

## KİTİN SENTEZ İNHİBİTÖRÜ FLUFENOXURON'UN ALTINCI EVRE *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) LARVALARININ KÜTİKÜLASI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Haluk ÖZPARLAK, A. Kürşat AYDİLEK, Sadettin ÜNSAL  
Abdurrahman AKTÜMSEK

Selçuk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Böl., KONYA

### ÖZET

Bu çalışmada bir kitin sentez inhibitörü olan flufenoxuronun altıncı evre *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Larvalar 250, 500 ve 1000 ppm flufenoxuron içeren yarı sentetik besinle beslendiği zaman flufenoxuronun kütikula birikimini bozduğu tespit edilmiştir. Flufenoxuron ile muamele edilen larvalarda kütikula kalınlığı kontrol grubuna kıyasla azalmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Galleria mellonella*, büyük kovan güvesi, kitin sentez inhibitörü, flufenoxuron, kütikula.

EFFECTS OF THE CHITIN SYNTHESIS INHIBITOR FLUFENOXURON  
ON THE CUTICLE OF SIXTH INSTAR *Galleria mellonella* L.  
(Lepidoptera: Pyralidae) LARVAE

### ABSTRACT

In this study, the effects of the chitin synthesis inhibitor flufenoxuron, on the sixth instar of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvae have been investigated. Flufenoxuron disturbed the cuticle deposition when larvae were fed on semi-artificial diets containing 250, 500 and 1000 ppm flufenoxuron. Thickness of cuticle decreased in treated larvae when compared with the results of the control group.

**Keywords:** *Galleria mellonella*, greater wax moth, chitin synthesis inhibitor, flufenoxuron, cuticle.

## 1. GİRİŞ

Zararlı böcek populasyonlarına karşı biyolojik mücadele ile tarla ve depo şartlarında arzu edilen sonuçlara ulaşılamaması kimyasal mücadeleyi

zorunlu kılmaktadır. Böceklerde kütikula oluşumunu, deri değiştirme sürecini ve metamorfozu bozarak etkili olan böcek büyüme regülatörleri (Insect Growth Regulator-IGR) hedef olmayan canlılar üzerinde klasik insektisitlerden daha az zararlı olmaları sebebiyle önem kazanmaktadır [1]. Üçüncü nesil insektisitler olarak adlandırılan IGR'ler etki şekillerine göre üç gruba ayrılır. i) juvenile hormon analogları ii) ektizon agonistleri iii) kitin sentez inhibitörleri [2,3].

Kitin sentez inhibitörleri böceklerde kitin biyosentezini engeller ve böylece deri değiştirmeyi engeller yada kusurlu bir kütikula oluşumuna sebep olur. Bu gruba giren en yaygın bileşikler benzoyilüreler veya asilüreler olarak da bilinen üre esaslı benzoyilfenilürelerdir [1]. Böceklerde mide yoluyla etkili olan kitin sentez inhibitörleri holometabol böceklerin erken evre larvalarına karşı, özellikle de Lepidopter ve Coleopter larvalarına karşı larvisit olarak etki gösterir [1,3].

Halk arasında "kovan güvesi" olarak bilinen *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) holometabol bir böcek olup, arı kovanlarında ve depolarda özellikle larval devrede petekleri yiyerek büyük zarar verir [4]. Larval devrede yedi evre geçiren *G. mellonella* larvaları son iki evrede maksimum büyüklüğe ulaşarak olgunlaşırlar. Olgunlaşan son evre larvaları çevrelerine koza örek pupa devresine geçerler. Pupalardan da ergin kelebekler oluşur [5].

Bu çalışmada bir kitin sentezi inhibitörü olan ve 1-[4-(2-(2-chloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-*p*-tolylloxy)-2-fluorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea kimyasal adı ile bilinen flufenoxuronun [6], ön çalışmalarla tespit edilen 1000 ppm ve bunun azalan değerleri olan 500 ppm ve 250 ppm'lik dozlarının *G. mellonella* altıncı evre larval kütikulası üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Flufenoxuronun kütikula birikimi üzerindeki etkilerine ait bulguların zararlı böcek mücadelesinde kullanılabilmesi ümit edilmektedir.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Materyal

Bu çalışmada etkin maddesi flufenoxuron olan Cascade 50 DC kullanıldı. Denemelerde kullanılan *G. mellonella* larvaları stok kültürden çoğaltılarak cam kavanozlar içerisinde yarı sentetik besinlerle (600 g bal + 492 g gliserol + 120 g bal peteği + 1200 g kepek) beslendi ve %78 bağıl nem ve tamamen karanlık ortamda  $28 \pm 2$  °C'de inkübatör içerisinde muhafaza edildi [7].

## 2.2 Metot

Araştırmada kullanılan 480 adet *G. mellonella* larvası, beşinci deriyi yeni değiştiren altıncı evrenin ilk saatleri içerisinde bulunan ve koyulaşmamış (tanenleşmemiş) larvalar içerisinde seçildi. Denemeler üç tekrar üzerinden gerçekleştirildi. Flufenoxuron uygulamasından önce seçilen larvalar besini aynı derecede yemeleri amacıyla ayrı bir yerde yaklaşık 18 saat boyunca aç bırakıldı.

Uygulamada kullanılan flufenoxuron distile suyla seyretildi. Suda çözünen flufenoxuron süspansiyonları 1000, 500 ve 250 ppm konsantrasyonlarında 20 g yarı sentetik besin ile iyice karıştırıldı. Kontrol grubunun besinine ise sadece distile su karıştırıldı. Bu hazırlanan karışımlar cam kavanozlara ve bu cam kavanozların her birinin içerisine 40 adet larva konuldu ve inkübe edildi. Flufenoxuron bulunduran ve bulundurmeyen besin, larvalara verilmeden önce besine karıştırılan suyun ortamdan buharlaştırılması ve flufenoxuronun olabilecek repellent etkisinin ortadan kalkması için, larvalara 12 saat sonra verildi.

Uygulamadan sonra 12. saatten itibaren 168. saate kadar her 12 saatte, özellikle flufenoxurondan etkilenmiş (kütikulasında renk koyulaşması meydana gelen) birer adet larva numune olarak alındı. Ölümden dolayı meydana gelebilecek histopatolojik değişikliklerden sakınmak için ölen larvalar dikkate alınmadı. Numune olarak alınan larvalar eterle bayıldıktan sonra baş ve son kısımları kesildi. Larvaların bir kısmı nötr formol diğer kısmı Bouin çözeltilisinde tespit edildi. Tüm numuneler dehidrasyon işlemlerinden sonra ksilolde saydamlaştırıldı ve parafin bloklar yapıldı. Bloklanmış numunelerden 7 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitler hematoksilin-eozin ile boyandı.

Belirtilen saatlerde alınan numunelerden hazırlanan histolojik kesitlerden ışık mikroskobu ile her numuneden en az beş adet olmak üzere abdomen bölgesine ait kütikula kalınlık ölçüsü alındı. Kontrol grubuna ve flufenoxuron uygulaması yapılan gruplara ait altıncı evre larvalarının kütikula kalınlık ölçüleri Tukey testi ile karşılaştırıldı (SPSS 10.0 versiyonu).

### 3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

#### 3.1 Kontrol Grubu Larvalarına Ait Gözlemler

Altıncı evreye yeni geçmiş (beşinci deriyi yeni değiştirmiş) larvalara çıplak gözle bakıldığı zaman yeni kütikula beyazımsı açık sarı renkte, ince yumrulara sahip ve parlak olarak görülür.

*G. mellonella*'da integüment, tek sıralı yassı hücrelerden oluşan epidermis ile bu hücrelerin salgısından meydana gelen kütiküladan oluşur. Kütikula, epikütikula ve prokütiküladan meydana gelirken evrenin ilerleyen saatlerinde kütiküladaki kalınlaşma ile prokütiküladan ekzokütikula ve endokütikula tabakaları ayırt edilebilmiştir (Şekil 1). Ekzokütikulanın altında yer alan endokütikula horizontal lamellerden oluşmuş olarak görülür. Altıncı deriyi değiştirmeden önce epidermal hücreler prizmatikleşerek yeni kütikülayı (yedinci evre kütikulasını) salgılamaya başlamıştır (Şekil 2). Eski kütikulanın atılıp yeni kütikulanın sentezlenmeye devam edilmesiyle bir üst evre olan yedinci evre başlamıştır. Deri değiştirmeyi takip eden birkaç saat içinde baş kapsülünde ve yeni kütiküladan koyulaşma ve kısmen sertleşme başlamıştır.

Denemelerde histolojik kesitler için numune olarak alınmayan kontrol grubu larvalarının gelişimi izlenmeye devam edilmiştir. Yedinci evreye ulaşan larvaların ölen birkaç tanesi dışında tamamının pupa devresine ulaştığı ve ergin kelebeklere dönüştüğü gözlenmiştir.

#### 3.2 Kontrol Grubuna Ait Larvaların Kütikula Kalınlık Ölçümleri

Altıncı evre kontrol grubu larvalarının histolojik kesitlerinden alınan kütikula kalınlık ölçümleri Tablo 1, 2 ve 3'de, bu değerlere ait ortalama kütikula kalınlık ölçümleri ise Şekil 3'deki histogramda görülmektedir. Şekil 3'deki histogramda açıkça görülebileceği gibi kontrol grubu larvalarında kütikula kalınlığı 12. saatten 72. saate kadar zamana bağlı olarak artmıştır. Bu artış özellikle 48. saatten itibaren daha belirgin olarak görülmektedir. Tablo 1, 2 ve 3'de kontrol grubuna ait larvaların 108. saatte deri değiştirerek bir üst evre olan yedinci evreye geçmiş olduğu görülmektedir. Kontrol grubu larvalarına ait yedinci evre kütikulasındaki kalınlık artışı da, Tablo 1, 2 ve 3'de görülebileceği gibi devam etmiştir.

### 3.3 Flufenoxuronun İntegüment Üzerindeki Etkileri

250, 500 ve 1000 ppm flufenoxuron uygulanan *G. mellonella* larvalarının çoğunluğunun integümentinde 36. saatten itibaren aşırı koyulaşma ve kararma oluşmuştur. Ayrıca bu larvalarda kontrol grubu larvalarındaki gibi sağlıklı gelişme gözlenememiş, hareketsizlik ve ilerleyen saatlerde aşırı kanama görülmüştür. Histolojik kesit hazırlamak için alınan numuneler özellikle bu şekilde etkilenmiş larvalardan seçilmiştir. Ayrıca flufenoxuron uygulanan numunelere ait histolojik preparatlarda, kontrol grubunda görülen endokütiküler lameller belirgin olarak gözlenememiştir.

Flufenoxuronun *G. mellonella* larval integümenti üzerinde gözlenen bir diğer etkisi de deri değiştirme sürecini bozması ve süre olarak uzatmasıdır. Tablo 1, 2 ve 3'te altıncı ve yedinci evre kütikülalarının bir arada bulunduğu saatler larvanın deri değiştirme anını göstermektedir. Ekdisis olayı sağlıklı larvalarda birkaç saat süren hızlı bir olay olduğu için, kontrol grubu larvalarında altıncı ve yedinci evre kütikülalarının bir arada bulunduğu anı histolojik kesitlerde gözlemek çok zor olmuştur. Ancak flufenoxuron uygulanan larvalarda deri değiştirme engellendiği ve eski kütiküla atılamadığı için histolojik kesitlerde bu olay sürekli gözlenebilmiştir (Tablo 1, 2 ve 3). Uygulanan her üç dozda 156. ve 168. saatte her üç denemede de larvaların tamamı öldüğü için numune alınamamış ve değerlendirme yapılamamıştır.

**Tablo 1.** Kontrol grubu ile 250, 500 ve 1000 ppm flufenoxuron uygulanan altıncı evre *G. mellonella* larvalarının kütiküla kalınlıklarına ait birinci deneme değerleri

Dozlar	Kontrol	250 ppm	500 ppm	1000 ppm
Saatle	Kütiküla kalınlığı (µm)	Kütiküla kalınlığı (µm)	Kütiküla kalınlığı (µm)	Kütiküla kalınlığı (µm)
12	7.2; 7.9; 8.1; 9.0; 9.0*	7.2; 7.2; 7.2; 9.0; 9.0*	9.0; 9.0; 7.2; 7.2; 6.3*	7.2; 6.3; 6.3; 6.3; 6.3
24	9.0; 10.0; 10.8; 10.8; 11.5*	9.0; 8.0; 10.0; 10.0; 10.0	7.2; 6.3; 7.2; 9.0; 7.2*	9.9; 9.0; 9.0; 9.9; 8.1
36	9.9; 10.8; 10.8; 9.0; 9.0*	9.0; 9.0; 10.0; 8.1; 10.0*	5.4; 5.4; 7.2; 6.3; 5.4*	7.2; 6.3; 4.6; 6.3; 6.3*
48	11.5; 10.8; 11.5; 13.5; 13.3*	7.2; 7.2; 8.1; 8.1; 7.2*	7.2; 6.3; 6.3; 5.4; 6.3*	7.2; 4.6; 4.6; 4.6; 4.5
60	12.6; 14.4; 14.4; 16.2; 14.4*	7.2; 7.2; 9.0; 9.7; 8.1*	5.4; 7.2; 7.2; 6.5; 5.4*	9.9; 9.9; 9.9; 9.0; 9.0
72	14.4; 15.1; 14.4; 14.4; 12.6*	6.3; 4.3; 5.4; 6.5; 7.2*	7.2; 6.5; 7.2; 5.4; 4.7*	7.2; 7.2; 7.2; 6.3; 8.1
84	9.0; 9.0; 9.0; 10.8; 10.8*	7.2; 8.0; 8.0; 6.5; 7.2*	7.2; 6.5; 7.2; 5.4; 4.7*	4.5; 3.6; 3.6; 2.7; 2.7
96	10.8; 10.8; 10.8; 10.8; 9.0*	5.4; 7.2; 6.5; 7.2; 7.2*	7.2; 6.5; 5.4; 6.5; 7.2*	3.6; 2.7; 1.8; 3.6; 2.7
108	4.3; 5.4; 4.5; 3.6; 4.5#	3.6; 3.6; 3.0; 3.6; 3.6#	3.6; 3.6; 4.3; 4.3; 4.3#	2.7; 1.8; 3.6; 2.7; 2.7
120	5.4; 4.5; 4.5; 7.2; 5.4**	6.5; 7.2; 7.2; 7.2; 6.5**	4.7; 6.5; 6.3; 6.5; 5.4*	3.6; 5.4; 3.6; 3.6; 3.6
132	7.2; 9.0; 9.9; 10.0; 7.2**	5.4; 7.2; 7.9; 7.2; 7.2**	7.2; 6.5; 6.5; 6.5; 6.5*	1.8; 2.7; 3.6; 3.6; 3.6
144	9.0; 10.8; 10.8; 9.0; 10.8**	3.6; 4.3; 3.6; 5.4; 4.5**	7.2; 7.2; 8.0; 7.2; 8.0*	3.6; 2.7; 2.7; 1.8; 2.7
156	10.8; 11.7; 11.7; 11.5; 10.8*	-	-	-
168	9.0; 10.8; 10.8; 10.8; 10.8*	-	-	-

(\*) 6. evreye ait kütiküla kalınlık ölçümleri; (\*\*) 7. evreye ait kütiküla kalınlık ölçümleri

(#) 6. ve 7. evreye ait kütiküla bir arada (yeni kütikülaya ait değerler); (-) %100 ölüm gerçekleştiği için değer yok

**Tablo 2.** Kontrol grubu ile 250, 500 ve 1000 ppm flufenoxuron uygulanan altıncı evre *G. mellonella* larvalarının kütikula kalınlıklarına ait ikinci deneme değerleri

Dozlar	Kontrol	250 ppm	500 ppm	1000 ppm
Saatle	Kütikula kalınlığı (µm)	Kütikula kalınlığı (µm)	Kütikula kalınlığı (µm)	Kütikula kalınlığı (µm)
12	7.2; 7.2; 7.9; 6.5; 9.0*	5.4; 6.3; 5.4; 4.5; 4.5 <sup>†</sup>	5.4; 5.4; 5.4; 4.5; 6.3 <sup>†</sup>	6.5; 7.2; 7.2; 7.2; 6.5 <sup>†</sup>
24	11; 12.6; 10.8; 11.7; 11.7*	5.4; 6.5; 5.4; 6.5; 4.5 <sup>†</sup>	9.0; 7.9; 9.9; 8.1; 10.0	7.9; 7.2; 7.2; 8.1; 7.9 <sup>†</sup>
36	10.8; 11.5; 10.8; 7.9; 11.7*	7.2; 6.5; 8.1; 7.2; 7.9 <sup>†</sup>	8.1; 9.0; 8.1; 9.9; 10.8	5.4; 6.5; 7.2; 7.2; 5.4 <sup>†</sup>
48	11.5; 10.0; 10.0; 10.8; 10.0 <sup>†</sup>	7.2; 6.5; 7.2; 7.2; 9.0 <sup>†</sup>	5.4; 5.4; 5.4; 5.4; 8.1 <sup>†</sup>	5.4; 5.4; 6.5; 6.5; 6.5 <sup>†</sup>
60	14.4; 13.5; 10.8; 14.4; 12.6	4.5; 7.2; 6.3; 6.3; 7.2 <sup>†</sup>	7.2; 8.1; 7.2; 6.3; 5.4	7.9; 8.1; 7.2; 10.0; 7.9 <sup>†</sup>
72	12.6; 10.8; 12.6; 14.4; 14.4 <sup>†</sup>	9.0; 7.9; 9.0; 7.9; 8.1 <sup>†</sup>	5.4; 7.2; 7.2; 7.2; 7.2 <sup>†</sup>	9.0; 9.0; 8.1; 8.1; 9.9 <sup>†</sup>
84	10.8; 10.8; 10.8; 11.5; 10.8	8.1; 8.1; 7.2; 7.2; 8.1 <sup>†</sup>	3.6; 2.9; 3.6; 3.6; 1.8 <sup>†</sup>	4.3; 3.6; 3.6; 5.4; 3.6 <sup>†</sup>
96	11.7; 10.8; 9.0; 9.0; 10.8*	5.4; 7.2; 8.1; 6.5; 7.2 <sup>†</sup>	4.5; 4.3; 3.6; 3.6; 4.5 <sup>†</sup>	1.8; 2.7; 3.6; 3.6; 3.6 <sup>†</sup>
108	7.2; 7.2; 9.0; 7.9; 7.9 <sup>†</sup> **	7.2; 6.5; 7.2; 5.4; 6.5 <sup>†</sup>	3.6; 3.6; 2.9; 4.3; 4.3 <sup>†</sup>	3.6; 1.8; 2.9; 3.6; 3.6 <sup>†</sup>
120	5.4; 6.3; 6.5; 7.2; 7.2 <sup>†</sup> ***	7.2; 7.2; 9.0; 6.5; 7.9 <sup>†</sup>	5.4; 5.4; 5.4; 4.5; 5.4 <sup>†</sup>	7.2; 7.2; 6.5; 6.5; 7.2 <sup>†</sup> *
132	10.8; 11.7; 9; 7.9; 7.9 <sup>†</sup> **	-	-	-
144	8.1; 7.9; 9.0; 8.1; 10.0 <sup>†</sup> **	-	-	-
156	7.9; 10.0; 7.2; 10.0; 9.0 <sup>†</sup> **	-	-	-
168	14.4; 11.7; 11.5; 10.8; 10.8 <sup>†</sup> *	-	-	-

(\*) 6. evreye ait kütikula kalınlık ölçümleri; (\*\*\*) 7. evreye ait kütikula kalınlık ölçümleri

(#) 6. ve 7. evreye ait kütikula bir arada (yeni kütikülaya ait değerler); (-) %100 ölüm gerçekleştiği için değer yok

**Tablo 3.** Kontrol grubu ile 250, 500 ve 1000 ppm flufenoxuron uygulanan altıncı evre *G. mellonella* larvalarının kütikula kalınlıklarına ait üçüncü deneme değerleri

Dozlar	Kontrol	250 ppm	500 ppm	1000 ppm
Saatle	Kütikula kalınlığı (µm)	Kütikula kalınlığı (µm)	Kütikula kalınlığı (µm)	Kütikula kalınlığı (µm)
12	4.5; 3.6; 5.4; 5.4; 3.6*	7.2; 6.5; 7.2; 6.5; 6.3*	3.6; 3.6; 2.9; 4.3; 4.3*	7.2; 7.2; 5.4; 7.2; 5.4*
24	6.1; 5.4; 5.4; 4.5; 5.4*	9.0; 9.0; 9.0; 6.5; 7.2*	7.2; 9.0; 10.0; 9.0; 7.2*	7.2; 7.9; 8.1; 6.3; 6.4*
36	6.5; 7.2; 7.2; 7.2; 7.9*	10.0; 8.1; 9.0; 7.9; 7.9*	7.2; 7.9; 7.9; 7.2; 6.5*	5.4; 5.4; 4.5; 6.3; 6.3*
48	7.9; 8.1; 7.2; 9.0; 9.0*	9.0; 9.0; 7.2; 6.5; 7.2*	7.2; 7.9; 8.1; 6.5; 7.2*	7.2; 7.9; 8.1; 7.2; 7.9*
60	9.9; 11.7; 12.6; 13.6; 14.4*	10.8; 10.8; 10.0; 10.8; 9.0*	9.0; 9.0; 8.1; 9.0; 9.0*	7.2; 9.9; 7.2; 6.3; 7.2*
72	12.6; 13.6; 13.6; 13.5; 14.4*	7.2; 9.0; 9.0; 7.2; 6.3*	7.9; 7.9; 7.9; 7.9; 7.6*	7.2; 9.0; 9.9; 10.0; 7.2*
84	14.4; 14.4; 15.1; 14.4; 14.4*	1.8; 1.8; 2.7; 3.6; 2.7#	3.6; 3.6; 4.5; 4.3; 3.6#	9.9; 7.2; 10.0; 9.9; 9.0*
96	12.6; 13.6; 13.6; 12.6; 12.6*	3.6; 4.3; 5.4; 2.9; 2.9#	3.6; 3.6; 1.8; 3.6; 2.8#	10.8; 9.9; 7.2; 9.0; 8.1*
108	9.0; 9.0; 8.1; 9.9; 10.8 <sup>†</sup> **	5.4; 5.4; 5.4; 3.6; 5.4#	5.4; 6.5; 6.3; 7.9; 6.3 <sup>†</sup> **	3.6; 4.3; 3.6; 4.3; 4.3#
120	10.8; 9.9; 10.8; 9.0; 9.0 <sup>†</sup> ***	1.8; 1.0; 0.9; 1.8; 1.8#	6.3; 6.3; 6.4; 6.4; 4.5 <sup>†</sup> ***	-
132	7.2; 9.9; 9.9; 10.8; 10.8 <sup>†</sup> ***	5.4; 4.5; 4.3; 5.4; 6.4 <sup>†</sup> **	-	-
144	13.6; 15.1; 14.4; 13.6; 13.6 <sup>†</sup> **	-	-	-
156	11.5; 13.3; 10.8; 13.5; 11.5 <sup>†</sup> **	-	-	-
168	14.4; 11.7; 12.6; 9.0; 13.6 <sup>†</sup> **	-	-	-

(\*) 6. evreye ait kütikula kalınlık ölçümleri; (\*\*\*) 7. evreye ait kütikula kalınlık ölçümleri

(#) 6. ve 7. evreye ait kütikula bir arada (yeni kütikülaya ait değerler); (-) %100 ölüm gerçekleştiği için değer yok

### 3.4 Flufenoxuronun Kütiküla Kalınlığı Üzerindeki Etkileri

Flufenoxuron uygulanan larvalara ait histolojik kesitlerden yapılan kütiküla kalınlık ölçümleri Tablo 1, 2 ve 3'de ve bu değerlere ait ortalama kütiküla kalınlık ölçümleri ise Şekil 3'deki histogramda görülmektedir. Tablo 1, 2 ve 3'de görüldüğü gibi kontrol grubu larvaları 108. saatten itibaren yedinci evreye geçmeye başlamıştır. Ancak kontrol grubuna ait kütiküla kalınlık ölçümleri ile flufenoxuron uygulanan larvaların kütiküla kalınlık ölçümlerini kıyaslamada altıncı evre kütiküla kalınlığı için ilk 72 saat değerleri kullanılmıştır.

Elde edilen kütiküla kalınlıklarına ait değerler belirtilen her saat için Tukey testi ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4). Tablo 4'deki istatistikî sonuçlarda görülebileceği gibi, 12. saatte kontrol grubu ile flufenoxuron uygulanan gruplar arasında fark yoktur, dolayısıyla bu saatte dozlar arasındaki fark dikkate alınmamıştır. 24. saatte kontrol grubu ile 500 ppm arasında fark olmaması ilginçtir. 36. saatte sadece 250 ppm'lik doz ve kontrol grubu arasında fark görülmemektedir. Özellikle 48. saatten itibaren kontrol grubu ile flufenoxuron uygulanan gruplar arasındaki farklar dikkat çekicidir. Bununla birlikte 48. saatte 500 ve 1000 ppm arasında fark yok iken 60. saatte her üç doz arasında da fark olmaması ilginçtir. 72. saatte ise 250 ppm ve diğer dozlar arasında fark yoktur. Bu sonuçlar flufenoxuronun kütiküla kalınlığında azalmaya sebep olduğunu göstermektedir. Ancak etki bakımından dozlar arasında düzensizlikler mevcuttur. Şekil 3'deki histograma bakıldığında özellikle 60. ve 72. saatlerde kontrol grubu maksimum değerine ulaşırken, 60. saatte flufenoxuron uygulanan larvaların kütiküla kalınlığı yaklaşık %45 oranında, 72. saatte yaklaşık %55 oranında azalmıştır.

**Tablo 4.** Tukey testi sonuçları

Dozlar/ Saatler	Kontrol	250 ppm	500 ppm	1000 ppm
	A.O. ± S.S.	A.O. ± S.S.	A.O. ± S.S.	A.O. ± S.S.
12	6.77±1.87 ab	7.02±1.57 ab	5.63±1.87 a	7.63±1.05 b
24	9.23±1.33 a	7.71±1.41 b	8.28±1.21 ab	8.01±1.08 b
36	9.22±1.56 a	8.39±1.08 a	7.49±1.60 b	6.06±1.07 c
48	10.29±1.29 a	7.60±0.83 b	6.54±0.90 c	6.29±1.30 c
60	13.33±1.64 a	8.30±1.90 b	7.33±1.35 b	8.44±1.19 b
72	13.57±1.00 a	7.35±1.42 bc	6.97±0.85 b	8.23±1.18 c

Aynı satırda farklı harf bulunduran ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p<0.05$ )

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kontrol grubuna ait sağlıklı *G. mellonella* larvalarının integüment yapısına ait gözlemler Hegazy ve Van De Veire [7], Özparlak [5] ve Bakar [8]'in gözlemleri ile aynıdır. Kontrol grubu larvalarında kütikülada zamana bağlı olarak meydana gelen kalınlık artışı ve lamelli yapı ise, Bastourous ve ark. [9], Lee ve ark. [10] ve Yin-Chang ve ark. [11] tarafından *Spodoptera littoralis* Boisd., *Agrotis ypsilon* Rott. ve *Agrotis tokionis* Bulter türleri üzerinde yapılan çalışmalarla prokütikülaya lamel ilavesi şeklinde açıklanmıştır.

Flufenoxuron uygulaması sonucunda görülen etkilere benzer şekilde, diğer kitin sentez inhibitörleri diflubenzuron (DFB)'un *G. mellonella*, *Manduca sp.* ve *Agrotis segetum* (Denis et. Schiff) larvalarında [5,7,12,13], lufenuronun *Phthorimaea operculella* (Zeller) larvalarında [14] ve teflubenzuronun *G. mellonella* larvalarında [8] kütikülada çatlamalara, kararmaya ve hemolenf kaybına sebep olduğu gözlenmiştir.

Üç doz olarak uygulanan flufenoxuron özellikle 48. saatten itibaren altıncı evre larvalarının kütikülasında kontrol grubuna kıyasla önemli oranda incelmeye sebep olmuştur. Kütikülada meydana gelen bu inceltme flufenoxuronun kütiküla sekresyonu üzerindeki etkisini gösterir. Bu durum, flufenoxuronun kitin sentezini inhibe etmesi ve kütikülaya prokütikular lamel ilavesini bozması şeklinde açıklanabilir. *S. littoralis* larvalarına besin yoluyla flufenoxuron, teflubenzuron ve DFB uygulanmış, her üçünde kitin sentezini %50 oranında inhibe ettiği bulunmuş [15], *S. littoralis* larvalarına topikal olarak uygulanan bu üç benzoyilürenin kütikülada kitin birikiminde benzer şekilde azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir [10].

Flufenoxuronun böceklerde kütiküla kalınlığı üzerindeki etkisine dair literatür bilgisine rastlanmamış ancak benzer şekilde, *G. mellonella* larvaları üzerinde besine karıştırma yoluyla uygulanan 1000, 500 ve 250 ppm DFB ve teflubenzuronun kütiküla kalınlığı üzerinde yaklaşık %50 oranında incelmeye sebep olduğu, bununla birlikte kullanılan dozlar arasında etki bakımından önemli fark olmadığı tespit edilmiştir [5,8]. Topikal yolla uygulanan flufenoxuron ve DFB'un *S. littoralis* larvalarında integüment üzerinde benzer etkiler gösterdiği tespit edilmiş, endokütiküla içine kitin mikrofibrillerinin birikimi durmuş, lamel miktarının artışı engellenmiş, amorf bir endokütiküla gözlenmiş, subkütiküla genişlemiş ve subkütikülada vakuoller ortaya çıkmıştır [10]. DFB enjekte edilen ergin çekirgelerin kütiküla kalınlığı, sağlıklı çekirge kütiküla kalınlığının sadece 1/7'si kadar



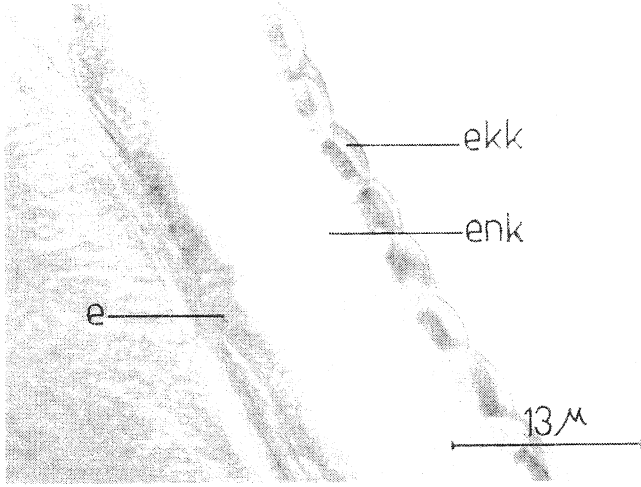
olabilmiştir [16]. Topikal yolla yeni deri değiştirmiş beşinci evre *Manduca* larvalarına uygulanan DFB kütiküla birikimini bozmuş, kontrol grubuna kıyasla kütiküla kalınlığını 1/3 oranında azaltmıştır [12]. DFB muamelesinden sonra gelişim inhibisyonu gösteren *Tenebrio molitor* L. pupalarında, DFB etkisiyle pupal kütiküla kalınlığı yaklaşık %70 oranında, ayrıca anormal gelişen erginlerin kütiküla kalınlığı da kontrol ergin kütikülası ile karşılaştırıldığında %25-40 oranında azalma tespit edilmiştir [17]. DFB ile muamele edilmiş *S. littoralis* larvalarında ikinci torasik tergal plakların kütiküla kalınlığında papilla ve interpapilla bölgelerinde kontrol grubuna kıyasla %20'lik, dördüncü abdominal tergitlerin kütiküla kalınlığında da %10-22'lik bir azalma gözlenmiştir [18]. DFB ile muamele edilen *Leptinotorsa decemlineata* (Say) larvalarının kütikülasındaki lamellerin daha ince olduğu gözlenmiş, prokütiküla kalınlığının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %50'den daha fazla oranda azaldığı görülmüştür [19].

*Chilo suppressalis* Walker'in kültüre alınmış integümenti üzerinde yapılan çalışmada, kitin sentez inhibitörü olarak PH 60-38 ve polyoxin D yeni kütiküla kalınlığını önemli oranda indirgemiş, bu indirgenme kitin öncüllerinden kitin sentezlenmesinin inhibe edilmesine bağlanmıştır [20]. Benzoylfenilüre grubundan 2,6-difluoro- ve 2,6-dichloro-benzoyl-4-chlorophenylurea'nin çok düşük konsantrasyonlarının bile kültüre edilmiş *C. suppressalis* integümentinde, yeni kütikülar büyümeyi kontrol grubuna kıyasla %50 oranında inhibe etmek için yeterli olduğu bulunmuştur [21]. Kitin sentez inhibitörü buprofezin etkisiyle *Trialeurodes vaporariorum* pupal kütikülasında, lamelleri olmayan ve düzensiz kalınlıkta amorf bir prokütiküla gözlenmiştir [22]. Triflumuron, *T. molitor* pupalarında post-ekdisial kütiküla kalınlığında yaklaşık %10-43 oranında [23], yeni deri değiştirmiş dördüncü evre *Culex pipiens pipiens* L. larvalarında ise larval kütiküla kalınlığında %37-41, pre-ekdisial pupal kütiküla kalınlığında %39-52 oranında azalmaya sebep olmuştur [24]. Bununla birlikte bu çalışmada flufenoxuronun farklı dozları arasında etki bakımından görülen düzensizlikler, yani daha yüksek dozda kütiküla kalınlığındaki incelmenin daha az olması larvaların besini aynı zamanda ve aynı miktarda yememiş olmasına yada larvaların besini sevmeye yada sevmeme gibi davranışlarına bağlanabilir.

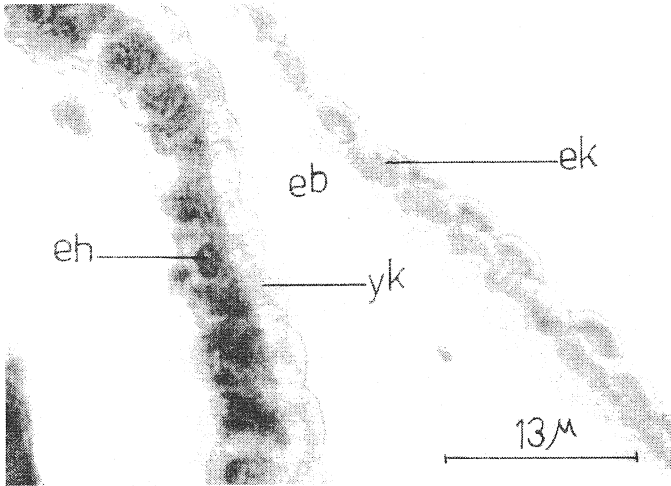
Kontrol grubu *G. mellonella* larvalarına ait histolojik preparatlarda larvaların en geç 108. saatte deri değiştirmiş ve bir üst evreye geçmiş olduğu gözlenmiştir. Flufenoxuron uygulanan larvalarda ise her üç dozda da eski ve yeni derinin birlikte olduğu ekdisis safhası sürekli olarak gözlenebilmiştir. Bu durum flufenoxuron uygulanan larvaların ekdisisi başaramamalarına yani eski derilerini atmada zorluk çektiklerine, flufenoxuronun etkisiyle yeni

sentezlenen kütikülanın zayıflığına ve yetersizliğine işaret eder. Sağlıklı yeni bir kütiküla sentezlenmediği için larvalar eski kütikülalarını atamamaktadır. Dolayısıyla etkilenen larvalarda deri değiştirme süreci bozulmuş ve süre olarak uzamıştır. Benzer sonuçlar *G. mellonella* larvaları üzerinde DFB ve teflubenzuron uygulamalarında da gözlenmiştir [5,8]. Reynolds [25], benzoyilüreler ile zehirlenen böceklerin her zamanki gibi deri değiştirme siklusunu başlattığını ancak ekdisis zamanı geldiğinde zayıf düşen böceğin eski kütikülayı atmaya başaramadığını, çünkü yeni kütikülanın hem sertliğinin hem de sağlamlığının ciddi şekilde bozulduğunu belirtmiştir. Clarke ve Jewess [15], benzoyilürelerin deri değiştirmede ölüme sebep olmasını kasların bağlanma ve hareketleri için gerekli iskelet sertliğinin noksanlığına bağlamış, bu durumu da kütikülada kitin miktarının indirgenmesiyle ilişkilendirmiştir. Ker [16], DFB ile beslenen bir böceğin ekdisise normal bir şekilde başlayacağını ancak ekdisisi başaramayacağını ve yavaş yavaş öleceğini bildirmiş, bu olayı kütikülanın kitin yokluğundan ciddi şekilde zayıflamasına bağlamıştır.

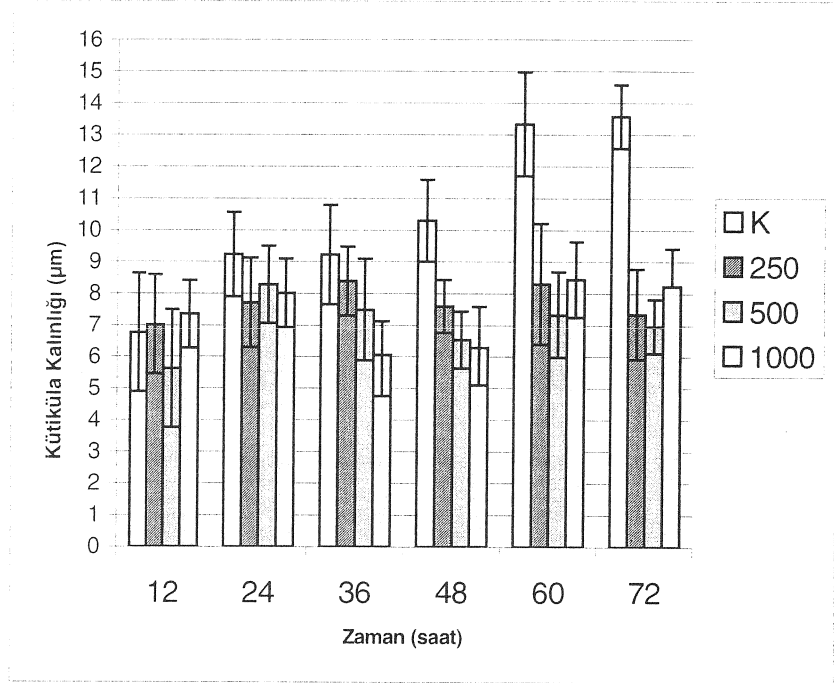
Sağlıklı *L. decemlineata* bireylerinde elytra'da ergin oluşumundan yaklaşık 10 gün sonrasına kadar geçirgenlik azalmış, DFB'un kitin sentezi inhibisyonundan dolayı geçirgenlikteki bu azalmayı bloke edebileceği düşünülmüştür [26]. Bu durum kütiküladaki kalınlık artışının durmasıyla ilişkili olabilir. Böceklerin, vücutlarına temas eden insektisitlerin girişine karşı kalın ve sklerotize kütikülaları ile korundukları bilinmektedir. Evre boyunca kütiküla kalınlaştığı için geçirgenlik giderek azalır [27]. Genel bir kural olarak, penetrasyonun daha ince kütikülada daha hızlı olduğu kabul edilmektedir [28]. Guo-Je ve ark. [29], endokütikülanın kalın olmasının hidrofobik insektisitlerin epidermal hürelere ulaşmasında etkili bir bariyer oluşturduğunu düşünmektedir. Flufenoxuronun kütikülada sebep olduğu incelenin, temas yoluyla etkili olan diğer insektisitlerin kütiküladaki penetrasyonunu hızlandırması ve kolaylaştırması da muhtemeldir. Bu sebeple temas yoluyla etkili insektisitlerin flufenoxuron ile kombine olarak kullanılması ve bu yolla etkilerinin artırılması gelecek çalışmalara konu oluşturabilir.



**Şekil 1.** Altıncı evre *G. mellonella* larvasının 72. saatinde kütikula kalınlığının maximum seviyeye ulaşması. e: epidermis, ekk: ekzokütikula, enk: endokütikula (Harris'in hematoxilen-eozini)



**Şekil 2.** Yeni sentezlenmekte olan kütikula ve eski kütikulanın birlikte görünüşü. eb: ekuviyal boşluk, eh: epidermal hücre, ek: eski kütikula, yk: yeni kütikula (Harris'in hematoxilen-eozini)



Şekil 3. Kontrol grubu (K) ve flufenoxuron uygulanan (250, 500 ve 1000 ppm) altıncı evre *G. mellonella* larvalarının zamana bağlı ortalama kütikula kalınlık ölçülerini gösteren histogram

## KAYNAKLAR

1. Mondal K.A.M.S.H., Parween, S., Insect growth regulators and potential in the management of stored-product insect pests, *Integr. Pest Manage. Rev.*, 5: 255-295, (2000).
2. Ishaaya I., Insecticides with novel modes of action: An overview. In: *Insecticides with novel modes of action (Mechanisms and application)*, Degheele, D. (ed.), Springer, 1-24, (1998).
3. Tasei J.-N., Effects of insect growth regulators on honey bees and non-*Apis* bees. A review, *Apidologie*, 32: 527-545, (2001).
4. Özparlak H., Ünsal S., Aktümsek A., Diflubenzuron'un (DFB) *Galleria mellonella* L. larvalarının orta bağırsağına etkileri, *Veterinarium*, 12 (1): 437-441, (2001).
5. Özparlak H., Diflubenzuron'un *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları üzerindeki etkileri, Yüksek Lisans Tezi, S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 63 sf. (2001).

6. Öztürk S., Tarım İlaçları, Ak Basımevi, İstanbul, 378-379, (1997).
7. Hegazy G., Van De Veire M., Effect of the chitin synthesis inhibitor diflubenzuron on the sixth and seventh instar of *Galleria mellonella* L.: Importance of application time, Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 45 (3): 453-463, (1980).
8. Bakar B., Teflubenzuron'un *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları üzerindeki etkileri, Yüksek Lisans Tezi, S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 52 sf, (2002).
9. Bastourous M.W., Hammad S., Abdellatif M.A., Morphological and histological studies on some stages of cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) I. The integument and related structures, Z. Ang. Ent., 68: 423-426, (1971).
10. Lee S.A., Clarke B.S., Jenner D.W., Williamson F.A., Cytochemical demonstration of the effects of the acylureas flufenoxuron and diflubenzuron on the incorporation of chitin into insect cuticle, Pestic. Sci., 28: 367-375, (1990).
11. Yin-Chang W., Rong-Sheng C., Chang-Kun C., Zi-Ping Y., Studies on cuticular structures in two species of cutworms, Acta Entomol. Sinica, 33 (3): 309-313, (1990).
12. Mitsui T., Nobusawa C., Fukami J., Colins J., Riddiford L.M., Inhibition of chitin synthesis by diflubenzuron in *Manduca* larvae, J. Pesticide Sci., 5: 335-341, (1980).
13. Erinc M., *Bacillus thuringiensis* ve bazı kimyasal insektisitlerin *Agrotis segetum* (Denis et. Schiff) (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarına etkileri, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 44 sf. (1996).
14. Edomwandae E.O., Schoeman A.S., Brits J.A., Merwe M.V.D., Laboratory evaluation of lufenuron on immature stages of potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), J. Econ. Entomol., 93 (6): 1741-1743, (2000).
15. Clarke B.S., Jewess P.J., The inhibition of chitin synthesis in *Spodoptera littoralis* larvae by flufenoxuron, teflubenzuron and diflubenzuron, Pestic. Sci., 28: 377-388, (1990).
16. Ker R.F., Investigation of locust cuticle using the insecticide diflubenzuron, J. Insect Physiol., 23: 39-48, (1977).
17. Soltani N., Besson M.T., Delachambre J., Effects of diflubenzuron on the pupal-adult development of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae): Growth and development, cuticle secretion, epidermal cell density and DNA synthesis, Pest. Biochem. Physiol., 21: 256-264, (1984).
18. Osman S.E., Effect of the anti-moulting agent "dimilin" on the blood picture and cuticle formation in *Spodoptera littoralis* larvae, Bull. ent Soc. Egypt. Econ. Ser., 14: 37-46, (1985).
19. Hegazy G., De Cock A., Auda M., Degheele D., Diflubenzuron toxicity, effect on the cuticle ultrastructure and chitin ve protein content of colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (SAY) (Coleoptera:Chrysomelidae), Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 54: (1) 89-101, (1989).

20. Nishioka T., Fujita T., Nakajima M., Effect of the chitin synthesis inhibitor diflubenzuron on cuticle formation of the cultured integument of *Chilo suppressalis*. J. Pesticide Sci., 4: 367-374, (1979).
21. Kitahara K., Nakagawa Y., Nishioka T., Fujita T., Cultured integument of *Chilo suppressalis* as a bioassay system of insect growth regulators. Agric. Biol. Chem., 47 (7): 1583-1589, (1983).
22. Hegazy G., De Cock A., Degheele D., Ultrastructural changes in the cuticle of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*, induced by the insect growth inhibitor buprofezin. Entomol. Exp. Appl., 57: 299-302, (1990).
23. Soltani N., Soltani-Mazouni N., Delachambre J., Evaluation of triflumuron, a benzoylphenylurea derivative, on *Tenebrio molitor* pupae (Col., Tenebrionidae): effects on cuticle. J. Appl. Ent., 120: 627-629, (1996).
24. Rehimi N., Soltani N., Laboratory evaluation of alsystin, a chitin synthesis inhibitor, against *Culex pipiens pipiens* L. (Dip., Culicidae): effects on development and cuticle secretion. J. Appl. Ent., 123: 437-441, (1999).
25. Reynolds S.E., The cuticle, growth and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. Pestic. Sci., 20: 131-146, (1987).
26. Grosscurt A.C., Effects of diflubenzuron on mechanical penetrability, chitin formation and structure of the elytra *Leptinotarsa decemlineata*, J. Insect Physiol., 24: 827-831, (1978).
27. Ebeling W., The Physiology of Insecta. Permeability of Insect Cuticle. Rockstein, M. (ed.), Academic Press New York and London, Second Edition, 271-337, (1974).
28. Nesbitt J.N., Structural aspects of penetration through insect cuticles, Pestic. Sci., 1: 204-208, (1970).
29. Guo-Je G., Yin-Chang W., Zi-Ping Y., Ultrastructural and biochemical studies of integument in relation to natural tolerance to DFB in black cutworm and armyworm, Acta Entomol. Sinica, 29 (3): 259-266, (1986).