



Farklı Etki Mekanizmalı İsektisitlerin Tek Başına ve Karışım Halindeki Uygulamaların *Galleria mellonella* Larvalarında Hemosit Sayıları Üzerine Etkileri ^[*]

Benay TUNÇSOY^{1*} Pınar ÖZALP²

¹ Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Adana, Türkiye
² Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adana, Türkiye

Geliş/Received: 30.10.2020

Kabul/Accepted: 23.12.2020

Atf yapmak için: Tunçsoy, B. & Özalp, P. (2020). Farklı etki mekanizmalı insektisitlerin tek başına ve karışım halindeki uygulamaların *Galleria mellonella* larvalarında hemosit sayıları üzerine etkileri. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(4), 777-780.

How to cite: Tunçsoy, B. & Özalp, P. (2020). The effects of the insecticides with different mode of action alone and in mixture on hemocyte counts of *Galleria mellonella* larvae. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(4), 777-780.

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4361-3475>
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2977-6334>

*Sorumlu yazarın:

Benay TUNÇSOY
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji
Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Biyomühendislik Bölümü, Adana, Türkiye.
✉: s_benay@hotmail.com
Telefon : +90 (322) 455 00 00
Faks : +90 (322) 455 00 02

Öz: Böcek büyüme düzenleyicileri ve mikrobiyal insektisitler zararlılarla mücadelede tarımsal alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu nedenle, her iki insektisit türüne karşı zararlılarda direnç gelişimi meydana gelmektedir. Son yıllarda, direnç gelişimine karşı farklı etki mekanizmalı insektisitlerin karışım halinde uygulanması sıklıkla tercih edilen bir yöntem olarak kabul edilmektedir. İmmün sistem parametreleri, insektisitlerin zararlı böcek türleriyle mücadelede toksik etkilerinin belirlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Bu amaç kapsamında yapılan çalışmada juvenil hormon analogu pyriproxyfen ve mikrobiyal insektisit *B. thuringiensis*' in 50 ve 100 µg/mL derişimlerinin tek başına ve karışım halindeki (25+25 ve 50+50 µg/mL) uygulamalarının *Galleria mellonella* larvalarında total hemosit sayısı ve diferansiyel hemosit sayısı üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, pyriproxyfenin, *G. mellonella* larvalarında bağışıklık sistemini baskılayarak, *B. thuringiensis* biyopreparatının toksik etkisini arttırdığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, *Galleria mellonella*, immün sistem, pyriproxyfen.

The Effects of the Insecticides with Different Mode of Action alone and in Mixture on Hemocyte Counts of *Galleria mellonella* Larvae

*Corresponding author's:

Benay TUNÇSOY
Adana Alparslan Turkes Science and
Technology University,
Faculty of Engineering,
Department of Bioengineering, Adana,
Turkey.
✉: s_benay@hotmail.com
Telephone : +90 (322) 455 00 00
Fax : +90 (322) 455 00 02

Abstract: Insect growth regulators and microbial insecticides are frequently used in agricultural fields for pest management. Therefore, resistance development occurs in pests against both insecticide types. In recent years, the use of insecticides with different mode of action in mixture against resistance development has been accepted as a frequently preferred method. Immune system parameters are used as biomarkers to determine the toxic effects of insecticides in pest management. In this study, the effects of 50 and 100 µg/mL concentrations of the juvenile hormone analogue pyriproxyfen and the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* alone and in mixture (25+25 and 50+50 µg/mL) on total hemocyte count and differential hemocyte count in *Galleria mellonella* larvae were investigated. According to the findings, it was determined that pyriproxyfen increased the toxic effect of *B. thuringiensis* biopreparate by suppressing the immune system in *G. mellonella* larvae.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *Galleria mellonella*, immune system, pyriproxyfen.

GİRİŞ

Arıcılık sektöründe önemli kayıplara neden olan Büyük Balmumu güvesi *Galleria mellonella*, bal peteklerine zarar veren bir türdür. Bu tür ile mücadelede, çeşitli kimyasal maddeler kullanılmakta ve kalıntı bırakma

problemlerinden dolayı, insan sağlığını ve çevreyi olumsuz etkilemektedir. Biyolojik mücadele materyalleri içerisinde, son zamanlarda en çok kullanılanlardan biri böcek büyüme düzenleyicileridir. Juvenil hormon analogu olan

pyriproxyfen, piridin kökenli ve birçok Arthropoda türünde etkili olduğu bilinen bir insektisitir. Pyriproxyfen uygulanmasının, zararlı böcek türlerinde, böcekteki juvenil hormon seviyesinin düzensizleşmesiyle embriyogenezde ve metamorfozda etkili olmasının yanı sıra, yetişkin bireyin oluşumuna ve verimsizliğe de neden olduğu bilinmektedir (Zhou vd., 2020). Juvenil hormon analogları, zararlı türlere karşı nörotoksik etkiye sahip değildir, ancak bu insektisit türlerinin uygulanması böcekte, hormonal dengeyi bozarak deri değiştirmeyi geciktirmekte, ayrıca bağışıklık sistemini baskılayarak hemosit sayısında değişikliklere neden olmaktadır (Kwon & Kim, 2007). Zararlılarla mücadelede yaygın olarak kullanılan *Bacillus thuringiensis* ise bu gruplarla karışım halinde uygulandığında sinerjistik etki meydana getirmektedir. Lepidoptera zararlıları ile mücadelede kullanılan bazı biyopestisitlere (*B. thuringiensis*) karşı gelişen direnç nedeniyle bu durum farklı etki mekanizmalı insektisitlerin karışım halinde uygulanması fikrini ortaya çıkarmıştır.

Böcek hemolenfi genellikle renksiz, bazı pigmentlerden dolayı çok az yeşil veya sarı renkli bir sıvıdır. Böcek türüne göre vücut ağırlığının yaklaşık %5-40'ını hemolenf oluşturmaktadır. Omurgalılarda olduğu gibi böcek kanı da plazma ve hemositlerden oluşmaktadır. Hemositler, böceklerde farklı fizyolojik fonksiyonlarda görevlidirler. Besinleri farklı dokulara iletirler ve depo ederler. Ayrıca fagositoz, enkapsülasyon, koagülasyon, nodul oluşumunun yanı sıra besin materyallerinin ve hormonların iletimi, metabolitlerin ve biyolojik aktif materyallerin detoksifikasyonunda da rol alırlar (Patton, 1983). Memeli ile böcek immün sistemi arasındaki en önemli benzerliklerden biri patojenlerin toksinlerine karşı memelilerde olduğu gibi böceklerde de orta barsaktaki mikrovilluslerin yüzeyinde mikrobiyal toksinler için glukokonjugant reseptörler bulundurmasıdır. Ayrıca, konak hücreye yabancı madde girdiğinde hemositlerin fagosite etme özelliği göstermektedir. Memelilerde makrofajlar tarafından gerçekleşen bu olay, böceklerde granülosit ve plazmatositler aracılığıyla yapılmaktadır (Kavanagh & Reeves, 2004).

Bu bilgiler ışığında bu çalışmada, *G. mellonella* dördüncü evre larvalarına besin yoluyla, *B. thuringiensis* ve pyriproxyfenin farklı derişimleri, tek başına ve karışım halinde son evre larvalarına uygulanarak total ve diferansiyel hemosit sayıları belirlenmiştir.

MATERYAL VE METOT

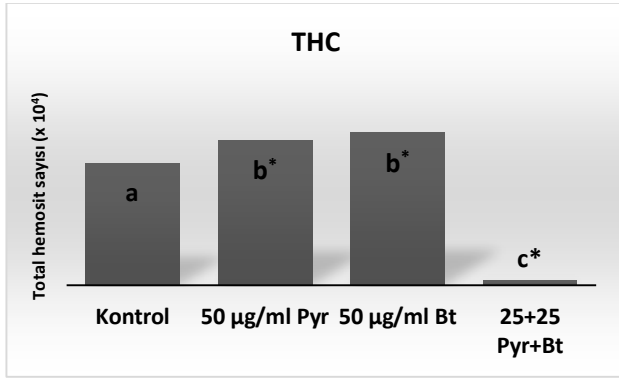
G. mellonella larvaları, 28±2 °C sıcaklık ve %70±5 bağıl neme sahip laboratuvar koşullarında Bronksil (1961) tarafından belirlenen bal, petek, kepek, saf su ve gliserinden oluşan yarı sentetik besin kültüründe yetiştirilmiştir. Çalışmada, juvenil hormon analogu olan

pyriproxyfen (Admiral % 10 EC, Sumitomo Chemical Co, Japan) ile insektisidal özelliğe sahip *B. thuringiensis* (Delfin WG) kullanılmıştır. İnsektisitlerin uygulamaları, tek başına 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında, karışım halindeki uygulamalarda ise ½ oranında 4 farklı şekilde kullanılmıştır. Kültür ortamından alınan dördüncü evredeki *G. mellonella* larvaları, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* ile muamele edilmiş bal petekleri ile beslenmiştir. Son evreye gelen larvalardan mikrokapiller tüp yardımıyla, hemolenf örnekleri alınarak, total hemosit sayısı (THS) ve diferansiyel hemosit sayısı (DHS) üzerine pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in etkileri incelenmiştir. Sayılan hemositler, Jones (1962) metodu kullanılarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz: Deneylerden elde edilen verilerin istatistiksel analizleri, SPSS 21.00 paket programı kullanılarak, Student-Newman Keul's (SNK) testinin uygulanmasıyla yapılmıştır.

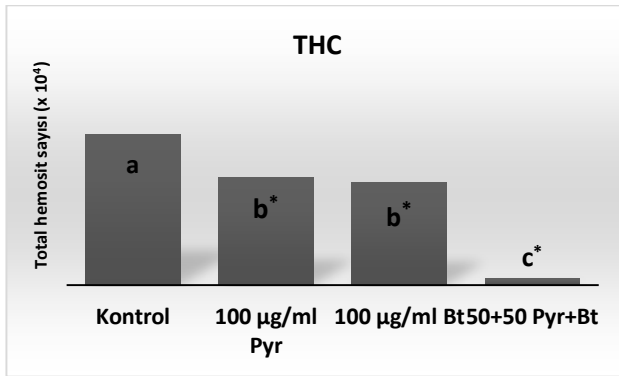
BULGULAR VE TARTIŞMA

Böceklerde bağışıklık sisteminde önemli görevleri olan hemositler böceğin gelişimi sırasındaki değişimler ile açlık, yaralanma, parazitizm, hastalıklar ve insektisitleri kapsayan kimyasallar ile mücadele ederler. Bunun sonucu olarak da stres faktörlerinde total hemosit sayılarının değişebildiği, ayrıca bu sayının sadece larval evreler arasında değil, böceğin gelişimi sırasında içinde bulunduğu evrelerde de farklılıklar gösterebildiği bilinmektedir. *G. mellonella* larvalarına pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in 50 µg/mL derişiminin tek başına uygulandığı gruplarda THS' da artış meydana geldiği belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre pyriproxyfenin tek başına (50 µg/mL) uygulandığı grupta THS' nda 1.19 kat, *B. thuringiensis*' in (50 µg/mL) tek başına uygulandığı grupta 1.25 kat artış meydana gelmiştir. İnsektisitlerin karışım halinde (25+25) uygulandığı grupta ise 23.7 kat azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına 100 µg/mL derişimlerinde uygulandıklarında gruplarda sırasıyla 1.4 ve 1.47 kat azalma meydana geldiği tespit edilmiş, karışım (50+50) halinde uygulanan grupta ise azalma oranı 21 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 1-2, p<0.05). İnsektisitlerin karışım halindeki uygulamalarında ise, her iki derişimde pyriproxyfenin, *B. thuringiensis* biyopreparatı üzerinde sinerjistik etki göstererek hemosit sayısında azalma meydana getirdiği düşünülmektedir. *B. thuringiensis* biyopreparatlarının hemositler üzerine etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamakla birlikte, juvenil hormon ve analoglarının THS' nda düşük konsantrasyonlarda azalma, yüksek konsantrasyonlarda ise artış meydana getirdiği bilinmektedir (Sendi & Salehi, 2010; Sezer & Özalp, 2015; Zibae & Malagoli, 2020).



Şekil 1. İnsektisitlerin tek başlarına 50 µg/mL ve karışımlar halinde 25+25 µg/mL derişiminde *G. mellonella* son evre larvalarında THS karşılaştırılması. SNK testine göre farklı harfle gösterilenler arasında istatistiksel ayırım bulunmuştur ($P<0.05$).

Figure 1. Comparison of THS in last instar larvae of *G. mellonella* at a concentration of insecticides 50 µg/mL alone and 25+25 µg/mL in mixture. There is a statistical difference between the data shown in different letters ($p<0.05$).

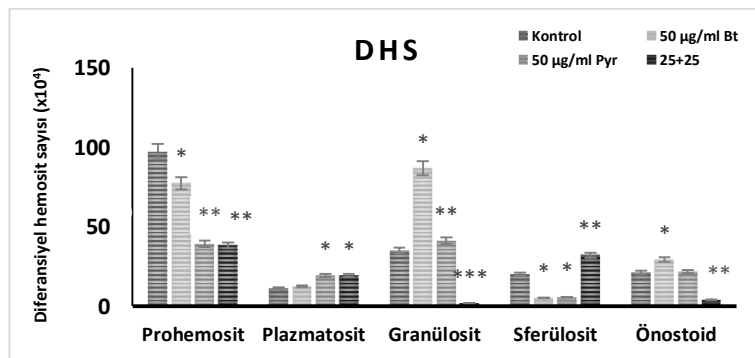


Şekil 2. İnsektisitlerin tek başlarına 100 µg/mL ve karışımlar halinde 50+50 µg/mL derişiminde *G. mellonella* son evre larvalarında THS karşılaştırılması. SNK testine göre farklı harfle gösterilenler arasında istatistiksel ayırım bulunmuştur ($P<0.05$).

Figure 2. Comparison of THS in last instar larvae of *G. mellonella* at a concentration of insecticides 100 µg/mL alone and 50+50 µg/mL in mixture. There is a statistical difference between the data shown in different letters ($p<0.05$).

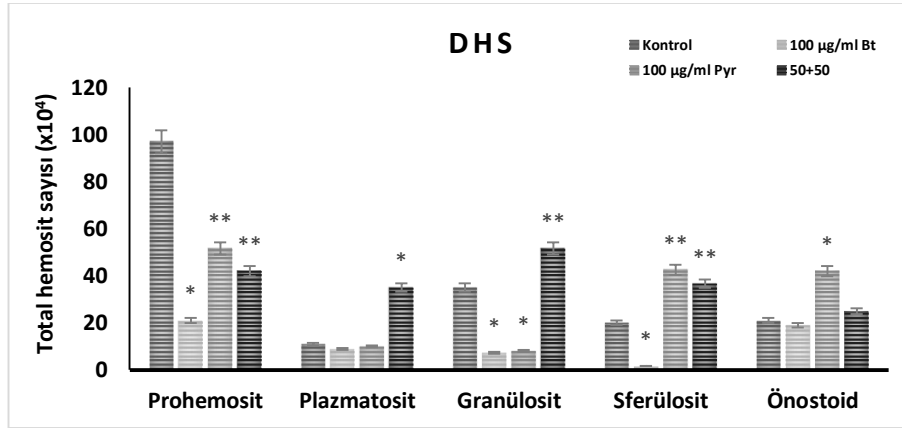
Böceklerde hemosit tiplerinin farklı görevleri bulunmaktadır. Prohemositler diğer hemositlerden

farklılaşan kök hücrelerdir. Plazmatositler yabancı maddelerin etrafında kapsül ve nodül oluşturur. Granülositlerin fagositoz özelliği vardır. Önositoidler fenoloksidazları sentezler ve hemolenfin melanize olmasına neden olur. Sferülositler ise melanizasyon, fagositoz, pıhtılaşma ve hücre adhezyonunun düzenlenmesi gibi birçok görevinin olabileceği ile ilgili yorum yapılsa da henüz netlik kazanmamıştır (Huang vd., 2016). Yapılan çalışmada, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in DHS üzerine etkileri incelenmiş, insektisitlerin 50 µg/mL derişimlerinin tek başına ve 25+25 µg/mL oranlarında karışım halinde uygulandıklarında prohemosit ve sferülosit sayılarında azalma, plazmatosit sayısında ise artış meydana geldiği belirlenmiştir. Granülosit sayısında, insektisitlerin tek başına uygulandığı gruplarda artış meydana gelirken karışım uygulaması yapılan grupta azalma meydana gelmiştir (Şekil 3; $p<0.05$). İnsektisitlerin 100 µg/mL derişimlerinin tek başına ve karışım (50+50) halindeki uygulamalarında prohemosit sayısında azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Plazmatosit, granülosit ve sferülosit sayılarında ise, karışım uygulaması yapılan gruplarda kontrol grubuna oranla artış meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4; $p<0.05$). Pyriproxyfenin, *G. mellonella* larvalarında bağışıklık sistemini bastırarak, *B. thuringiensis* biyopreparatının toksik etkisini arttırdığı ve etki süresinin kısılmasına neden olduğu gözlenmiştir (Kwon & Kim, 2007). Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulamasının hemosit sayıları üzerine etkilerinde, meydana gelen artış ve azalmaların hemolenfte toksisiteye bağlı olarak oluşan melanizasyon, enkapsülasyon ve fagositoz gibi savunma mekanizmalarının neden olduğu fikrini ortaya koymaktadır (Dornelas vd., 2019). Ayrıca, böceklerdeki endokrin hormonların da hemosit popülasyonlarını ve bu hücrelerin farklılaşmasını düzenlemesinin, juvenil hormon analogu pyriproxyfenin larvaların hemosit sayıları üzerinde etkili olmasının nedenini açıklamaktadır.



Şekil 3. İnsektisitlerin tek başlarına 50 µg/mL ve karışımlar halinde 25+25 µg/mL derişiminde *G. mellonella* son evre larvaları DHS. SNK testine göre farklı harfle gösterilenler arasında istatistiksel ayırım bulunmuştur ($P<0.05$).

Figure 3. Comparison of DHS in last instar larvae of *G. mellonella* at a concentration of insecticides 50 µg/mL alone and 25+25 µg/mL in mixture. There is a statistical difference between the data shown in different letters ($p<0.05$).



Şekil 4. İnsektisitlerin tek başlarına 100 µg/mL ve karışımlar halinde 50+50 µg/mL derişiminde *G. mellonella* son evre larvaları DHS. SNK testine göre farklı harfle gösterilenler arasında istatistiksel ayırım bulunmuştur (P<0.05).

Figure 4. Comparison of DHS in last instar larvae of *G. mellonella* at a concentration of insecticides 100 µg/mL alone and 50+50 µg/mL in mixture. There is a statistical difference between the data shown in different letters (p<0.05).

Sonuç olarak bu çalışmanın, *G. mellonella* ile mücadelede daha kısa sürede ve güvenilir sonuçların elde edilmesine, *B. thuringiensis* biyopreparatına karşı çıkabilecek olası direnç gelişimi ve çözüm yollarının belirlenmesi konusunda zirai mücadeleye ve moleküler düzeydeki çalışmalara yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Bronksil, J.K. (1961).** A cage to simplify the rearing of greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). *Journal of Lepidopterists' Society*, 15(2), 102-104.
- Jones, J.C. (1962).** Current concepts concerning insect hemocytes. *American Zoologist*, 2, 209-246.
- Kavanagh, K. & Reeves, E.P. (2004).** Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 101-112. DOI: [10.1016/j.femsre.2003.09.002](https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.002)
- Kwon, S. & Kim, Y. (2007).** Immunosuppressive action of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, enhances pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against diamond-back moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Biological Control*, 42, 72-76. DOI: [10.1016/j.biocontrol.2007.03.006](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.03.006)
- Patton, R.L. (1983).** *Introductory Insect Physiology*. W. B. Saunders Co. Philadelphia, 245s.
- Schunemann, R., Pinto, L.M.N. & Zanettini, M.H.B. (2012).** Two new Brazilian isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Journal of Biology*, 72(2), 363-369. DOI: [10.1590/S1519-69842012000200018](https://doi.org/10.1590/S1519-69842012000200018)
- Sendi, J.J. & Salehi, R. (2010).** The effect of methoprene on total hemocyte counts and histopathology of hemocytes in *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera). *Munis Entomology & Zoology*, 5(1), 240-246.
- Sezer, B. & Ozalp, P. (2015).** Effects of pyriproxyfen on hemocyte count and morphology of *Galleria mellonella*. *Fresenius Environmental Bulletin*. 24(2a), 621-625.
- Silvestre Pereira Dornelas, A., A Sarmiento, R., C Rezende Silva, L., de Souza Saraiva, A., J de Souza, D., D Bordalo, M., MVM Soares, A. & LT Pestana, J. (2020).** Toxicity of microbial insecticides toward the non-target freshwater insect *Chironomus xanthus*. *Pest Management Science*, 76, 1164-1172. DOI: [10.1002/ps.5629](https://doi.org/10.1002/ps.5629)
- Zibae, A. & Malagoli, D. (2020).** The potential immune alterations in insect pests and pollinators after insecticide exposure in agroecosystem. *Invertebrate Survival Journal*, [S.l.], 17(1), 99-107.
- Zhou, Y., Qin, De-Q., Zhang, Pei-W., Liu, Ben-J., Chen, Xiao-T. & Zhang, Zhi-X. (2020).** The comparative metabolic response of *Bactrocera dorsalis* larvae to azadirachtin, pyriproxyfen and tebufenozide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 110020. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2019.110020](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110020)