



## Konak *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae) hemolenf kimyasına indol-3-asetik asitin etkisi

### *Influence of Indol-3-Acetic Acid on hemolymph chemistry of the host Galleria mellonella Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae)*

Fevzi UÇKAN<sup>1</sup> , Zülbiye DEMİRTÜRK<sup>2,\*</sup> , Hanife Merve TETİK<sup>3</sup> 

<sup>1</sup> *Biyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli, Türkiye, Orcid: 0000-0001-9304-4296*

<sup>2</sup> *Biyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli, Türkiye, Orcid: 0000-0002-3107-4278*

<sup>3</sup> *Biyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli, Türkiye, Orcid: 0000-0002-7657-7135*

#### Araştırma Makalesi

Gönderilme Tarihi : 13/01/2021

Kabul Tarihi : 27/04/2021

#### Anahtar Kelimeler

*Galleria-mellonella*  
*Indol-3-asetik asit*  
*Toksosite*  
*Hemolenf metabolitleri*

#### Research Paper

Received Date : 13/01/2021

Accepted Date : 27/04/2021

#### Keywords

*Galleria-mellonella*  
*Indole-3-acetic acid*  
*Toxicity*  
*Hemolymph metabolites*

#### Özet

Oksin grubunun en önemli üyelerinden biri olan indol-3-asetik asit (IAA) bitki, mantar ve bakteriler tarafından endojen olarak üretilen bitki büyüme düzenleyicidir. Büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella*, tarımda yaygın olarak kullanılan IAA'ya doğal ortamında maruz kalabilmektedir. Bu nedenle, son yıllarda model organizma olarak kullanılan *G. mellonella* larvalarının hemolenf kimyasındaki değişikliklere IAA'nın etkileri incelendi. *G. mellonella* larvalarının diyetlerine IAA'nın farklı dozları (50, 500, 1000, 5000 ve 10000 ppm) eklenerek verildi. IAA hemolenf karbohidrat, lipit ve protein seviyelerinde doza bağlı bir şekilde değişikliğe neden oldu. IAA uygulamasına bağlı olarak, larval hemolenfdeki toplam glikojen ve protein miktarında bütün dozlarda azalma belirlenirken, toplam lipit miktarında ise artış gözlemlendi. Sonuçlarımız IAA uygulamasının böceklerde önemli fizyolojik değişikliklere neden olabileceğini göstermektedir. Bu durum pestisitler kadar bitki büyüme düzenleyicilerin de ekotoksik riskleri üzerinde gerekli çalışmalar yapılması gerektiğini göstermektedir.

#### Abstract

Indole-3-acetic acid (IAA), one of the most important members of the auxin group, is a plant growth regulator and produced endogenously by plants, fungi and bacteria. The greater wax moth *Galleria mellonella* can be exposed in its natural environment to IAA, which is widely used in agriculture. Therefore, the effects of IAA on changes in hemolymph chemistry of *G. mellonella* larvae, which were used as a model organism in recent years, were examined. Different doses of IAA (50, 500, 1000, 5000 and 10000 ppm) were added to the diets of *G. mellonella* larvae. IAA caused changes in hemolymph carbohydrate, lipid and protein levels in a dose-dependent manner. While a decrease in the total amount of glycogen and protein in the larval hemolymph were determined at all doses of IAA, an increase in the total amount of lipid was observed in the larval hemolymph. Our results show that IAA treatment can cause significant physiological changes in insects. This situation shows that necessary studies should be done on the ecotoxic risks of plant growth regulators as well as pesticides.

## 1. Giriş

Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) inhibitör ve uyarıcı yolları uyararak bitki büyümesini düzenleyen kimyasallardır [1]. Yaygın olarak tarımsal ürünlerin üretimini geliştirmek için kullanılmaktadırlar [2]. Bitki hormonlarından oksinlerin en çok bulunan formu indol-3-asetik asit (IAA)'tir. Hemen hemen bütün bitkiler

tarafından sentezlenir [3]. IAA'nın toksik etkileri nedeniyle çeşitli Lepidopteran türlerde büyüme, üreme, immünoloji, hayatta kalma, gelişim süreleri ve hemosit tepkileri üzerinde olumsuz etkilerinin olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır [4,5]. Pestisitler gibi BBD'lerin de çevrede aşırı ve kontrolsüz kullanımının ekosistem üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceği düşünülmelidir.

Lepidoptera takımına ait türlerin birçoğu tarım zararlısı olmaları nedeniyle ekonomik açıdan dikkat edilmesi

\* Sorumlu Yazar (Corresponding Author): zulbiye.ylmzz@gmail.com



gereken böceklerdir. Bu böceklerle çalışmalar yapılabilmesi için uygun laboratuvar koşullarında yetiştirilebilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle seri üretim için iyi ve daha ucuz sentetik besinler ve *in vitro* kültür teknikleri geliştirilmiştir [6]. Sentetik besinlerle kültüre alınan bir Lepidopteran türü olan *G. mellonella* fizyolojik, immünolojik ve toksikolojik incelemeler için model organizma olarak daha fazla ilgi görmektedir [2,7]. Birçok çalışmada daha çok IAA'nın insan ve omurgalılar üzerinde teratojenik [8,9,10] ve biyokimyasal [11,12] etkileri gösterilmiştir. Bununla birlikte IAA'nın özellikle böcekler üzerindeki biyolojik etkileri ile ilgili benzer çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, çalışmamızda model böcek olarak kullanılan büyük bal mumu güvesi *G. mellonella* larvalarından alınan hemolenfin toplam glikojen, lipit ve protein içeriği IAA dozlarına göre değerlendirildi.

## 2. Malzeme ve Yöntem

### 2.1. Laboratuvar, Biyolojik Analizler ve Hemolenf Toplama

*G. mellonella* kültürünün gelişimi için optimal değerler olan  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  sıcaklık,  $\%60 \pm 5$  bağıl nem ve 12: 12 saat A: K (Aydınlık: Karanlık) fotoperiyot şartlarında yetiştirildi. IAA'yı (Merck 10 g, Darmstadt, Almanya, CAS 87-51-4) 1 N NAOH ile çözdükten sonra farklı konsantrasyonlarda (50, 500, 1000, 5000 ve 10000 ppm) solüsyonlar hazırlandı ve aynı oranda Sak ve diğerlerinin (2006) önerdiği sentetik besine eklendi [13]. IAA uygulamalarında kullanılan *G. mellonella* son evre larvalarının ( $0,18 \pm 0,2$  g) farklı zaman ve farklı süksesif kültürlerden alınmasına özen gösterildi. Larvaların üçüncü ön bacak bölgesi ince uçlu diseksiyon iğne-siyle delindi. Bu bölgeden mikrokapiller tüp ile 10 µl hemolenf çekildi. Daha sonra 0,001 g 1-fenil-2-tiyüüre (Merck, CAS 103-85-5) içeren tüplere alı-narak toplam glikojen, lipit ve protein analizleri yapılmaya kadar  $-80^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Analizden önce tüm hemolenf örnekleri  $+4^\circ\text{C}$ 'de Microfuge® 22R Marka satrifüjde 10.000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Her bir doz ve kontrol grubu için farklı zamanlarda her biri beşer seriden oluşan üçer tekrar yapıldı.

### 2.2. Toplam glikojen, lipit ve protein tayini

Hemolenfdeki glikojen Van Handel (1985)'in antron testi ile ölçüldü [14]. Glikojen standart grafiği için saf glukoz (Merck, CAS 50-99-7) kullanıldı. Larval hemolenfdeki toplam lipit miktarı Olson vd. (2000)'nin Van Handel (1985)'den modifiye ettikleri vanilin-fosforik asit metodu ile belirlendi [14,15]. Standart eğri için  $\%0,1$ 'lik mısır yağı (Merck, CAS 8001-30-7) kullanıldı. Toplam protein ise standart olarak sığır serum albümini (BSA) (Sigma Aldrich, CAS 9048-46-8) kullanılarak Bradford (1976) yöntemiyle belirlendi [16]. Spektrofotometrede (SPEKTROstar Nano, Ortenberg, Almanya) glikojen 625 nm, lipit 525 nm ve protein 595 nm dalga boyunda ölçüldü. Tüm deneyler üç kez tekrar edildi.

### 2.3. İstatistiksel analiz

Elde edilen değerler için normallik ve homojenlik testi yapıldıktan sonra, parametrik testlerde verilerin homojen olup olmamasına göre Tukey HSD ya da Tamhane T2 post hoc testleri yapıldı. Parametrik olmayan testlerde Kruskal Wallis ve Mann Withney U testi uygulandı (Windows için sürüm 18.0, SPSS Science, Chicago). Sonuçlar arasındaki fark  $p < 0,05$ 'e göre istatistiksel olarak anlamlı-anlamsız bulundu.

## 3. Bulgular ve Tartışma

Hemolenf içeriğindeki glikojen, lipit ve protein miktarlarındaki değişiklik Tablo 3.1'de gösterilmektedir. IAA, toplam glikojen ve protein miktarında kontrol grubuna göre bütün dozlarda azalmalara, toplam lipit miktarında ise tüm dozlarda artışa neden oldu.

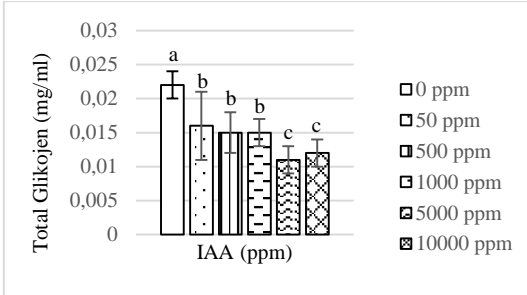
Glikojen miktarının kontrol grubunda  $0,02 \pm 0,00$  mg iken en yüksek dozda  $0,01 \pm 0,00$  mg'a düştüğü ve azalmanın yaklaşık  $\%50$  oranında olduğu tespit edildi. Ancak lipit miktarı kontrol grubunda  $3,71 \pm 1,02$  mg iken en yüksek dozda  $24,06 \pm 5,00$  mg'a çıkarak, yaklaşık 6 katlık bir artış gösterdi. Spektrofotometrik ölçümler *G. mellonella* hemolenf protein miktarında dozla orantılı olarak azalma olduğu görüldü. Kontrol grubunda  $18,70 \pm 0,88$  mg olan protein miktarının en yüksek dozda  $11,43 \pm 1,01$  mg'a düştüğü ve azalmanın yaklaşık  $\%28$  oranında olduğu gözlemlendi.

**Tablo 3.1.** *G. mellonella* larvalarında toplam glikojen, lipid ve protein içeriğindeki değişiklikler

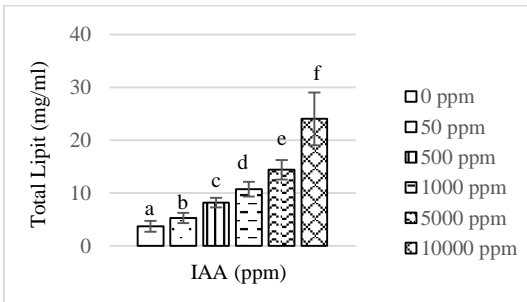
Dozlar	Toplam Glikojen (mg/ml)		Toplam Lipit (mg/ml)		Toplam Protein (mg/ml)	
	Genişlik	(Ortalama ± SH)*	Genişlik	(Ortalama ± SH)*	Genişlik	(Ortalama ± SH)*
IAA (ppm)						
0	0,02-0,024	0,022±0,002 <sup>a</sup>	2,18-5,15	3,71±1,016 <sup>a</sup>	17,62-19,75	18,70±0,88 <sup>a</sup>
50	0,01-0,021	0,016±0,005 <sup>b</sup>	4,06-6,35	5,31±0,96 <sup>b</sup>	15,33-17,68	16,86±1,01 <sup>b</sup>
500	0,011-0,019	0,015±0,003 <sup>b</sup>	7,18-9,35	8,18±0,91 <sup>c</sup>	13,55-16,98	15,78±1,60 <sup>b</sup>
1000	0,013-0,018	0,015±0,002 <sup>b</sup>	9,27-12,60	10,77±1,40 <sup>d</sup>	11,13-13,33	12,32±0,92 <sup>c</sup>
5000	0,009-0,013	0,011±0,002 <sup>c</sup>	12,81-16,97	14,42±1,85 <sup>e</sup>	10,09-14,36	12,62±1,86 <sup>cd</sup>
10000	0,01-0,015	0,012±0,002 <sup>c</sup>	18,90-30,68	24,06±5,002 <sup>f</sup>	10,08-12,71	11,43±1,09 <sup>d</sup>

\* Sonuçlar her biri 5 bireyin hemolenfinden elde edilen 3 tekrara aittir. Ortalama ve standart hata (Ortalama± SH). Aynı sütunda (a-f) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (p<0,05)

Altuntaş (2015)'in çalışmasında ethephon uygulamasında larva hemolenfindeki toplam lipid ve glukoz seviyelerinde kademeli bir azalma gözlenmiştir [2]. *G. mellonella* için BBD'lerden biri olan gibberellik asit ile ilgili çeşitli çalışmalarda da benzer sonuçlar gözlenmiştir [1,17]. Çalışmamızda IAA uygulamasının toplam glikojen ve protein miktarında bir azalmaya (Şekil 3.1, Şekil 3.3), lipid miktarında ise bir artışa neden olduğu gözlemlendi (Şekil 3.2). Protein ve glikojen miktarındaki azalmalar, IAA'nın oluşturduğu strese bağlı hücre ve doku hasarlarının onarımı için kullanımına bağlı olabilir.

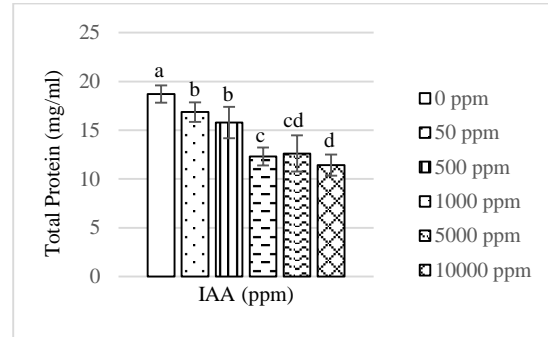


**Şekil 3.1.** IAA uygulaması sonucu *G. mellonella* larvalarında total glikojen içeriğindeki değişiklikler. Sonuçların her biri 5 bireyin hemolenfinden elde edilen 3 tekrara aittir (Ortalama ± standart hata). Aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (p<0,05).



**Şekil 3.2.** IAA uygulaması sonucu *G. mellonella* larvalarında total lipid içeriğindeki değişiklikler. Sonuçların her biri 5 bireyin hemolenfinden elde

edilen 3 tekrara aittir (Ortalama ± standart hata). Aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (p<0,05).



**Şekil 3.3.** IAA uygulaması sonucu *G. mellonella* larvalarında total protein içeriğindeki değişiklikler

Sonuçların her biri 5 bireyin hemolenfinden elde edilen 3 tekrara aittir (Ortalama ± standart hata). Aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (p<0,05).

IAA'ya maruziyet sonucu larval hemolenfdeki toplam protein içeriğinde gözlenen azalma, aynı zamanda organofosforlu insektisitlere maruz kalan *Bombyx mori* larvalarının hemolenf protein miktarında bir azalma bulunan Nath ve diğerlerinin (1997) daha önceki bir çalışmasını da desteklemektedir [18]. Çalışmamız artan protein katabolizmasının IAA kaynaklı strese telafi etmek için fizyolojik bir adaptasyon ile ilişkili olabileceğini vurgulamaktadır (Şekil 3.3). Nath (2000), *Bombyx mori*'de organofosforlu insektisitlerin hemolenf ve yağ dokuda toksik stres oluşturarak karbohidrat metabolizmasını etkilediklerini göstermiştir [19]. Ortel (1996), Cd, Pb, Cu ve Zn gibi ağır metallerle beslenen *Lymantria dispar* larvalarında hemolenf ve dokularda karbohidrat seviyelerinin değiştiğini, özellikle kadmiyum ve çinko seviyelerinin her bir metalin artan derişimine bağlı olarak düştüğü deneysel olarak gösterilmiştir [20]. Ayrıca artan

IAA dozlarının larvalar üzerinde omurgalılardakine benzer şekilde toksik etkilere neden olduğu gösterilmiştir [21,22]. Tehlikeli bir karsinogen olarak bilinen ve oksinler grubuna dahil bir BBD olan 2,4-diklorofenoksiasetik asit ile yapılan çalışmalarda, bu maddenin çeşitli yumuşak doku sarkomları ve malignan lenfoma gibi kanserlerle ilişkisi ortaya konulmuştur [23].

#### 4. Sonuçlar

Hayvanlar stres koşulları altında yüksek derecede enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Bu durum hayvanların enerji taleplerine bağlı protein ve karbohidrat katabolizmasının uyarılmasına neden olmuş olabilir. Aynı zamanda IAA böcek büyüme ve gelişmesinde rol oynayan hormonların metabolizmalarında da değişime neden olmuş olabilir. Çeşitli böcek takımlarına ait türlerle yapılan çalışmaların sonuçlarına göre BBD'lerin hemolenf metabolitlerini (karbohidrat, lipid, protein gibi) etkilediği tespit edilmiştir [17,18,20]. Bu çalışma IAA'nın böcek fizyolojisinde neden olabileceği bazı metabolik değişiklikleri ortaya koymaktadır. Elde edilen veriler IAA'nın böceklerde biyokimyasal değişikliklere neden olabileceğini göstermektedir. Sonuçlarımız IAA gibi BBD'lerin ekotoksikolojik olarak önemi ve kullanılabilirliklerine katkıda bulunacaktır.

#### Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması belirtilmemiştir.

#### Etik Standartlar Beyanı

Yazarlar bu çalışmada kullanılan materyal ve yöntemlerin etik kurul izni ve yasal-özel izin gerektirmediğini beyan eder.

#### Teşekkür

Yazarlar Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür eder.

#### Kaynaklar

- [1] Uçkan F., Tüven A., Er A., Ergin E., 2008. Effects of gibberellic acid on biological parameters of the larval endoparasitoid *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae). *Annals of the Entomological Society of America* 101, 593-597.
- [2] Altuntaş H., 2015. Effects of Ethephon on the hemolymph metabolites of the greater wax moth

*Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Physica Polonica A* 128, 182-183.

- [3] Grunewald W., Noorden G.V., Isterdael G.V., Beeckman T., Gheysen G., Mathesius U., 2009. Manipulation of auxin transport in plant roots during *Rhizobium* symbiosis and nematode parasitism. *The Plant Cell* 21, 2553-2562.
- [4] Özyılmaz D., Özbek R., Altuntaş H., Uçkan F., 2019. Indole-3-Acetic Acid induced oxidative stress in model host *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) and its endoparasitoid *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Invertebrate Survival Journal* 16 (1), 184-188.
- [5] Kaya S., Uçkan F., Er A., 2020. Influence of Indole-3-Acetic Acid on Cellular Immune Responses of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) and *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) in a host-parasitoid system. *International Journal of Tropical Insect Science* 1-11. doi:10.1007/s42690-020-00190-z.
- [6] Kulkarni N., Kushwaha D. K., Mishra V. K., Paunekar S., 2012. Effect of economical modification in artificial diet of greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Indian Journal of Entomology* 74(4), 369-374.
- [7] Moamen S. A., Barakat E. M., Abokersh M. O., 2019. The biochemical alternations of *Galleria mellonella* hemolymph following induction of immune response. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 7(4), 724-731.
- [8] John J. A., Blogg C. D., Murray F. J., Schwetz B. A., Gehring P. J., 1979. Teratogenic effects of the plant hormone indole-3-acetic acid in mice and rats. *Teratology* 19(3), 321-324.
- [9] Furukawa S., Abe M., Usuda K., Ogawa I., 2004. Indole-3-acetic acid induces microencephaly in rat fetuses. *Toxicologic pathology* 32(6), 659-667.
- [10] Bertuzzi A., Mingrone G., Gandolfi A., Greco A. V., Ringoir S., Vanholder R., 1997. Binding of indole-3-acetic acid to human serum albumin and competition with L-tryptophan. *Clinica chimica acta* 265(2), 183-192.
- [11] Celik I., Tuluçe Y., 2006. Effects of indoleacetic acid and kinetinon lipid peroxidation and antioxidant defense in various tissues of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 84, 49-54.
- [12] Celik I., Tuluçe Y., 2007. Determination of toxicity of subacute treatment of some plant growth regulators on rats. *Environmental Toxicology: An International Journal* 22(6), 613-619.

- [13] Sak O., Uçkan F., Ergin E., 2006. Effects of cypermethrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), Belgian Journal of Zoology 136, 53-58.
- [14] Van Handel E., 1985. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. Journal of the American Mosquito Control Association 1, 302-304.
- [15] Olson D. M., Fadamiro H., Lundgren J. G., Heimpel G. E., 2000. Effects of Sugar Feeding on Carbohydrate and Lipid Metabolism in a Parasitoid Wasp. Physiological Entomology 25, 17-25.
- [16] Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.
- [17] Uçkan F., Öztürk Z., Altuntaş H., Ergin E., 2011. Effects of gibberellic acid (GA3) on biological parameters and hemolymph metabolites of the pupal endoparasitoid *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and its host *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of the Entomological Research Society 13(3), 1-14.
- [18] Nath B. S., Suresh A., Varma B. M., Kumar R. P. S., 1997. Changes in protein metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. Ecotoxicology and Environmental Safety 36, 169-173.
- [19] Nath B. S., 2000. Changes in carbohydrate metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* L. exposed to organophosphorus insecticides. Pesticide Biochemistry and Physiology 68, 1504-1515.
- [20] Ortel J., 1996. Metal-supplemented diets alter carbohydrate levels in tissue and hemolymph of gypsy moth larvae (*Lymantria dispar*, Lymantriidae, Lepidoptera). Environmental Toxicology and Chemistry 15, 1171-1176.
- [21] Folkes L. K., Candeias L. P., Wardman P., 1998. Towards targeted "oxidation therapy" of cancer: peroxidase-catalyzed cytotoxicity of indole-3-acetic acids. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 42, 917-920.
- [22] Dalmazzo L. F., Santana-Lemos B. A., Jacomo R. H., Garcia A. B., Rego E. M., da Fonseca L. M., Falcao R. P., 2011. Antibody- targeted horseradish peroxidase associated with indole-3-acetic acid induces apoptosis *in vitro* in hematological malignancies. Leukemia Research 35, 657-662.
- [23] Bloemen L. J., Mandel J. S., Bond G. G., Pollock A. F., Vitek R. P., Cook R. R., 1993. An update of mortality among chemical workers potentially exposed to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. Journal of Occupational Medicine 35, 1208-1212.