

Besinsel Yağ Asitlerinin Farklı Oranlarının *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera:Ichneumonidae) Ergin Dişilerinin Yumurta Verimine Etkileri

Leyla KALYONCU¹, M. Yaşar AKSOYLAR²

Özet: Bu çalışmada besinsel yağ asitlerinin farklı oranlarının *Pimpla turionellae* ergin dişilerinin yumurta verimine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada doğal besin, sentetik temel besin, yağ asitsiz besin ve farklı oranlarda yağ asitleri içeren besinler kullanılmıştır. Ergin dişiler 31 gün boyunca bu besinler ile beslenmiştir. Farklı besinlerin yumurta verimine ve yumurta açılma yüzdesine önemli etkisinin olmadığı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Hymenoptera, *Pimpla turionellae*, sentetik besin, yumurta verimi.

Effects of Different Ratios of Dietary Fatty Acids on Fecundity of Female Adults of *Pimpla turionellae* L.(Hymenoptera:Ichneumonidae)

Abstract: This study was carried out to determine the effects of different ratios of dietary fatty acids on fecundity of adult females of *Pimpla turionellae*. At the study, natural diet, basic synthetic diet, fat free diet and diet containing different ratios of fatty acids were used. Adult females were fed with diets during 31 days. It was also found that different diets have no significant effect on the fecundity and hatching ratio.

Key Words: Hymenoptera, *Pimpla turionellae*, synthetic diet, fecundity.

Giriş

Hymenoptera ordosuna ait böceklerin büyük çoğunluğu parazitoid türlerdir (1). Parazitoid türler zararlı böcekleri hem beslenmek hem de üremek için kullanırlar. Bu özelliklerinden dolayı parazitoid türler, biyolojik kontrolde oldukça önemli bir role sahiptirler (2). Parazitoid bir türün biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabilmesi için konak türden bağımsız kültürünün yapılması ve laboratuvar şartlarında kitle halinde üretilmesi gerekmektedir. Çoğu kez ergin evre sırasında beslenme yumurta üretimi için gerekli ise de pek çok böcek türü larval evre sırasında depoladıkları besinleri yumurta üretiminde kullanmaktadır (3). Uçma süresince glikojen biriktirmenin yanısıra yumurta olgunlaşması için lipid biriktirildiği belirlenmiştir (4).

Larval evrede ve ergin dönemde alınan besin çeşidi yumurta verimini oldukça etkilemektedir. Martin (5)'e göre pekçok böcek gibi *Pieris brassicae* yumurtaları embriyonik gelişim için lipidlere ihtiyaç duymaktadır (6). *Acheta domesticus* türünde ise prostaglandinlerin dişilerde yumurta bırakma davranışını etkilediği tespit edilmiştir (7). Besindeki yağ asidi bileşiminin ergin evrede en fazla yumurta verimini etkilemesine rağmen *Ceratitis capitata* erginlerinde besinsel lipidlerin yumurta verimi için temel olmadığı sonucuna varılmıştır (3). *Pimpla turionellae* ergin dişileri için hazırlanan sentetik besinle beslenen dişilerde yumurta verimi en iyi 25-31. günler arasında iken, doğal besin ile beslenen dişilerde 19-25. günler olduğu tespit edilmiştir. Her iki besininde deney periyodu süresince böceğin yaşaması üzerine olumsuz etkisi olmadığı anlaşılmıştır (8). Emre ve Yazgan (9)'a göre lipid karışım oranındaki değişikliklerin *P. turionellae* erginlerinin yumurta verimine ve açılma oranı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada, kimyasal yapısı belirli sentetik besin kullanılarak, besinsel yağ asitlerinin farklı oranlarının *P. turionellae* ergin dişilerinin yumurta verimine etkileri araştırılmıştır.

¹ S.Ü.Fen-Ed.Fak. Biyoloji Bölümü Konya

² S.D.Ü.Fen-Ed.Fak.Biyoloji Bölümü Isparta

Materyal ve Metot

Stok Kültürlerin Hazırlanması

Çalışmada aynı laboratuvar şartlarında kültüre alınan *Galleria mellonella* ve *Pimpla turionellae* türleri kullanılmıştır.

Konak tür *G. mellonella* kültürü, Bronskill (10)'den yararlanılarak hazırlanmıştır. Bu yarı sentetik besin cam kavanozlara konulmuş, içlerine birkaç adet *G. mellonella* ergini bırakılmış ve kavanozun ağzı çift kat tülbent ile kapatılarak 25 ± 1 °C sıcaklık ve % 60 ± 5 bağıl nemde gelişmeye bırakılmıştır. Yaklaşık 20-30 gün içinde kültür gelişerek *G. mellonella* larvaları gelişmeye başlamıştır. Gelişen 7. evre larvalar içlerinde pelur kağıdı bulunan beherlere alınmış ve aynı laboratuvar şartlarında pup oluşumu için bırakılmıştır. Oluşan puplar dikkatli bir şekilde alınmış ve *P. turionellae* kültürün devamı için kullanılmıştır.

Elde edilen puplar 20x20x20 cm boyutlarındaki tel kafese alınarak *P. turionellae* dişi bireylerinin parazitlenmesi sağlanmıştır. Parazitlenen puplar beherlere alınarak üzerine parazitlenme tarihleri yazılmış ve beherin ağzı tek kat tülbent ile kapatılmıştır. Yaklaşık 16-17 gün sonra *P. turionellae* ergin bireyleri çıkmaya başlamıştır. Çıkan erginler kültürün devamında kullanılmış ve % 50'lik bal çözeltisi ve konak hemolenfi ile beslenmiştir.

Stok kültürler ve deney grupları 12 saatlik fotoperiyod uygulanarak yetiştirilmiştir.

Sentetik Besinlerin Hazırlanması

Kimyasal yapısı belirli sentetik besinler Emre (8)'den yararlanılarak hazırlanmış ve deney gruplarının beslenmesinde kullanılmıştır. Öncelikle stok karışımlar hazırlanmış ve sentetik besinlerin hazırlanmasında bu stoklardan yararlanılmıştır.

Örneklerin Elde Edilmesi

Deney grupları *G. mellonella* puplarından çıkmış, beslenmemiş ve çiftleşmiş *P. turionellae* ergin dişilerinden oluşturulmuştur. Her deney grubu için beşer ergin dişi birey alınarak beherlere konulmuş ve üzeri tek kat tülbentle kapatılmıştır. Hazırlanan besin çeşidine göre beherler etiketlenmiştir.

Hazırlanan sentetik besinin lipid karışımındaki yağ asitlerinin farklı oranlarının *P. turionellae* dişilerinin yumurta verimine etkisinin incelendiği bu çalışmada, doğal besin (konak hemolenfi ve bal çözeltisi), sentetik temel besin, linoleik asit, linolenik asit, palmitik asit, stearik asit ve oleik asit'lerin 100 ml besindeki miktarlarının 1/2 ve 3/2 oranlarında hazırlanan besinler ve yağ asitsiz besin üzere toplam 13 farklı besin hazırlanmıştır. Hazırlanan deney grupları 31 gün boyunca beslenmek üzere denemeye alınmıştır.

Doğal besin ile beslenen gruplara ise her gün pamuk yardımıyla % 50'lik bal çözeltisi ve 3 günde bir *G. mellonella* pupu verilmiştir.

31 günlük uygulamada deney gruplarına 10. günden itibaren üç günde bir *G. mellonella* pupu verilerek yumurta bırakmaları sağlanmıştır. Beherde 30 dakika bırakılan puplar alınarak aynı laboratuvar şartlarında bir gün bekletilmiştir. Bir günün sonunda % 0,8 lik NaCl çözeltisi içine alınarak disekte edilmiş ve bırakılan yumurtalar sayılmıştır. Daha sonra yumurtalar açılmak üzere yeni bir petri kabındaki % 0,8 lik NaCl çözeltisine aktarılmıştır. Petri kabı içinde 24 saat bekletildikten sonra binoküler mikroskop altında incelenerek açılan yumurta sayısı belirlenmiştir. Denemeler üçer tekrar halinde uygulanmıştır.

Verilerin Değerlendirilmesi

Her deney grubu için behere konulan *G. mellonella* pupuna bırakılan toplam yumurta sayısı o beherdeki dişi bireylerin sayısına bölünerek birey başına bırakılan ortalama yumurta sayısı saptanmıştır. Yumurta açılma oranı ise açılan yumurtaların bırakılan toplam yumurta sayısına göre yüzdesinin hesaplanması ile belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi varyans analizi (11) ile yapılmıştır. Ortalamalar arası farkın önem kontrolü için Duncan (12)'nin "Multiple Range Test" i kullanılmış ve önem seviyesi 0,05 alınarak ortalamalar arası fark "F" değerinden büyük olduğu zaman önemli kabul edilmiştir.

Araştırma Sonuçları

Bileşimindeki Yağ Asidi Oranları Farklı Sentetik Besinler ile Beslenen *P. turionellae* Ergin Dişilerinin Yumurta Verimleri

Farklı besin grupları ile 31 gün süre ile beslenen ve beslenmenin onuncu gününden itibaren üç günde bir *G. mellonella* puplarına parazitleme yaptırılan *P. turionellae* ergin dişi bireylerinin bıraktıkları yumurta sayıları tespit edilmiş ve Tablo 1'de verilmiştir.

En yüksek yumurta verimi doğal besin ve yağ asitsiz besin ile beslenen grupta 22. günde tespit edilirken, sentetik temel besin ile beslenen grupta 19. günde bulunmuştur. Diğer besin çeşitlerinde ise parazitlenme günlerine göre farklılıklar vardır.

Deney gruplarında 10. günde bırakılan yumurta sayısı 1.94 ile en yüksek doğal besin ile beslenen grupta bulunurken, en düşük yumurta sayısı (0.80) linolenik asidin 3/2 oranında artırılması ile hazırlanan besin ile beslenen grupta bulunmuştur. Bu parazitlenme günü açısından doğal besin, sentetik temel besin ve yağ asitsiz besin ile beslenen grupların farksız olduğu tespit edilmiştir.

13. günde yapılan parazitlenme sonucu en düşük yumurta verimine sahip grup palmitik asidin 3/2 oranında artırıldığı besin ile beslenen grup olurken bu grubun diğer besin çeşitleri ile beslenen deney grupları ile farksız olduğu, doğal besin ile beslenen deney grubu ile farklı olduğu bulunmuştur. 13. günde en yüksek yumurta verimi 3.47 ile doğal besin ile beslenen gruba ait iken, bu deney grubunun sentetik temel besin ve yağ asitsiz besin ile beslenen grup ile farksız olduğu tespit edilmiştir.

16. günde en yüksek yumurta verimi 4.27 ile linoleik asidin sentetik temel besindeki miktarının 3/2 oranında artırıldığı besin ile beslenen grupta olmuştur. En düşük yumurta sayısı sentetik temel besin ile beslenen gruba aittir.

19. günde en yüksek yumurta verimi 5.24 ile palmitik asidin 1/2 oranında azaltıldığı besin ile beslenen grupta bulunmuştur. Bu grup ile sentetik temel besin ile beslenen grup arasında istatistiksel fark olduğu tespit edilmiştir. Bu parazitlenme günü açısından doğal besin, sentetik temel besin ve yağ asitsiz besin ile beslenen grupların farksız olduğu belirlenmiştir.

22. günde en yüksek yumurta verimi palmitik asidin 1/2 oranında azaltıldığı besin grubunda görülmüştür. Bu değer 28. gündeki linoleik asidin 3/2 oranında artırılmış besin ile beslenen grubdan sonra ikinci en yüksek değer olarak bulunmuştur. 22. günde sentetik temel besin ile beslenen grubun yumurta verimi doğal besine göre daha düşüktür.

25. günde yapılan parazitlemede linolenik asidin sentetik temel besindeki miktarının 3/2 oranında artırılması ile hazırlanan besin ile beslenen deney grubunun en yüksek (6.07) yumurta verimine sahip olduğu, bu grup ile sentetik temel besin ve stearik asidin 3/2 oranında artırıldığı besin grubu hariç, diğer besin grupları arasında istatistiksel fark bulunmamıştır.

28. günde en düşük yumurta verimi stearik asidin 3/2 oranında artırılarak hazırlandığı besin çeşidinde bulunmuş ve bu grup ile sadece palmitik asidin 3/2 oranında hazırlandığı besin ve linoleik asidin 3/2 oranında artırıldığı besin çeşidi arasında yumurta verimi açısından fark olduğu görülmüştür. Bu parazitlenme günü açısından doğal besin ile sentetik temel besin ve yağ asitsiz besin ile beslenen deney gruplarının farksız olduğu tespit edilmiştir.

31. günde ise en düşük değere (2.37) sahip stearik asidin 3/2 oranında artırılarak hazırlanan besin grubu ile linoleik asidin % 50 artırıldığı besin ve linolenik asidin 3/2 oranında hazırlanan besin ile beslenen deney grubunda fark varken diğer deney grupları farksızdır. 31. günde en yüksek değer 5.67 ile linoleik asidin sentetik temel besindeki miktarının 3/2 oranında artırıldığı besin ile beslenen gruba aittir. Buna rağmen bu besin grubu ile doğal besin ve sentetik temel besin ile beslenen grupların farklı olmadığı tespit edilmiştir.

Sentetik temel besindeki yağ asitlerinin farklı oranları ile hazırlanan besinler ile beslenen deney gruplarının 10. günden itibaren bıraktıkları yumurta sayılarında sentetik temel besine ve doğal besine göre çok önemli sayılabilecek bir artışın meydana gelmediği, kullanılan besin tiplerinin *P. turionellae* ergin dişilerinin yumurta bırakma davranışı üzerine olumsuz etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Bileşimindeki Yağ Asidi Oranları Farklı Sentetik Besinler ile Beslenen *P. turionellae* Ergin Dişilerinin Yumurta Açılma Yüzdeleri

Doğal besin ve sentetik temel besin ile sentetik temel besindeki yağ asitlerinin farklı oranlarının uygulandığı çalışmada *G. mellonella* puplarına bırakılan yumurtaların açılma yüzdeleri Tablo 2'de verilmiştir.

BESİNSEL YAĞ ASİTLERİNİN FARKLI ORANLARININ *PIMPLA TURIONELLAE* L..
(HYMENOPTERA:ICHNEUMONIDAE) ERGİN DIŞİLERİNİN YUMURTA VERİMİNE ETKİLERİ

Doğal besin ve sentetik temel besin ile beslenen deney gruplarında 31. gündeki uygulama hariç diğer parazitlenme günlerinde istatistiksel yönden fark bulunmamıştır. 10. günde bırakılan yumurtaların açılma oranı % 93.34 ile en yüksek sentetik temel besindeki stearik asidin miktarının 1/2 oranında azaltılması ile hazırlanan besin çeşidinde ortaya çıkmış, buna rağmen bu grup ile palmitik asidin 3/2 oranında artırıldığı besin ile beslenen grup ve linolenik asidin 3/2 oranında hazırlanan besin çeşidi hariç diğer besin gruplarında istatistiksel açıdan fark yoktur.

13. gündeki yumurtaların açılma oranı % 89.15 ve % 66.07 değişmesine rağmen gruplar birbirinden farksızdır.

16. günde en düşük yumurta açılma oranı % 68.37 ile stearik asidin 3/2 oranında artırılarak hazırlanan besin ile beslenen gruba aittir. Bu grup ile doğal besin ile beslenen deney grubu arasında fark varken, sentetik temel besin ile beslenen grup ile farksız olduğu tespit edilmiştir.

19. günde ise en yüksek orana sahip grup yağ asitsiz besin ile beslenen deney grubu ile en düşük yüzdeye sahip stearik asidin 1/2 oranında azaltıldığı grup arasında istatistiksel fark varken diğer deney grupları arasında önemli fark olmadığı görülmüştür.

22. gündeki yumurta açılma oranında en yüksek oran % 90.09 ile yağ asitsiz besin ile beslenen grup olurken bu grup ile stearik asidin 3/2 oranında artırıldığı besin ile beslenen grup, palmitik asidin 1/2 oranında azaltılarak hazırlanan besin ile beslenen deney grubu ve sentetik temel besin ile beslenen grup hariç diğer deney gruplarında fark görülmemiştir.

25. gündeki yumurta açılma oranlarının doğal besin ile beslenen deney grubu ile stearik asidin 3/2 oranında artırılarak hazırlanan besin ile beslenen grupta fark varken, en yüksek oran % 89.63 ile linoleik asidin miktarının 1/2 oranında hazırlanan besin ile beslenen deney grubuna aittir.

28. günde yumurta açılma oranı % 84.13 ile % 61.83 arasında değişmektedir.

31. günde ise sentetik temel besine göre 3/2 oranında stearik asit içeren besin ile beslenen grupta yumurta açılma oranı % 57.76 ile en düşük yüzdeye sahiptir. Bu grubun sentetik temel besin ile beslenen gruptan farksız, doğal besin ile beslenen gruptan farklı olduğu tespit edilmiştir.

Yağ asidi oranlarında yapılan değişikliklere bağlı olarak *P. turionellae* ergin dişilerinin bıraktıkları yumurtaların açılma yüzdelerinde besin tiplerine göre önemli değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir.

Tartışma

Doğal besin, sentetik temel besin, yağ asitsiz besin ve sentetik temel besindeki yağ asitlerinin farklı oranları kullanılarak hazırlanan besinlerin *P. turionellae* ergin dişilerinin yumurta verimine ve yumurta açılma oranına olumsuz etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Doğal besin olarak kullanılan konak hemolenfi ve % 50'lik bal çözeltisi ile hazırlanan besin ile beslenen dişi bireylerin 10. günden itibaren bıraktıkları yumurta sayısında 28. gün hariç, 31. güne doğru giderek arttığı tespit edilmiştir. Aynı bulgular Emre (8) tarafından aynı tür ile yapılan çalışmada da bulunmuştur. En iyi yumurta veriminin bu çalışmada olduğu gibi 19. ve 25. günlerde olduğu 28. günde yumurta veriminde düşüş olduğu belirtilmiştir. Sentetik temel besin ile beslenen deney grubunda da onuncu günden itibaren bırakılan yumurta sayısında artma olduğu gözlenmiştir. Hymenopter türler yumurta üretimi için gerekli olan yağ asitlerini larval evrede biriktirdiği rezervlerden karşılamaktadır. Bu çalışmada da yağ asitsiz besin ile beslenen dişi bireylerin yumurta veriminde bu besin tipinin olumsuz etkisinin olmadığı bulunmuştur. *Anthonomus grandis* Boheman ergini ile yapılan bir çalışmada ergin besininden, mısır yağı ve yağda çözünen vitaminlerin ikisinin birden çıkarılması yumurta üretimini önemli ölçüde azaltmaktadır. Bununla birlikte ergin bireyler kolesterol içermeyen besin ile beslendiğinde çıkışlarını izleyen onbirinci günde tek bir yumurta dahi açılmadığı belirlenmiştir (13). Buna ilaveten bu böcek türünün erginlerinin yağsız besinde normal gelişimlerini sürdürdükleri fakat larval ve ergin besinin her ikisinde de yağ sağlanmadıkça yumurta üretiminin oldukça az olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde *Bombyx mori* türünün dişi bireylerinde prostaglandinlerin yumurta bırakma davranışını artırdığı tespit edilmiştir. Virjin dişilere prostaglandinin 1, 10 ve 100 mikrolitrelik oranlarda enjeksiyonundan sonra sırası ile fert başına 32, 42 ve 63 adet yumurta bıraktıkları belirlenmiştir (14). Stanley-Samuelson ve ark. (15)'na göre de yumurta bırakma davranışına prostaglandinlerin etkisi vardır. Loher ve ark. (16) prostaglandinlerin farklı dozlarının uygulandığı bir çalışmada virjin dişilere verilen düşük dozdaki prostaglandinlerin yumurta bırakma davranışını önemli ölçüde artırdığını tespit etmişlerdir. Besindeki yağ asidi bileşiminin ergin evrede en fazla yumurta verimini etkilemesine rağmen *Ceratitis capitata* erginlerinde besinsel lipidlerin yumurta verimi için temel olmadığı sonucuna varılmıştır (3).

Farklı besinler ile beslenen *P. turionellae* dişi bireylerinin bıraktıkları yumurtaların açılma oranlarında önemli sayılabilecek farklılığın olmaması kullanılan besin tiplerinin yumurta açılma oranında etkisinin olmadığını göstermiştir. Yumurta açılma yüzdesinde doğal besin ve sentetik temel besin ile beslenen deney

gruplarında 31. gün hariç diğer parazitleme günlerinde istatistiksel fark olmadığı tespit edilmiştir. Denenen besin tiplerinin tümünde 13. günde bırakılan yumurtaların açılma oranlarının farksız olduğu bulunmuştur.

Besin bileşenlerinin böceklerde yumurta verimini etkilemesi açısından, besinsel yağ asitlerinin etkilerinin bilinmesi ve böcek türleri için en uygun sentetik besinlerin geliştirilmesi biyolojik mücadelede kullanılacak türlerin laboratuvar şartlarında yetiştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

Kaynaklar

- 1.Waage, J.K. and Hassell, M.P. **Parasitoids as biological control agents a fundamental approach**. Parasitol., 84, 241-268, (1982) .
- 2.Vinson, S.B. **Host selection by insect parasitoids**. Ann. Rev. Entomol., 21, 109-133, (1976).
- 3.Cangussu, J.A. and Zucoloto, F.S. **Nutritional value and selection of different diets by adult *Ceratitis capitata* flies (Diptera:Tephritidae)**. J.Insect Physiol., 38:7, 485-491, (1992) .
- 4.Willers, J.L., Schneider, J.C. and Ramaswamy, S.B. **Fecundity, longevity and caloric patterns in female *Heliothis virescens*: changes with age due to flight and supplemental carbohydrate**. J. Insect Physiol., 33:11, 803-808, (1987).
- 5.Martin, J.S. **Lipid composition of fat body and its contribution to the maturing oöcytes in *Pyrrhocoris apterus***. J. Insect Physiol., 15, 1025-1045, (1969).
- 6.Turunen, S. **Lipid utilization in adult *Pieris brassicae* with special reference to the role linolenic acid**. J. Insect Physiol., 20, 1257-1269, (1974).
- 7.Stanley-Samuelson, D.W. and Loher, W. **Arachidonic acid and other long-chained polyunsaturated fatty acids in spermatophores and spermatachae of *Teleogryllus commodus*: significance in prostaglandin-mediated reproductive behavior**. J. Insect Physiol., 29, 41-45, (1983).
- 8.Emre, İ. **Meridik bir besinin *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera : Ichneumonidae) ergin dişilerinin yumurta verimine etkisi**. DOĞA TU Biyol. D., 12:2, 101-105, (1988).
- 9.Emre, İ. ve Yazgan, Ş. **Besin bileşenlerinin *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera : Ichneumonidae)'nın üremesi üzerine etkileri**. DOĞA Tr. J. of Biology, 14, 96-104, (1990).
- 10.Bronskill, J.K. **A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae)**. J. Lep.Soc., 102-104, (1961).
- 11.Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. **Statistical Methods, 6th ed.** Ames, Iowa, U.S.A., Iowa State University Press., (1967).
- 12.Duncan, D.B. **Multiple range and multiple F tests**. Biometrics, 11, 1-14, (1955).
- 13.Vanderzant, E.S. and Richardson, C.D. **Nutrition of the adult boll weevil: Lipid requirements**. J. Insect Physiol., 10, 267-272, (1964).
- 14.Yamaja Setty, B.N. and Ramaiah, T.R. **Effect of prostaglandins and inhibitors of prostaglandin biosynthesis on oviposition in the silkmoth *Bombyx mori***. Indian J. Exp. Biol., 18, 539-541, (1980).
- 15.Stanley-Samuelson, D.W., Peloquin, J.J. and Loher, W. **Egg-laying in response to prostaglandin injections in the Australian field cricket, *Teleogryllus commodus***. Physiol. Entomol., 11, 213-219, (1986b).
- 16.Loher, W., Ganjian, I., Kubo, I., Stanley-Samuelson, D. and Tobe, S. **Prostaglandins: their role in egg-laying of the cricket *Teleogryllus commodus***. Proc. Nat. Acad. Sci.U.S.A., 78, 7835-7838, (1981).