



**Toxicological effects of the entomopathogenic *Purpureocillium lilacinus* on the model organism, *Galleria mellonella***

Hülya ALTUNTAŞ<sup>\*1</sup>, Emine DUMAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Anadolu University, Eskişehir, 26470, Turkey

**Abstract**

The toxicological effects of entomopathogenic fungus *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones and Samson on the *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvae which have great importance in biological, physiological and biochemical studies as a model insect were investigated. For this purpose, larvae were injected with median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) 2.82 x 10<sup>3</sup> conidia/ml suspension. Hemolymph samples were collected after injection at 24, 48, 72 and 96 hours. Total protein analysis and specific enzyme activities of CAT and GST in the hemolymph were analyzed spectrophotometrically. Total protein amount in the hemolymph of the infected larvae decreased at all times when compared with control groups. Furthermore, the activity of GST in the hemolymph of the infected larvae increased at all times compared with untreated larvae, but the activity of CAT was similar with activity of untreated larvae. Consequently, increasing the activity of GST showed that entomopathogen organisms are effective on the antioxidant defense system of insects as a source of free radical. CAT activity in the absence of any change showed inactivation of CAT out of increased superoxide radicals based pathogenicity. Therefore, we suggest that the variance in the activity of CAT and GST in larvae may indicate a physiological adaptability to compensate for pathogen-induced stress.

**Key words:** *Galleria mellonella*, *Purpureocillium lilacinus*, entomopathogen fungus, catalase, glutathione S-transferase

----- \* -----

**Entomopatojenik *Purpureocillium lilacinus*'un model organizma, *Galleria mellonella* üzerindeki toksikolojik etkileri**

**Özet**

Biyolojik, fizyolojik ve biyokimyasal araştırmalarda model organizma olarak büyük öneme sahip olan *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları üzerinde entomopatojenik fungus *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones ve Samson'un toksikolojik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla ortalama letal konsantrasyon (LC<sub>50</sub>) olan 2.82 x 10<sup>3</sup> spor/ml süspansiyonu kullanılarak son evre larvalara enjeksiyon yapıldı. Enjeksiyondan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra larvalardan hemolenf alındı. Hemolenf örneklerinde toplam protein miktarı, katalaz (CAT) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri spektrofotometrik olarak analiz edildi. *P. lilacinus* ile enfekte olan larvaların toplam protein miktarı tüm saatlerde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında azalış göstermektedir. Ayrıca fungal enfeksiyona bağlı olarak GST enzim aktivitesi zamanla artış gösterirken, CAT enzim aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, larval GST aktivitesinde görülen artışın patojenite kaynaklı oksidatif stresin telafi edilebilmesi için fizyolojik bir uyum olabileceğine, CAT aktivitesinde hiçbir değişimin olmaması ise patojenite kaynaklı artan süperoksit radikallerinin enzimin inaktivasyonuna neden olabileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle, CAT ve GST aktivitesinde görülen bu değişikliklerin nedeninin patojen kaynaklı strese karşı oluşan fizyolojik onarım mekanizmalarıyla ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** *Galleria mellonella*, *Purpureocillium lilacinus*; entomopatojen fungus, katalaz, glutatyaon-S-transferaz

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902223350585; Fax.: +902223204910; E-mail: hycalcitas@anadolu.edu.tr

© 2008 All rights reserved / Tüm hakları saklıdır

## 1. Giriş

Biyolojik çeşitliğin en önemli unsurlarından birisi olan böceklerin ekolojik ortamlarında büyüme ve gelişimlerini etkileyen biyolojik ve biyolojik olmayan çeşitli etkenlerin olduğu bilinmektedir. Böceklerin gelişim sürecinde maruz kaldıkları önemli etkenlerden birisi de ksenobiyotiklerdir (Wu vd., 2004). Böceklerin ksenobiyotiklerin etkileri altında kalmaları, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna ve dolayısıyla metabolik olayların bozulmasına neden olur. Serbest oksijen radikalleri, sahip oldukları paylaşılmamış elektronları nedeniyle yüksek aktiviteye sahip olan atom ve moleküllerdir. Bu radikaller hücre zarının doymamış yağ asitleri ile protein bileşimi üzerine zarar vermektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2007). Serbest radikallerin zar ile etkileştiği durumda enzimler, hormonlar ve nörotransmitter maddeler de olumsuz yönde etkilenmektedir. Patofizyolojik durumlarda üretilen bu serbest oksijen radikalleri canlılarda antioksidan sistemler ile uzaklaştırılır (Felton ve Duffey, 1991; Felton ve Summers, 1995; Krishnan ve Sehna, 2006). Omurgalılarda olduğu gibi böceklerde de enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri vardır. Enzimatik sistemin başlıca elemanları süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-transferaz (GST) enzimleridir (Krishnan ve Kodrik, 2006). Bu nedenle, böceklerin çevresel koşullara karşı başarılı adaptasyonları, etkili detoksifikasyon mekanizmaları ve bu maddelerin vücutlarından giderilmesi ile gerçekleşmektedir (Goryunova vd., 1991; Wu vd., 2004). Bu detoksifikasyon enzimlerinin rolü, böcekleri insektisitlerin, çeşitli bitkisel metabolitlerin veya entomopatojenik mikroorganizmaların olumsuz etkilerinden koruması ile sınırlandırılmamıştır. Örneğin, bazı hormonların, feromonların ve diğer biyolojik aktif maddelerin metabolizmasına da aracılık etmektedirler (Terriere, 1984; Feyereisen, 1999). Bu yüzden, böceklerde antioksidan enzim aktivitelerinde ortaya çıkabilecek farklılıklar sadece ksenobiyotiklere karşı gelişebilecek direnç mekanizmasını değil, aynı zamanda biyolojik uyum kapasitesini de göstermektedir (Terriere, 1984; Fuchs vd., 1993).

Böceklerde detoksifikasyon enzimlerinin inhibisyonu ya da aktivitesindeki değişikliklerin nedenleri arasında günümüzde ksenobiyotikler arasında da yer alan entomopatojenik funguslarla ilişkili enfeksiyonlar da olabilir (Kol'chevskaya ve Kol'chevkii, 1988; Xia vd., 2000; Serebrov vd., 2003). Entomopatojenik funginin zararlı böceklerde gösterdiği patojen etki konukçularının zayıflaması veya ölümleri ile ilişkilidir (Sanjaya vd., 2016). Entomopatojenik fungusların diğer mikroorganizmalar ile kıyaslandığında zararlı böcekler üzerinde daha fazla türde etkili olduğu bilinmektedir (Deacon, 1983). Ayrıca *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* ve *Lecanicillium lecanii* türlerinin tüm dünyada yaygın olarak bulunan entomopatojenik fungus türleri olduğu ve birçok zararlı böcek türünde insektisidal etki gösterdikleri daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Deacon, 1983; Sanjaya vd., 2016). Entomopatojenikler yaşayan, çoğalan ve enfeksiyöz özellik taşıyan varlıklardır. Organizmaları enfekte etmeleri göz önüne alınarak spesifite çalışmaları özellikle de ekotoksitite analizleri titizlik ile yapılmalıdır. Ancak, entomopatojenik fungusların böcek popülasyonlarında geniş ölçüde yayılmış olmasına rağmen, literatürde enfeksiyona bağlı detoksifikasyon enzimlerinde meydana gelen değişiklikler ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır (Serebrov vd., 2006). Bu nedenle bu çalışmada doğal ortamını çok çeşitli toprakların oluşturduğu ve lila renkli koloniler üretmesi ile karakterize edilen bir entomopatojenik fungus türü olan *Purpureocillium lilacinus* (KUKENS WDCM101) [eski adı ile *Paecilomyces lilacinus* (Thom)] ve model böcek büyük bal mumu güvesi *G. mellonella* türü kullanılmıştır. Büyük bal mumu güvesi *G. mellonella*'nın özellikle de larval döneminin immünojenik, patojenik, genotoksik ve biyokimyasal çalışmalarda iyi bir fizyolojik model olduğu ve laboratuvar şartlarında kolayca kültüre edildiği bilinmektedir (Cook ve McArthur, 2013; Emre vd., 2013; Ergin vd., 2013).

Çalışmamızda model organizma olarak *G. mellonella* türüne ait son evre larvalar kullanılarak, böceklerin önemli detoksifikasyon enzimlerinden olan katalaz (CAT) ve glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitelerinin fungal enfeksiyona bağlı değişimlerinin laboratuvar ortamında araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve yöntem

### 2.1 Böcek kültürünün hazırlanması

*G. mellonella* kültürünün yetiştirilmesi 25±2 °C sıcaklık, % 60±5 bağıl nem ve 12:12 saat (aydınlık: karalık) fotoperiyot şartlarında sağlandı. Kültürün devamlılığı ve deneysel çalışmalarda kullanılacak son dönem larvaların seçimi için steril edilmiş 40 g yarısentetik besiyeri (Bronskill, 1961) içeren beş adet 1000 ml'lik her bir cam kavanoz içerisine *G. mellonella*'ya ait beş adet erkek, beş adet dişi ergin birey, çiftleşmek ve yumurta bırakmak üzere konularak beş gün bekletildi. Beşinci günün sonunda ergin bireyler kavanozlardan alındı. Yumurtaların açılmasından itibaren *G. mellonella* larvaları son evreye (0,17 ± 0,02 g) ulaşıncaya kadar takip edildi. Son evreye ulaşan larvaların bir kısmı deney grupları için kullanılırken diğer kısmı kültürün devamlılığının sağlanmasında kullanıldı.

### 2.2 Entomopatojenik fungus kültürünün hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan entomopatojenik *P. lilacinus* Eskişehir ili çevresindeki tarım topraklarından elde edilmiş ve Pitt (1979)'a göre teşhis edilmiştir (Demirel vd., 2005). Kullanılan suş KUKENS kültür

kolleksiyonunda (WDCM101) muhafaza edilmektedir. Entomopatojenik *P. lilacinus*'un kültüre edilmesi için Malt Ekstrat Agar (MEA- Merck 1. 05398) besi ortamında 28 °C'de 14 gün süre ile inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

### 2.3 Deney gruplarının hazırlanması

Entomopatojenik *P. lilacinus*'un *G. mellonella* üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla Şanal vd., (2011) tarafından belirlenen ortalama letal konsantrasyon (LC<sub>50</sub>) olan 2.82 x 10<sup>3</sup> spor/ml spor konsantrasyonu kullanılmıştır. Spor süspansiyonunun hazırlanması için MEA ortamında 28 °C'de 14 gün süre ile geliştirilmiş olan *P. lilacinus* kültüründen steril koşullarda alınan biyokütle % 0.1'lik Tween 80 (Sigma) içerisine homojen olarak karıştırılmış ve Thoma lamı ile sayım işlemi gerçekleştirilmiştir (Halkman, 2005).

Entomopatojenik *P. lilacinus* ile enjeksiyon işlemi için son döneme ulaşan *G. mellonella* larvaları kullanılmıştır. 2.82 x 10<sup>3</sup> spor/ml olarak hazırlanan spor solüsyonu Helminton şırınga (10 µl) ile larvanın 1. arka ekstremitesinin kaidesinden vücut boşluğuna enjekte edildi. Kontrol grubunun oluşturulmasında ise % 0.1'lik Tween 80 kullanılarak, enjeksiyon işlemi aynı şekilde yapıldı. Enjeksiyon işleminin ardından steril edilmiş yarı sentetik *G. mellonella* besini (1 larva için 2 g besin) içerisine alınan larvalar stok kültür ile aynı fotoperiyot koşullarında inkübe edildi. Enjeksiyon işlemlerinden sonra inkübasyon saatleri olarak 24, 48, 72 ve 96. saatler seçildi. Belirlenen tüm saatler ve kontrol grupları için her bir tekrarda 10 larva olmak koşuluyla deneyler 3 kez tekrar edildi.

### 2.4 Larval hemolenf toplama ve ekstraksiyon işlemi

*P. lilacinus*'a ait spor solüsyonu ile enfekte olan ve olmayan son dönem larvalardan hemolenf toplama işleminden önce larvalar buz üzerinde bekletilerek hareketlerinin yavaşlatılması sağlandı. Bu işlemin ardından larvaların dış yüzeyi % 70'lik alkol içeren gazlı bez ile temizlendi ve larvaların ikinci ön ekstremite bölgesi steril diseksiyon iğnesi ile delinerek her bireyden 10 µl hemolenf mikrokapiller tüp ile toplandı. Elde edilen hemolenf örnekleri ise içerisinde 0.001 mg N-phenylthiourea (Sigma) (PTU) bulunan soğuk mini santrifüj tüplerine alındı.

Enfekte olan deney grupları ile enfekte olmayan kontrol gruplarına ait larval hemolenflerin ekstraksiyon işlemleri ise içerisinde soğuk homojenizasyon tamponu [0,15 M NaCl, 0,05 M fosfat tamponu (pH: 7,4)] bulunan tüplerde gerçekleştirildi. Larval hemolenflerin ekstraksiyonu için homojenizasyon tamponu ile dilüe (1: 3) edilen hemolenf örnekleri +4 °C'de, 10,000 g'de, 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant protein miktar tayini ile enzim aktivite deneylerinde kullanıldı.

### 2.5 Total protein miktar tayini ve enzim analizleri

*P. lilacinus* ile enfekte olan ve olmayan larval hemolenf örneklerinin ekstraksiyonu sonrası elde edilen homojenatlardan toplam protein miktar tayini Bradford (1976) yöntemine göre gerçekleştirildi. Bovine serum albümin (BSA) ile hazırlanan 1 mg/ml stok solüsyon ile 0,002 - 0,3 mg/ml aralığında standart protein çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan standart protein çözeltileri ve homojenatlara ait toplam protein ölçümleri spektrofotometrede (Shimadzu, UV-2101PC) 595 nm'de ölçüldü.

*G. mellonella* larval hemolenfinden elde edilen homojenatlardan katalaz (EC 1.11.1.6) aktivitesinin belirlenmesi için Chance ve Maehly (1995) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Bu yöntemde, katalazın hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene yıkım hızının hesaplanması esas alınmıştır. Bu amaçla, homojenat (40 µg/ml), 30 mM hidrojen peroksit ve fosfat tamponundan (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (pH: 7,00) oluşan karışım kuvars küvetine alındıktan sonra spektrofotometrede (Shimadzu, UV-2101PC) 240 nm'de 3 dakika boyunca azalan hidrojen peroksit ölçümü yapıldı. Elde edilen azalış miktarlarından sabit sayı (ε<sub>240</sub>: 0,0394 mM/cm) kullanılarak spesifik katalaz enzim aktivitesi (U/mg) hesaplandı. Ölçümlerde kör olarak fosfat tamponu (pH: 7,0) kullanıldı.

Enfekte olan ve olmayan larvaların hemolenfinden glutatyon-S-transferaz (E.C.2.5.1.18) enzim aktivitesinin belirlenmesi Boyland ve Chasseaud (1969) tarafından geliştirilen yöntemine göre gerçekleştirildi. Bu yöntem 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'nin redükte glutatyon ile konjugasyonunu katalize eden toplam GST (mikrozomal ve sitozolik) aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu amaçla 200 µg/ml protein içeren homojenat ve kokteyl (100 mM CDNB, 100 mM GSH (glutatyon) ve fosfat tamponu pH: 6,5) karışımı hazırlanarak, aktivite ölçümü spektrofotometrede (Shimadzu, UV-2101PC) 340 nm'de 5 dakika süresince yapıldı. Ölçüm sonucunda CDNB'nin redükte glutatyon ile reaksiyona girmesine bağlı olarak tioether yapısının oluşumuyla ilgili yükselen absorbans değerleri elde edildi. Elde edilen absorbans değerleri ile ε<sub>340</sub>: 0,0096 µM<sup>-1</sup> katsayısı kullanılarak spesifik enzim aktivitesi (U/mg) hesaplandı. Ölçümlerde kör olarak fosfat tamponu (pH: 6,5) kullanıldı.

### 2.6 İstatistik

*P. lilacinus* ile enfekte edilen ve kontrol grubuna ait enzim aktivite deneyleri her saat (24-48-72-96) için 10 adet son evre larva olacak şekilde 3 kez tekrar edilmiştir (n= 30). Tekrarlar sonucunda elde edilen her saatin enfekte grubu ve kontrolü Independent Sample T-test ile analiz edildi. Enzim aktivite farklılıklarında ise verilerin normal

dağılım gösterdiği istatistiksel olarak sınanmış ve tüm verilere One - Way Anova uygulanarak, % 95 güven aralığında Tukey gerçekten anlamlılık testi (Tukey's Honestly Significant) yapılmıştır (Windows versiyon 18.0, SPSS, Chicago, IL).

### 3. Bulgular

#### 3.1 Enjeksiyon sonrası total protein miktarlarındaki değişimler

*P. lilacinus* ile enfekte edilen *G. mellonella* larval hemolenfindeki toplam protein miktarlarının tüm saatlerde kendi kontrol gruplarına göre azaldığı tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Fakat kontrol ve enfekte grupların kendi aralarında protein miktarları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ( $p > 0,05$ ) belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. *G. mellonella* larvalarında enjeksiyon sonrası (24, 48, 72, 96 saat) toplam protein miktar değişimi

Süre (Saat)	Ort. $\pm$ SH Protein Miktarı (mg/ml)	
	Kontrol	Enfekte
24	11,77 $\pm$ 0,39x** a	10,25 $\pm$ 0,15y a*
48	12,09 $\pm$ 0,29x a	10,84 $\pm$ 0,56y a
72	12,09 $\pm$ 0,61x a	10,24 $\pm$ 0,32y a
96	12,87 $\pm$ 2,02x a	10,65 $\pm$ 0,21y a

\*Aynı sütunda (a) aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ( $P > 0,05$ , ANOVA Tukey HSD). Kontrol için  $F = 0,282$ ,  $df = 3,8$ ,  $P = 0,837$ ; Enfekte için  $F = 1,393$ ,  $df = 3,8$ ,  $P = 0,314$ .

\*\*Aynı satırda (x, y) aynı harfle ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ( $P > 0,05$ , t testi).

#### 3.2 Enjeksiyon sonrası antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimler

*P. lilacinus*'a ait  $LC_{50}$  spor solüsyonu ile enfekte edilen *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde, enfekte olmamış gruplarına göre tüm saatlerin sonunda GST enzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Ayrıca kontrol ve enfekte grupların kendi aralarında yapılan analizi sonucunda kontrole ait saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yokken ( $p > 0,05$ ), enfekte gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur (Tablo 2). Enfekte gruplarda GST aktivitesi 96. saate göre düzenli artış gösterirken, son saatte daha yüksek bir aktivite tespit edilmedi.

Tablo 2. *G. mellonella* larvalarında enfeksiyon sonrası (24-48-72 ve 96. saatte) GST enzim aktivitesi

Süre (Saat)	Ort. $\pm$ SH GST Enzim Aktivitesi	
	Kontrol	Enfekte
24	18,60 $\pm$ 0,26x** a	22,66 $\pm$ 0,01y a*
48	17,01 $\pm$ 1,45x a	34,46 $\pm$ 0,25y b
72	16,53 $\pm$ 1,35x a	36,10 $\pm$ 0,24y c
96	15,92 $\pm$ 1,69x a	24,95 $\pm$ 0,39y d

\*Aynı sütunda (a-d) aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ( $P < 0,05$ , ANOVA Tukey HSD). Kontrol için  $F = 0,785$ ,  $df = 3,8$ ,  $P = 0,535$ ; Enfekte için  $F = 804,992$ ,  $df = 3,8$ ,  $P = 0,000$

\*\*Aynı satırda (x-y) aynı harfle ile gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır? ( $P < 0,05$ , t testi).

*P. lilacinus*'a ait  $LC_{50}$  solüsyonu ile enfekte edilen *G. mellonella* larval hemolenfinde 24, 48, 72 ve 96. saatte belirlenen CAT enzim aktivitelerinin kontrol gruplarına göre değişiklik göstermediği belirlenmiştir ( $p > 0,05$ ). Ayrıca kontrol ve enfekte gruplarının saatler arasında da CAT enzim aktivitesi yönünden anlamlı farklılık göstermediği görülmüştür ( $p > 0,05$ ) (Tablo 3).

Tablo 3. *G. mellonella* larvalarında enfeksiyon sonrası (24-48-72 ve 96. saatte) CAT enzim aktivitesi.

Süre (Saat)	Ort. ± SH CAT Enzim Aktivitesi	
	Kontrol	Enfekte
24	17,55±0,41x** a	18,47±1,10x a*
48	17,05±0,36x a	16,71±2,03x a
72	18,81±1,56x a	20,62±0,62x a
96	20,72±4,25x a	19,48±0,47x a

\*Aynı sütunda (a) aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır (P>0.05, ANOVA Tukey HSD); Kontrol için F= 1,783, df= 3,8, P= 0,228; Enfekte için F= 2,707, df= 3,8, P= 0,116.

\*\*Aynı satırda (x) aynı harfle ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05, t testi).

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Biyolojik sistemlerde endojen ve ekzojen kökenli stres faktörlerine bağlı olarak üretilen reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı enzimatik ve moleküler antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir (Urso ve Clarkson, 2003; Greathouse vd., 2005). Diğer canlılarda olduğu gibi böceklerde de ROS moleküllerine karşı özelleşmiş bileşikler ve enzimler bulunmaktadır (Grubor- Lajsic vd., 1997). Genel olarak birçok göreve sahip olan antioksidan enzimleri, patojenik ürünlerin detoksifikasyonunda tamir mekanizmasına ve biyolojik aktif ürünlerin metabolizmasına aracılık ettikleri için enfeksiyon durumlarında aktivitelere farklılıklar meydana gelebilir (Serebrov vd., 2006). Bununla birlikte böceklerin doğal popülasyonunda yaygın olarak bulunan entomopatojenik mantar ve mikroorganizmalar da böceklerin detoksifikasyon sistemleri üzerinde etkili olabilmektedir (Pedro ve Candido, 1997; Hughes vd., 2004; Serebrov vd., 2006). Böcekler genellikle ksenobiyotiklere maruz kaldıkları için antioksidan enzimler ile ilgili yapılan çalışmaların çoğu bu yöndedir (İçen vd., 2005; Dere vd., 2015; Altuntas vd., 2016). Ancak, enfeksiyona bağlı detoksifikasyon mekanizmasıyla ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olmakla birlikte, genellikle özel olmayan esterazlar ve fosfatazlarla ilgilidir (Kol'chevskaya ve Kol'chevkii, 1988; Xia vd., 2000; Serebrov vd., 2003). Fuchs vd. (2010) tarafından fungal patojenite çalışmalarında model organizma olarak kullanılan *G. mellonella*'nın *Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila melanogaster*'e göre daha kullanışlı olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada ise entomopatojen özellikteki *P. lilacinus*'un *G. mellonella* son dönem larvalarında antioksidan enzimlerden katalaz (CAT) ve glutatyon-S-transferaz (GST) üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece entomopatojenik fungus enfeksiyonu sonrası böceklerin antioksidan savunma sisteminde meydana gelen değişiklikler ile ilgili bilgiler literatüre kazandırılacaktır.

Parazitler, konak organizmada gelişimlerini ve çoğalmalarını sağlayabilmek için yüksek metabolik hıza ihtiyaçlar duyarlar. Bu durum ise konukçuda oksidatif strese ve parazitler tarafından üretilen büyük miktarda toksik madde ile yan ürünlerin ortaya çıkmasına neden olur (Becker vd., 2004). Multienzim yapısındaki GST enzimi, faz II detoksifikasyon enzimi olarak bilinmekte ve böceklerde stres koşulları altında hücrel detoksifikasyonun sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Özellikle oksidatif stres durumunda artış gösteren oksijen türlerinin zararlarına karşı hücrenin korunumunda, doku hasarının giderilmesinde ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır (Terriere, 1984; Krishnan ve Kodrik, 2006; Serebrov, 2006; Sanjaya vd., 2016) Daha önce yapılan bir çalışmada *Metarhizium anisoplia* mantarı ile enfekte edilen *G. mellonella* larval hemolenfinde GST enzim aktivitesinde artış tespit edilmiştir (Glupov vd., 2003). Lozinskaya vd. (2004)'nın gerçekleştirdikleri bir çalışmada ise *Vairimorpha ephestiae* ile enfekte edilen *G. mellonella* larvalarında GST enzim aktivitelerindeki değişimler araştırılarak, küfle enfekte edilmiş larval hemolenfte enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Lozinskaya vd., 2004). Bizim çalışmamızda da benzer olarak *P.lilacinus* enfeksiyonu sonrası *G. mellonella* larval hemolenfindeki GST aktivitesinde artış meydana gelmiştir. Böylece elde ettiğimiz sonuçlar hem daha önce yapılan çalışmaları desteklenmekte hem de GST enziminin toksik fungal metabolitlerin eliminasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle entomopatojenik funguslarla ilişkili ekotoksitite çalışmalarında GST enzim aktivitesindeki değişimlerin bir biyolojik belirteç olarak kullanılabilceğini önermekteyiz.

Fizyopatolojik şartlar altında reaktif oksijen türleri yüksek oranlarda üretilerek süperoksit radikallerinin birikmesine neden olmaktadır (Sies, 1997). Katalaz enzim aktivitesi ise hidrojen peroksit radikalinin yüksek miktarda oluştuğu durumlarda artarak, hücrede hidrojen peroksit artışına neden olan reaktif moleküllerin detoksifikasyonunu sağlamaktadır (Samashekaraiha vd., 1992). Ancak, CAT aktivitesinin, hücrel ortamda tekli oksijen, süperoksit ve peroksit radikali gibi serbest radikallerin yüksek miktarlarda birikmesine bağlı olarak inhibe edildiği bilinmektedir (Kono ve Fridovich, 1982). Kono ve Fridovich (1982) enzim aktivitesinde görülen inhibisyonu, reaktif oksijen radikallerinin hücrel membranlardaki doymamış yağ asitlerini ve proteinleri okside etmesi sonucu MDA üretiminin artmasına bağlı olarak proteinlerde denatürasyon meydana gelmesi ile ilişkilendirmiştir. Daha önce böceklerle ilgili yapılan bazı çalışmalarda da çeşitli kimyasalların ve fenolik karakterdeki bitkisel metabolitlerin larval dokularda bulunan CAT enziminin inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Felton ve Duffey, 1991; Emre vd., 2013). Bizim çalışmamızda da benzer olarak *P. lilacinus* ile enfekte olan *G. mellonella* larvalarının CAT enzim aktivitesinde herhangi

bir değişiklik tespit edilmedi. Bu durumun fungal enfeksiyona bağlı olarak ortaya çıkan yüksek oksidatif hasarın larval hemolenfteki CAT aktivitesini engelleme yönünde etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, bu çalışma entomopatojenik fungusların ekosistemin önemli elemanları olan böceklerde antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde değişimlere neden olabileceğini ve bu durumun organizma ile çevresi arasındaki fizyolojik uyum kapasitelerini de etkileyeceğini göstermektedir. Ayrıca entomopatojenik fungus türlerinin zararlı böcek mücadelesinde kullanılabilirliğine ilişkin araştırmalarda çalışma sonuçlarımızdan faydalanılabileceğini önermekteyiz..

## Teşekkür

Çalışma kapsamında kullanılan entomopatojenik *Purpureocillium lilacinus* (KUKENS WDCM101) Doç. Dr. Rasime Demirel tarafından sağlanmıştır. Kendisine teşekkür ediyoruz.

## Kaynaklar

- Altuntaş, H., Duman, E., Şanal-Demirci, S. N., Ergin, E. (2016). Toxicological and physiological effects of ethephon on the model organism, *Galleria mellonella* L. 1758 (Lepidoptera: Pyralidae). *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 40(4), 413-423.
- Boyland, E., Chasseaud, L.F. (1969). The Role of Glutathione and Glutathione S Transferase in Mercaptic Acid Biosynthesis. *Advances in Enzymology*, 32, 173-219.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bronskill, J. F. (1961). A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). *The Journal of the Lepidopterists Society*, 15, 102-104.
- Chance, B., Maehly, A. C. (1955). Assay of catalase and peroxidases. *Methods Enzymology*, 2, 764-775.
- Cook, S. M., McArthur, J. D. (2013). Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*, 4, 350-353.
- Deacon, J.W. (1983). *Microbial Control of Pests and Diseases*. New York, 31-41.
- Demirel, R., İlhan, S., Asan, A., Kınacı, E., Oner, S. (2005). Microfungi in cultivated fields in Eskişehir province (Turkey). *Journal of Basic Microbiology*, 45, 279-293.
- Dere, B., Altuntaş, H., Nurullahođlu, Z. U. (2015). Insecticidal And Oxidative Effects Of Azadirachtin On The Model Organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 0, 1-15.
- Emre, I., Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O., Cogun, H. Y. (2013). Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and melondialdehyde content in cadmium-treated *Galleria mellonella* larvae. *Annals of the Entomological Society of America*, 106, 371-377.
- Ergin, E., Altuntaş, H., Uçkan, F. (2013). Effects of parasitization and envenomation by the endoparasitic Wasp *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) on hemolymph protein profile of its host *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Biological Diversity and Conservation*, 6(1), 62-70.
- Felton, G. W., Duffey, S. S. (1991). Protective action of midgut catalase in lepidopteran larvae against oxidative plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 17(9), 1715-1732.
- Felton, G. W., Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29, 187-197.
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 Enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44, 507-533.
- Fuchs, B. B., O'Brien, B. E., El Khoury, J. B., Mylonakis, E. (2010). Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*, 1(6), 475-482.
- Fuchs, S. Y., Spiegelman, V. S., Belitsky, G. A. (1993). The Effect of the Cytochrome P-450 System Inducers on the Development of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 8, 83-88.
- Glupov, V. V., Slepneva, I. A., Serebrov V. V., Khvoshevskay, M. F., Martem'yanov, V. V., Dubovskiy, I. M., Khramtsov, V. V. (2003). Influence of the Fungal Inflection on the Production of Reactive Oxygen Metabolites and the Antioksidant State of Haemolymph of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. *Russian Entomological Journal*, 12( 1), 103-108.
- Goryunova, T. E., Vainer, L. M., Sidorov, V. N., vd. (1991). Use of [3H]-Permethrin to Evaluate Esterase Activity in Caterpillars of Beet Webworm *Pyrausta sticticalis* L. *Agrokhimiya*, 2, 118-121.
- Greathouse, K. L., Samuels, M., DiMarco, N. M., Criswell, D. S. (2005). Effects of Increased Dietary Fat and Exercise on Skeletal Muscle Lipid Peroxidation and Antioxidant Capacity in Male Rats. *European Journal of Nutrition*, 44(7), 429-35.
- Grubor-Lajsic, G., Block, W., Telesmanic, M., Jovanovic, A., Stevanovic, D., Baca, F. (1997). Effect of Cold Acclimation on the Antioxidant Defense System of Two Larval Lepidoptera (Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 36, 1-10.
- Halkman, A. K. (2005). *Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*. Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., Ankara.

- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York, USA.
- Hughes, W. O., Thomsen, L., Eilenberg, J., Boomsma, J. J. (2004). Diversity of Entomopathogenic Fungi Near Leaf-Cutting Ant Nests in a Neotropical Forest, with Particular Reference to *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 85, 46-53.
- İçen, E., Armutçu, F., Büyükgüzel, K., Gürel, A. (2005). Biochemical stress indicators of greater wax moth exposure to organophosphorus insecticides. Journal of Economical Entomology, 98(2), 358-366.
- Kol'chevskaya, E. N., Kol'chevkii, A. G. (1988). Analysis of Isozymes of Nonspecific Esterases in Cabbage Moth Infected with *Vairimorpha antheraeae* Microsporidia. Byull, VIZR, 71.
- Kono, Y., Fridovich, I. (1982). Superoxide Radical Inhibit Catalase. Journal of Biological Chemistry, 257, 5751-5754.
- Krishnan, N., Kodrik, D. (2006). Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval) are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress. Journal of Insect Physiology, 5, 11-20.
- Krishnan, N., Sehnal, F. (2006). Compartmentalization of oxidative stress and antioxidant defense in the larval gut of *Spodoptera littoralis*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 63, 1-10.
- Lozinskaya, Y. L., Slepneva, I. A., Khramtsov, V. V., Glupov, V. V. (2004). Changes of the Antioxidant Status and System of Generation of Free Radicals in Hemolymph of *Galleria mellonella* Larvae at Microsporidiosis. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, 40(2), 119-125.
- Pedro, H. C., Candido, S. A. (1997). Entomopathogenic Fungi Associated with Natural Populations of the Moroccan Locust *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Gomphocerinae). Technology, 7, 357-363.
- Pitt, J. I. (1979). The Genus *Penicillium* and its telemorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Pres INC, London.
- Samashekaraiah, B. V., Padmaja, K., Prasad, A. R. K. (1992). Lead-Induced Lipid Peroxidation and Antioxidant Defense Components of Developing Chick Embryos. Free Radical Biology and Medicine, 13, 107-114.
- Sanal S., Altuntaş H., Kılıç Y. (2011). Effects of Fungal Infection by The Entomopathogen Fungus *Paecilomyces lilacinus* on Hemolymph Protein Profile of the Wax Moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. Sixth International Symposium on Molecular Insect Science, Amsterdam, The Netherlands.
- Sanjaya, Y., Ocampo V. R., Caoili B. L. (2016). Pathogenicity of three entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Paecilomyces lilacinus*, to *Tetranychus kanzawai* infesting papaya seedlings. Arthropods, 5(3),109-113.
- Serebrov, V. V., Gerber, O. N., Malyarchuk, A. A., Martemyanov, V. V., Alekseev, A. A., Glupov, V. V. (2006). Effect of Entomopathogenic Fungi on Detoxification Enzyme Activity in Greater Wax Moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) and Role of Detoxification Enzymes in Development of Insect Resistance to Entomopathogenic Fungi. Biology Bulletin, 33(6) 581-586.
- Serebrov, V. V., Kiselev, A. A., Glupov, V. V. (2003). Study of Some Factors of Synergy between Entomopathogenic Fungi and Chemical Insecticides. Mikol Fitopatol, 37(1), 76-82.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiology, 82, 291-295.
- Terriere, L. C. (1984). Induction of Detoxication Enzymes in Insects. Annual Review of Entomology, 29, 71-88.
- Urso, M. L., Clarkson, P. M. (2003). Oxidative Stress, Exercise and Antioxidant Supplementation. Toxicology. 189(1-2), 41-54.
- Wu, G., Jiang, S., Miyata, T. (2004). Effects of Synergists on Toxicity of Six Insecticides in Parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae). Journal of Economic Entomology, 97, 2057-2066.
- Xia, Y., Dean, P., Judge, A. J., Gillespie, J. P., Clarkson, J. M., Charnley, A. K. (2000). Acid Phosphatases in the Haemolymph of the Desert Locust, *Schistocerca gregaria*, Infected with the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal of Insect Physiology, 46, 1249-1257.

(Received for publication 18 November 2016; The date of publication 15 April 2017)