığı gösterilmiştir [9, 15-18, 20, 23, 31, 39, 40]. Ancak bazı ektoparazitoid türlerle yapılan çalışmalarda da parazitliğe bağlı olarak spesifik yeni proteinler tespit edilmemiştir [32, 41-45]. Bu sonuçlar yapılan bu çalışmayı desteklemenin yanında ektoparazitoidlerin, endoprazitoidlerin çoğunda olduğu gibi konağına spesifik polydnvirüs enjekte ederek konağın immun sistemini baskılamadığı görüşünü güçlendirmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı, parazitoid – konak arasındaki fizyolojik ilişkiler endoparazitoidlerde, ektoparazitoidlere göre daha belirgin değişiklik göstermektedirler.

Yapılan bir başka çalışmada ektoparazitoid *B. hebetor* (*Habrobracon hebetor*) tarafından parazitlenen konak *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarının hemolenf proteinlerinde de parazitlenmeye bağlı olarak özel yeni bir protein belirlenmemiştir [32].

Endoparazitoid *Glyptapanteles liparidis* (Hymenoptera: Braconidae) tarafından parazitlenen *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvalarının hemolenf proteinleri üzerinde yapılan bir çalışmada ise, konak larvalarının hemolenf proteinleri elektroforetik olarak ayrılmış ve polypeptit profillerinin parazitlenmemişlere göre farklı olduğu belirlenmiştir. Parazitlenmiş larvaların hemolenflerinde, parazitliğe özel olan yaklaşık 80 kDa ağırlığında ek bir protein bandı bulunmuştur [15].

Endoparazitoid *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae) ile yapılan bazı çalışmalarda da parazitlenen konak *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphinginae) larvalarının hemolenf örneklerinde 33 kDa'luk bir protein belirlenmiştir. Bu proteinin *C. congregata*'nın ovaryum kaliksinden salınmış olan Polidnavirüs'ün enjekte edilmesiyle ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu proteinin endoprazitoid yumurtalarının konak tarafından uzaklaştırılmasını engellediği belirlenerek parazitoidin bu sayede konak metabolizmasını kendine uygun

biçimde regüle edebildiği bildirilmiştir. Ayrıca parazitlenmiş larvalarda, vitellogen sentezi çoğunlukla engellenmiş ve premetamorfik evrelerde arilforin (depo proteini) sentezi önlenmiştir. Sonuçların parazitoidlerin konak böceklerde protein sentezi ve kullanımı üzerine bir çok etkisinin olduğunu göstermekte olduğu ileri sürülmüştür [17, 18, 20]. Aynı amaçla yapılan başka bir çalışmada da bu proteinlerin glikoprotein yapısında olduğu belirlenmiştir. Konağa enjekte edilen bu glikoproteinlerin patojenite oluşumunu ve enzimatik aktiviteyi, belirlediğini bunun yanında konak için potansiyel zararlı olarak parazit beslenmesine katkıda buldukları gösterilmiştir [46].

Genel olarak birçok endoparazitoid, ektoparazitoidlerde olmayan ovaryum kaliks sıvısına sahiptirler ve bu sıvı 29-36 kDa ağırlığında protein grupları içermektedir. Bu proteinler dişi üreme organında sentezlenerek ovipozisyon sırasında konağa enjekte edilmektedirler [46].

Bu çalışmada idiobiont ve gregar bir ektoparazitid, *B. hebetor* tarafından parazitlenen *E. kuehniella* larvalarının hemolenf plazma proteinlerinin total miktarında, parazitlenmemiş hemolenf örneklerine göre bir azalma belirlenmiştir (Şekil 3.1.). Protein miktarındaki bu azalma büyük miktarlarda olmamakla birlikte parazitlenmeden 48 saat sonra daha belirgindir. Hemolenf proteinlerindeki bu genel azalma çeşitli faktörlere bağlı olabilir. Bu nedenlerden birisi, dişi parazitoidin yumurta verimini artırmak için konağının hemolenfinden bir miktar beslenirken hemolenf proteinlerindeki alması olabilir.

Hymenoptera takımına ait birçok parazitoid türün konaklarını sadece üremek için kullanmadığı aynı zamanda konak ile beslenebildiği ve beslenmenin parazitoidin yumurta üretimini sağlamak için gerekli olduğu daha önce yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [33, 34]. Kılınçer (1976), konak kanıyla beslenmiş parazitoid *B. hebetor* dişilerinin yumurtalıklarında bırakılmaya hazır 8 adet yumurta varken, beslenmemiş dişi parazitoidlerin yumurtalıklarında ise sadece 2 adet buruşuk olgun yumurta bulunduğunu bildirmiştir. Bir başka çalışmada da parazitoid *B. hebetor* dişilerinin de birçok parazitoid türünde olduğu gibi konaktan beslendikleri bildirilmiştir. Parazitoid *B. hebetor* dişilerinin konağını önce ovipozitöriyle paraliz ettikleri daha sonrada beslenmeye başladıkları belirlenmiştir [33]. Daha önce yapılan bu çalışmalar, hemolenf proteinlerindeki

azalmanın dişi parazitoidin hemolenften beslenmesine bağlı olabileceğini desteklemektedir. Bunun yanında hemolenf proteinlerinin total miktarındaki bu azalma, konak-parazitoid arasındaki biyokimyasal ve fizyolojik etkileşimlerde bağlı olabilir. Özellikle de konağa bırakılan parazitoid yumurtalarından çıkan larvaların beslenme durumları ve bırakılan yumurta sayısının hemolenf proteinleri üzerinde oldukça etkili olduğu, daha önce yapılan bazı çalışmalar da da gösterilmiştir. Bu çalışmalardan endoparazitoid *Glyptapanteles liparidis* (Hymenoptera: Braconidae) ve konak *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) arasında yapılan çalışmada konak larvalarının hemolenfindeki total amino asit konsantrasyonunda parazitlenmeye bağlı azalmanın gerçekleştiği belirlenmiştir [15]. Yapılan bir başka çalışmada da gregar endoparazitoid *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae) tarafından parazitlenen *Pseudaletia seperata* (Lepidoptera: Noctuidae)'nın hemolenfindeki total lipit ve protein konsantrasyonunun ağır parazitlenme de hafif düzeyde parazitlenmeye oranla önemli bir düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, çok sayıdaki parazitoid larvaları tarafından konak hemolenf besinlerinin ve yağ dokunun kısa sürede tüketildiği şeklinde bildirilmiştir [22]. Aynı türlerle yapılan bir başka çalışmada ise parazitlenmiş konak *P. seperata*'nın hemolenf proteinlerinin parazitlenmenin 9 ve 10. günlerinde yoğun olarak azaldığı bildirilmiştir [39].

Genel olarak ektoparazitoidler konaklarının immün sistemini baskılayabilmek ve konağın yüzeyine bıraktıkları yumurtalarının konak üzerinde kalmalarını sağlayabilmek için, zehir bezlerinde bulunan zehiri konaklarına enjekte ederek paralize ederler. Ektoparazitoidlerin hem zehir bezlerinin morfolojik özellikleri hem de zehirin kimyasal içeriği bazı çalışmalarda araştırılmıştır [43-44].

B. hebetor, konağını neuromuscular özellikte olan venomu ile paralize etmektedir. Konağın bir süre kalp atışı devam etmesine rağmen larvanın gelişimi durur ve sonunda konak larvası parazitlenmese bile ölür. Yapılan bir çalışmada *B. hebetor*'un paralitik zehiri analiz edilerek, zehirin çok sayıda protein içerdiği belirlenmiştir. Bu proteinlerin böcekte spesifik aktiviteye sahip olup düşük moleküler ağırlığa sahip olanların yaklaşık 34, 21, 18.5 ve 17 kDa ağırlığına

sahip oldukları, büyük moleküler ağırlığa sahip olanların ise yaklaşık 44 kDa ve 72 kDa ağırlığına sahip oldukları belirlenmiştir [42].

Bu çalışmada densitometrik olarak analizi yapılmış olan parazitlenmiş hemolenf örneklerindeki 52 kDa, 44.6 kDa, 19 kDa ve 24.6 kDa'luk protein bantlarının parazitlenmemiş örneklere göre artış gösterdikleri belirlenmiştir (Çizelge 3.1). Artış gösterdiği belirlenen bu bantların, daha önceki çalışmalarda *B. hebetor*'un zehirinde belirlenen proteinlere yakın ağırlıkta olmaları ve parazitlenmeye bağlı olarak artış göstermeleri bu protein bantlarının parazitiodin zehir polipeptidlerinin de içerdiği fikrini güçlendirmektedir. Bunun yanında, artış gösteren bu proteinlerin parazitlenmeye bağlı olarak konağın savunma proteinleri olarak sentez edilmiş olabilirler. Bu nedenlerden dolayı daha sonraki çalışmalarda saflaştırılarak karakteristik özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, parazitlenmiş ve parazitlenmemiş hemolenf proteinlerinin karşılaştırmalı olarak yapılan densitometrik analizlerine göre, protein bantlarından 55.3, 39.4, 37.2, 35.6, 33.9, 29.6, 23.1, ve 14.5 kDa'luk proteinlerin %50'nin üzerinde azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 3.1). Bu sonuçlar daha önce yapılan bir çok çalışma ile benzerlik göstermektedir. Ancak bu bantlardan 14.5 kDa'luk protein bandı parazitlenmeye bağlı olarak tamamen kaybolmuştur ve bu bant daha önceden yapılan çalışmalarda gösterilmemiştir. Bu yüzden bu protein bu çalışma için yeni bir sonuçtur ve daha sonradan yapılacak çalışmalarda da yeni bir bilgi olarak kullanılabilir.

E. kuehniella ile aynı familyada bulunan *Plodia interpunctella*'nın hemolenf proteinleri üzerine *B. hebetor* (*Habrobacon hebetor*)'un parazitik etkileri üzerine yapılan bir başka çalışma [32] ile bu çalışma karşılaştırıldığında, benzer bantlardan 55.3 kDa'luk protein bu çalışmada da olduğu gibi yüksek miktarda azalmıştır. Bu proteinin depo proteinlerinden heksamerinlere ait olma olasılığı çok yüksektir. Büyük olasılıkla bu protein, parazitoid tarafından hızla sindirilmekte ve kendi yapısal proteinlerinin sentezi için gerekli aminoasitlerin kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. Aynı çalışmada, *P. interpunctella* larvalarının hemolenf plazmasının 2 predominant protein içerdiği belirlenmiştir. Bunlar 190 kDa ağırlığında olan ve Apoliforin I olduğu düşünülen protein ve en büyük bant olan 60 kDa'luk depo proteinleri (Hexamerinler) ile apoliforin II içerdiği

düşünülen proteindir. Diğer önemli proteinler 50 ve 42 kDa'luk proteinler ile 21-28 kDa arasında olan 4 adet protein olarak belirlenmiştir. Konağın hemolenfide bulunan yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerin larval parazitoidler tarafından beslenme sırasında alınarak orta bağırsaklarında hızlı bir şekilde sindirildiği belirlenmiştir. Bu proteinlerden 190 kDa'luk Apoliforin I olduğu düşünülen protein parazitoidin bağırsak içeriğinde saptanmamıştır ve proteinin hızlı bir şekilde sindirilerek daha küçük moleküler ağırlıklı protein fragmentlerine parçalandığı ileri sürülmüştür. 60 kDa ağırlığında olan ve büyük hemolenf heksamerinleri olarak düşünülen proteinler ise hem beslenen parazitoid larvalarının bağırsak içeriğinde, hemde parazitoidin pupal döneminin ilk 24 saat süresince belirlenmiştir. Fakat pupal dönemin ilk 24 saati sonrasında, bu protein hidrolize olarak düşük moleküler ağırlıklı peptidlere ayrılmıştır. Jel üzerindeki diğer bantlardan 21-24 kDa arasındaki bantlar konak hemolenfinden daha kısa sürede alınarak sindirilmişlerdir. Aynı çalışmada, parazitoidin bağırsak içeriğinde serin proteinazlar belirlenerek bu enzimlerin apoliforin ve heksamerinlerin konaktan alınarak sindirilmelerini sağladıkları belirlenmiştir [32].

Lepidopter larvalarının hemolenflerinde genellikle en büyük protein bantları 60-90 kDa arasında bulunan çeşitli proteinlerdir [40, 47]. Bu çalışmada da en büyük protein bandı 75 kDa ağırlığında belirlenmiştir ve bu bandında 55.3 kDa'luk bant gibi depo proteinlere ait olduğu varsayılmaktadır. Ayrıca bu bantların parazitlenmeye bağlı olarak azalma göstermeleri daha önce yapılan çalışmaları desteklemektedir.

İki Gregar ektoparazitoid türü olan *Euplectrus comstockii* (Hymenoptera: Eulophidae) ve *E. plathypenae* (Hymenoptera: Eulphidae) tarafından parazitlenen konak *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) olgun larvalarının hemolenf proteinlerinin değişimi üzerine yapılan bir çalışmada, parazitlenmiş ve parazitlenmemiş hemolenf örneklerinde 74-82 kDa ağırlığında ve depo proteinleri olduğu belirlenen proteinler analiz edilmiştir. Bu proteinlerinde bu çalışmada olduğu gibi parazitlenmeye bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir [44].

Endoparazitoid *Cotesia congregata* tarafından parazitlenen konak tütün güvesi *Manduca sexta*'nın larval hemolenf proteinleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, parazitliğin plazma proteinleri üzerinde büyük

değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada elektroforetik olarak ayrılan proteinler saflaştırılarak, densitometrik analizleri her biri için ayrı ayrı yapılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, parazitlenmiş *M. sexta* larvalarının hemolenf plazmasında yaklaşık ~ 240 kDa ağırlığında Apoliforin I, ~ 78 kDa ağırlığında Apoliforin II, ~ 22 kDa Apoliforin III, ~ 45 kDa Serpin, ~ 75 kDa Arilforin ve yaklaşık 19 kDa ağırlığında insektasiyanin belirlenmiştir. Bu proteinlerden Arilforin ve serpinler parazitlenmeye bağlı olarak belirgin bir azalma göstermişlerdir. İnsektasiyanin parazitlenmeye bağlı olarak parazitlenmenin 3. gününde artış gösterirken 4. günde parazitlenmemişe göre hemen hemen aynı düzeyde olacak şekilde tekrar azaldığı belirtilmiştir. Serpin ve apoliforin III proteinlerinin de arilforin gibi aşırı düzeyde azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada Arilforin ve serpinlerin larval gelişimi üzerinde özellikle de juvenil hormonun sentezlenme mekanizmalarında rol oynadıkları belirtilerek, bu proteinlerin parazitlenmeye bağlı olarak düşmelerinin nedeni, parazitoidin konağın gelişimini kendi çıkarlarına uygun olarak düzenlediği şeklinde yorumlanmıştır [20].

Beckage ve Kanost [20]'nin yaptıkları çalışma ile bu çalışma karşılaştırıldığında sonuçlar oldukça benzerlik göstermektedir. Bu çalışma da da 75 kDa ağırlığında protein bandı ile yine aşırı düşme gösteren 55.3 ve 39.4 kDa'luk bantlar belirlenmiştir. Bu bantların endojen proteinlerden olan hexamerin (75 kDa), arilforin (55.3 kDa), ve serpin (39.4 kDa) proteinleri olmaları ihtimali çok yüksektir. Yine 19 kDa olarak belirlenen protein bandının parazitlenmeye bağlı olarak önce artış göstermesi, daha sonra da kontrole yakın seviyeye düşmesi, bu proteinin böcek savunma sisteminde önemli bir protein olan insektasiyanin olma olasılığını artırmaktadır. Daha önceki çalışmada yaklaşık olarak 240 kDa ağırlığında Apoliforin I ve 22 kDa ağırlığında Apoliforin III olarak belirlenen proteinlerin bu çalışmada da 229.9 kDa ve 23.1 kDa olarak belirlenen protein bantlarına ait olma olasılıkları yüksektir. Özellikle bu çalışmada da, parazitlenmeye bağlı olarak 23.1 kDa'luk protein bandının % 50'nin üzerinde azalma göstermesi Apo-III olma olasılığını güçlendirmektedir. Bu proteinler lipoprotein yapısındadırlar ve lipidlerin hemolenfte veya vücut sıvılarında taşınmalarında rol oynayarak, canlıdaki lipid metabolizmasını düzenlerler. Bir

başka çalışmada ise, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)'nin hemolenf proteinlerinden Apoliforin-III proteini analiz edilmiştir. Ve bu proteinin 23 kDa ağırlığında olduğu tespit edilerek böceğin lipit metabolizmasında önemli görevler üstlendiği üzerinde durulmuştur. Ayrıca bu proteinin böcek humoral savunmasında rol oynadığı da, *E.coli* ile infekte olmuş larvalar kullanılarak gösterilmiştir [25].

Manduca sexta larvalarının hemolenf proteinlerinden juvenil hormon bağlayıcı proteinleriyle yapılan bir çalışmaya göre, bu hormonun üç alt üiteden oluştuğu ve larval gelişim süresince hemolenfte juvenil hormonun belirli seviyelerde tutulmasını sağladığı bildirilmiştir. Bu hormonun lepidopter larvalarında düşük moleküler ağırlıklı oldukları ve özellikle *M. sexta*'nin hemolenfinde 31 kDa ağırlığında olduğu belirlenmiştir [48]. Bu çalışmada da %50'nin üzerinde azalma gösteren protein bantlarından 29.6 kDa'luk protein bandının juvenil hormon bağlayıcı protein olması muhtemeldir. Parazitlenmiş larvalarda gelişimin durdurulması ve parazitoid larvalarının gelişimine devam edilebilmesi için juvenil hormonun etkisinin azaltılması gerekmektedir. Bu nedenlerden dolayı bu protein parazitlenmeye bağlı olarak yüksek seviyede azalmıştır.

Kaleli [26], endoparazitoid *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae)'nin konak *G. mellonella* larvalarının hemolenf protein bileşimi üzerine parazitlenmenin etkilerini araştırdığı çalışmada, parazitlenmiş konakta parazitlenmemişlere göre ilk saatlerde protein düzeylerinde bir azalma olurken ilerleyen saatlerde bir artışın olduğunu, parazitoid larvalarının son evrelerine yakın tekrar azalma olduğunu bildirmiştir. Özellikle de hemolenf proteinlerinin ilk saatlerde hızlı düşüşünü, endoparazitoidin yumurtalarını bırakırken konağını immün sistemini bozacak bir takım maddeler enfekte etmesine bağlamıştır. Protein yükselmesini ise, parazitoidin ilk dönem larvalarının öncelikle yağ dokudan beslenmelerinden dolayı hücrelerin parçalanarak doku proteinlerinin hemolenfe geçmesi durumuna bağlamıştır. Ayrıca bu çalışmada da olduğu gibi parazitlenen *G. mellonella*'nin hemolenfinde elektroforetik sonuçlara göre bazı proteinlerin parazitlenmeye bağlı olarak sürekli azalma gösterdiği, bazılarının da tam tersine artış gösterdikleri belirlenmiştir.

G. mellonella'nın hemolenf proteinleri üzerine yapılan bir başka çalışmada, depo proteinleri, arilforin, lipoforin, juvenil hormon bağlayıcı proteinler ve diapozla ilişkili proteinler gibi birçok hemolenf proteinlerinin böceklerin yağ dokuları tarafından sentezlenmekte ve hemolenfe serbest bırakılmalarının yanında bazı proteinlerinde epidermis tarafından sentezlendiği ve hemolenfe salındığı üzerinde durulmuştur. Bu nedenlere bağlı olarak aynı çalışmada *G. mellonella*'nın larval hemolenfde 47 kDa moleküler ağırlığında epidermis orjinli hemolenf proteini (EOHP) belirlenmiş ve bu protein izole edilmiştir. Bu proteinin amino asit içeriğinin aspartik asit ve glutamik asitçe zengin fakat tirozin, methionin ve triptofanca fakir olduğu belirtilerek, larval dönemler süresince proteinin hemolenfteki konsantrasyonun yüksek iken, pupal ve ergin dönemlerde azaldığı gösterilmiştir [49]. Bu çalışmada da bu proteine yakın ağırlıkta 44.6 kDa'luk bir protein bandı belirlenmiştir ve bu proteinin epidermis orjinli protein olma olasılığı yüksektir. Bunun nedeni ise *B. hebetor* ektoparazitoid bir tür olduğu için konak yüzeyine bırakılan yumurtalardan çıkan larvaların beslenmeleri sırasında konağın epidermis hücreleri parçalanarak, bu hücrelerde sentezlenen proteinler serbest kalırlar ve hemolenfe geçiş yaparak kısa süreli artışa neden olurlar.

Bu çalışma, parazitliğin konağın hemolenf proteinleri üzerinde değişik yönlerden etkili olduğunu göstermektedir. Bu etkilerin daha çok konağın beslenme, gelişme ve savunma mekanizmaları ile ilgili olduğu söylenebilir. Başarılı bir parazitik ilişkide ektoparazitoid larvaları pupa evresine girmeden önce konağın tüm içeriğini sindirerek ölümüne neden olurlar. Bundan dolayı parazitlenmiş konağın hemolenfde 48 saatin sonunda bile belirgin azalma göstermeyen protein bantları, büyük olasılıkla parazitoid larvalarının son evrelerine doğru tamamen sindirilmektedir. Konak larvalarının hemolenf proteinlerinde parazitlenmeye bağlı olarak genel bir azalmanın belirlenmesi daha önceden tahmin edilebilen sonuçlar olmasına rağmen, bazı proteinlerin artışı konaktaki yağ doku hücrelerinin parçalanmasına ve doku proteinlerinin serbest kalmasına bağlı olabileceği gibi, bu proteinler parazitoidin venomuna yada konağın savunma sitemine de ait olabilirler.

5. ÖNERİLER

Bu çalışmada bulunan sonuçların daha verimli olabilmesi ve elde edilen bilgilerden teknolojik olarak yararlanılabilmesi için belirlenen protein bantlarının saflaştırılarak identifiye edilmeleri gerekmektedir. Ayrıca daha sonraki çalışmalara temel oluşturacak olan bu çalışmada, yoğun azalma gösteren bantlar immünojenik olarak analiz edilerek, bu proteinlerin kitle üretim çalışmalarında besiyerlerine ilave edilmeleri, yetiştirme koşullarının güçlendirilmesi açısından yararlı olacaktır. Artış gösteren proteinlerden zehir proteinlerine ait olanlar da aynı şekilde izole edilip genomik karakterleri belirlenerek biyoinsektisit üretimi çalışmalarında kullanılabilirler. Hemolenf proteinlerine ait bazı protein bantlarında, çok sayıda aynı moleküler ağırlığa sahip proteinin bir arada olabileceği olasılığı dikkate alınmalıdır ve hemolenf örnekleri bu çalışmaya ilave olarak iki boyutlu elektroforetik yöntemle de tekrar analiz edilmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Gül, M. ve Gülel, A., “Parasitoid *Bracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae)’ un Biyolojisi ve Konak Larva Büyüklüğünün Verim ve Eşey Oranı Üzerine Etkisi,” Turkish Journal of Zoology, **19**, 231-235, 1995.
- [2] Tulaganov, S., “Değişik besinlerin *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera:Pyralidae)’nın gelişme ve morfolojisine etkisi üzerine gözlemler,” Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 1995.
- [3] Özkan, C., “*Venturia canescens* (Grav) (Hymenoptera: Ichneumonidae) ile *Ephestia kuehniella* Zell. (Lepidoptera: Pyralidae) arasında bazı biyolojik ilişkiler üzerinde araştırmalar,” Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1999.
- [4] Şahin, Z., “*Ephestia kuehniella* Zell.’in biyolojik gelişimi üzerine malathion pestisit ve gamma radyasyonun etkisi,” Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2002.
- [5] Aktümsek, A. ve Aksoylar, M. Y., “*Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera, Ichneumonidae)’nin yağ asidi bileşimi,” Doğa Türk Biyoloji Dergisi **11**, **1**, 1987.
- [6] Sarıkaya, A., “Parazitoid *Dibrachys boarmiae* (Walker, 1863) (Hymenoptera: Pteromalidae)’nin ergin öncesi gelişim süresi, verim, eşey oranı ve ergin yaşam süresine konaktaki toplam lipid, glikojen ve protein miktarlarının etkileri,” Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 2003.
- [7] Uçkan, F. ve Gülel, A., “*Apantales galleriae* Wilkinson (Hym: Braconidae)’nin bazı biyolojik özelliklerine konak türün etkileri,” Turkish Journal of Zoology, **24**, 105-113, 2000.
- [8] Hajek, A. E., “Natural Enemies: An introduction to biological Control,” Cambridge University Pres, USA, 105-356, 2004.
- [9] Kuriachan, I., Consoli D. F. ve Vinson S.B., “ In vitro rearing of *Toxoneuron nigriceps* (Hym: Braconidae), a larval endoparasitoid of

- Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) from early second instar to third instar larvae,” Journal of Insect Physiology, **52**, 881-887, 2006.
- [10] Harvey, A.J., Jervis, A. M., Gols, R., Jiang, N. ve Vet, L. E. M., “ Development of the parasitoid, *Cotesia rubecula* (Hym: Braconidae) in *Pieris rapae* and *Pieris brassicae* (Lep: Pieridae): evidence for host regulation,” Journal of Insect Physiology, **45**, 173-182, 1999.
- [11] Strand, R. M., “ The Behavioural Ecology of Parasites: The interactions between larval stage parasitoids and their hosts (Ed: Lewis, E. E.),” Cambridge CABI publishing, USA, 129-146, 2002.
- [12] Althoff, M. D., “ Does parasitoid attack strategy influence host specificity? A test with New World Braconids,” Ecological Entomology, **28**, 500-502, 2003.
- [13] Gündüz, Akman, N. E. ve Gülel A., “ Ergin yaşı ve konukçu türünün parazitoit *Bracon hebetor* (Say) (Hym: Braconidae)’un gelişme süresine etkisi,” Journal of Faculty Agriculture, OMU, **20(2)**, 31-36, 2005.
- [14] Gülel, A., “ Parazitoit *Dibrachys boarmiae* (Hym: Ptermolidae)’de kantitatif besin eksikliğinin ergin boy ve verime etkisi,” Doğa Türk Zooloji Dergisi, **12(1)**, 1988.
- [15] Bischof, C. ve Ortel, J., “ The effects of parasitism by *Glyptapanteles liparidis* (Hym: Braconidae) on the hemolymph and total body composition of gypsy moth larvae (*Lymantria dispar*, Lymantridae: Lepidoptera),” Parasitological Research, **82**, 687-692, 1996.
- [16] Harwood, H. S. ve Beckage, N. E., “ Purification and characterization of an early – expressed polydnavirus – induced protein from the hemolymph of *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*,” Insect Biochemistry and Molecular Biology, **24(7)**, 685-698, 1994.
- [17] Beckage, N. E., Templeton, T. J., Nielsen, B. D., Cook, D. I. ve Stoltz, D. B., “ Parasitism- induced hemolymph polypeptides in *Manduca sexta* (L.) larvae parasitized by the Braconid wasp *Cotesia congregata* (Say),” Insect Biochemistry, **17(3)**, 439-455, 1987.

- [18] Beckage, N. E., “ Games parasites play: the dynamic roles of proteins and peptides in the relationship between parasite and host,” Academic Press, California, 1993.
- [19] Dahlman, D. L. ve Vinson, B., “ Glycogen content in *Heliothis virescens* parasitized by *Microplitis croceipes*,” Comparative Biochemistry Physiology, **66A**, 625-630, 1979.
- [20] Beckage, N. E. ve Kanost, M. R., “ Effects of parasitism by the braconid wasp *Costesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*,” Insect Biochemistry and Molecular Biology, **23**, 643-653, 1993.
- [21] Magro, S. R. ve Parra, J. R. P., “ Comparison of artificial diets for rearing *Bracon hebetor* Say (Hym: Braconidae),” Biological Control, **29**, 341-347, 2004.
- [22] Nakamatsu, Y. ve Tanaka, T., “ Corelation between concentration of hemolymph nutrients and amount of fat body consumed in lightly and heavily parasitized hosts (*Pseudaletia separata*),” Journal of Insect Physiology, **52**, 135-141, 2004.
- [23] Nakamatsu, Y., Fujii, S. ve Tanaka, T., “ Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hym: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes,” Journal of Insect Physiology, **48**, 1041-1052, 2002.
- [24] Demirsoy, A., “ Yaşamın temel kuralları, Omurgasızlar / Böcekler, Entomoloji, Cilt II / Kısım II,” Meteksan A.Ş., 802-879, Ankara, 2003.
- [25] Park, S. Y., Kim, C. H., Jeong, H. W., Lee, J. H., Seo, S. J., Han, Y. S. ve Lee, I. H., “ Effects of two hemolymph proteins on humoral defens reactions in the wax moth, *Galleria mellonella*,” Devolopmental and Comparative Immunology, **29**, 43-51, 2005.
- [26] Kaleli, S., “ Konak *Galleria mellonella* L. ve endoparazitoid *Pimpla turionellae* L.’nın hemolenf protein bileşimine parazitlemenin etkileri,” Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 1998.

- [27] Riddiford, L. M. ve Law, J.H., “ Larval serum proteins of Lepidoptera: In the larval serum proteins of insects (Ed: Schelleri K.)”, Thieme Stuttgart, 75-85, 1983.
- [28] Thompson, S.N., “ Parasitism enhances the induction of glycogenesis by the insect, *Manduca sexta* L.,” The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, **33**, 163-173, 2001.
- [29] Richards, E. H. ve Edwards, J. P., “ Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera, noctuidae) by the ectoparasitic wasp *Eulophus pennicornis*, result in the appearance of a 27 kDa parasitism-specific protein in host plasma,” Insect Biochemistry and Molecular Biology, **29**, 557-569, 1999.
- [30] Dahlman, D. L. ve Vinson, S. B., “ Trehalose and glucose levels in the hemolymph of *Heliothis virescens* parasitized by *Microplitis croceipes* or *Cardiochiles nigriceps*,” Comparative Biochemistry Physiology, **52B**, 465-468, 1975.
- [31] Beckage, N. E. ve Templeton, T. J., “ Physiological effects of parasitism by *Apanteles congregatus* in terminal stage tobacco hornworm larvae,” Journal of Insect Physiology, **32(4)**, 299-303, 1986.
- [32] Baker, J. E. ve Fabrick, J. A., “ Host hemolymph proteins and protein digestion in larval *Habrobracon hebetor* (Hym: Braconidae),” Insect Biochemistry and Molecular Biology, **30**, 937-946, 2000.
- [33] Dabbaoglu, S., “ Parazitoit *Bracon hebetor* Say. (Hymenoptera : Braconidae) ile konukçuları *Ploia interpunctella* Hubner (Lepidoptera : Pyralidae) ve *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera : Pyralidae) arasındaki biyolojik ilişkiler üzerine araştırmalar,” Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2004.
- [34] Tunçyürek, C. M., “*Bracon hebetor* Say. (Hymenoptera : Braconidae) ile *Carda cautella* (Walk.) ve *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera : Pyralidae) ‘ya karşı biyolojik savaş imkanları üzerine araştırmalar,” Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü araştırma eserleri serisi, Teknik bülten No:20, sayfa 78, İzmir, 1972.

- [35] Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding," *Annual Biochemistry*, **72**, 248-254, 1976.
- [36] Laemmli, U. K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage," *Nature*, **227**, 680-685, 1970.
- [37] Haurneland, N. H., "Insect storage proteins: gene families and receptors," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **26(8-9)**, 755-765, 1996.
- [38] Ferkovich, S. M., Greany, P. D. Ve Dillard, C., "Changes in hemolymph proteins of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), associated with parasitism by the braconid parasitoid *Cotesia marginiventris* (Cressson)," *Journal of Insect Physiology*, **29(12)**, 933-942, 1983.
- [39] Nakamatsu, Y., Gyotoku, Y. ve Tanaka, T., "The endoparasitoid *Cotesia caryyai* (Ck) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia seperata* larvae by venom and Ck polydnvirüs," *Journal of Insect Physiology*, **47**, 573-584, 2001.
- [40] Hochuli, A., Wilhelm-Pfister, R. Ve Lanzrein B., "Analysis of endoparasitoid- released proteins and their effects on host development in the system *Chelonus inanitus* (Braconidae) *Spodoptera littoralis* (Noctuidae)," *Journal of Insect Physiology*, **45**, 823-833, 1999
- [41] Quistad, G. B., Nyugen, Q., Bernasconi, P. ve Leisy, D. J., "Purification and characterization of insecticidal toxins from venom of the parasitic wasp, *Bracon hebetor*," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **24(10)**, 955-961, 1994.
- [42] Christian, P. D., Baule, V. J., Duncan, R. E. ve Windass, J. D., "*Bracon hebetor* toxins and DNA encoding them – useful in biological control agents to combat insect pests," Australia ve USA, Patent No: AU713922-B; AU9538777 –A, 1995.
- [43] Beckage, N. E. ve Gelman D. B., "Wasp parasitoid disruption of host development: Implication for new biologically based strategies for insect control," *Annual Revival Entomology*, **49**, 299-330, 2004.
- [44] Nakamatsu, Y. ve Tanaka T., "Development of a gregarious ectoparasitoid, *Euplectrus seperatae* (Hym: Eulophidae), that parasities *Pseudaletia*

- seperata* (Lep: Noctuidae),” *Arthropod Structure & Development*, **32**, 329-336, 2003.
- [45] Coudron, T. A., Brandt, S. L. ve Raqib A., “ Comparison of the response of *Heliothis virescens* to parasitism by *Euplectrus comstockii* and *Euplectrus plathypence*,” *Comparative Biochemistry and Physiology*, **116B(2)**, 197-202, 1997.
- [46] Luckhart, S. ve Webb, B. A., “ Interaction of a wasp ovarion protein and polydnavirüs in host immune suppression,” *Developmental and Comparative Immunolgy*, **20(1)**, 1-21, 1996.
- [47] Beintema, J. J., Stam, W. T., Hazes, B. ve Smidt, M. P., “ Evolution of Arthropod Hemocyanins and insect storage proteins (Hexamerins),” *Moleculer Biology Evolutuion*, **11(3)**, 493-503, 1994.
- [48] Orth, A. P., Doll, S. C. ve Goodman, W. G., “ Sequence, structure and expression of the hemolymph juvenile hormone binding protein gene in the tabacco hornworm, *Manduca sexta*,” *Insect Biochemistry and Moleculer Biology*, **33**, 93-102, 2003.
- [49] Lee, Y. H., Lee, H. Y. ve Kim, H. R., “ Purification and characterization of epidermis- origin hemolymph protein in *Galleria mellonella*,” *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **125**, 95-104, 2000.