

***Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*'in  
*Leptinotarsa decemlineata* (Say.) (Coleoptera:  
Chrysomelidae) larvalarının ortabarsağına etki  
sürecinin histolojik yöntemlerle belirlenmesi\***

Ferit TURANLI\*\*

Metin ÇABUK\*\*\*

Şeniz KISMALI\*\*

Ivan GELBIC\*\*\*\*

**Summary**

**Determination of the steps in mode of action of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* on the midgut of *Leptinotarsa decemlineata* (Say.) (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae**

The steps in mode of action of  $\delta$ -endotoxin with insecticidal efficacy produced by gram-positive bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* were described in details.

Influences of the bacteria applied on last instars larvae of colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) were observed on brush border membrane of midgut. A group of the fresh last instars larvae were fed with treated leaves by Novodor FC, commercial bacteria formulation, with recommended doses while other groups were being fed with treated leaves by distilled water. Fixations were done with two hours intervals at the first twelve hours after treatment. At following twelve hours fixations periods increased to six hours intervals and twelve hours intervals at following another twenty four hours. Effects of bacteria were evaluated from slides prepared by histological methods from the fixated samples. According to the results, first symptoms of effects of bacterial toxin on

---

\* Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2002-ZRF-004 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

\*\* Ege University, Faculty of Agriculture, Dept of Plant Protection, 35100 Bornova-Izmir/Turkey

\*\*\* Celal Bayar University, Akhisar Vocational School, Manisa/Turkey

\*\*\*\* Biological Centre, Institute of Entomology, Czech Academy of Science Branisovka 31, 370 05 Ceske Budejovice/Czech Republic  
e-mail: ferit.turanli@ege.edu.tr

Alınış (Received): 31.05.2006

microvillus were observed after two hours from the beginning of feeding. Effects were becoming widespread and stronger at the end of four and six hours. In the samples taken following hours, effects were increased gradually and especially significant damages were detected on brush border membrane and midgut cells after twelve hours.

**Key Words:** *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, *Leptinotarsa decemlineata*, mode of action, midgut, histology

**Anahtar sözcükler:** *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, *Leptinotarsa decemlineata*, etki mekanizması, ortabarsak, histoloji

## Giriş

Tarımsal üretimin geçmişi kadar eski olan, zararlıların sebep olduğu ürün kaybını azaltma çabaları, artık günümüzde çevre ile dost uygulamalarla gerçekleştirilmeye çalışılmaktadır. Bu uygulamaların odağında bulunan ve tüm dünyada en etkili böcek patojeni olarak bilinen *Bacillus thuringiensis* Berliner ve *Bacillus cereus* Frankland and Frankland gibi bakteri gruplarından 150'nin üzerinde insektisit etkili Cry proteini ve bunların 1000'den fazla izolatu saptanmıştır (Whalon & Wingerd, 2003). Ülkemizde de son zamanlarda bu konuda yapılmaya başlanan çalışmalarda toprak, tahıl, bitkisel artıklar, ölü böcek ve böcek dışkıları gibi çok farklı ortamlardan alınan örneklerle *B. thuringiensis* yönünden mikroflora varlığımız ortaya konmaya çalışılmıştır. Söz konusu çalışmalarda 5 farklı Cry gruba bağlı 103 izolat saptanmıştır (Apaydın et al., 2005).

Bu çalışmada ele alınan *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* ilk olarak 1982 yılında Almanya'da izole edilerek, özellikle Chrysomelidae (Coleoptera) familyası türlerine karşı etkili olduğu dikkat çekmiştir. Bu familyaya bağlı Patates böceği *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae)'nın larvalarına karşı yapılmış çalışmalarda *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*' in bu zararlıya karşı oldukça etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Huger et al., 1986; Carroll et al., 1997). Bunu takiben bakterinin etki mekanizmasına olan ilgi ve çalışmalar da gün geçtikçe artmıştır.

Ülkemizde konu ile ilgili ilk çalışma, *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*' in *L. decemlineata* larvalarının sindirim sistemine etkileri konusunda yapılmıştır (Turanlı & Kısmalı, 2002). Söz konusu çalışmada, bakterinin *L. decemlineata* larvalarının sindirim sistemindeki etkileri ortaya konulmuştur. Bu amaçla bakteri uygulamasını takiben 6 saatlik periyotlarda sindirim sisteminden fiksasyonlar yapılmış ancak ilk fikse edilen örneklerde etki sürecinin önemli bir bölümünün oluştuğu izlenmiştir. Bu çalışma ile önceki çalışmada elde edilen sonuçların detaylandırılması amaçlanmış ve fiksasyon süreleri 2 saate indirgenerek bakterinin etki sürecindeki aşamaların ortaya konulması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Bu çalışmada kullanılan örnekler 2002–2003 yılları arasında Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Entomoloji Anabilim Dalında hazırlanmış ve 2004-2005 yıllarında Çek Cumhuriyeti Bilimler Akademisi, Entomoloji Enstitüsü'nde bu örneklerden kesitler alınarak preparatları yapılmıştır.

Çalışmanın ana materyalini Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünde 1995 yılından beri üretimi yapılmakta olan Patates böceği *L. decemlineata* ve *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*' in ticari formülasyonu Novodor FC isimli Cry3Aa toksini ve spor içeren biopreparatı oluşturmuştur. Zararının beslenmesi için Desiree patates çeşidi kullanılmıştır.

Parafin bloklardan kesit alınarak preparat yapımı ve bunların incelenmesinde Çek Cumhuriyeti Bilimler Akademisi, Entomoloji Enstitüsü, "Morfoloji ve Anatomi Laboratuvarı"nda mevcut olan aletlerden yararlanılmıştır. Leica RM 2165 marka otomatik mikrotom ile alınan kesitlerin preparat haline getirildikten sonra değerlendirilmesi "Olympus BX51" marka trinoküler ışık mikroskopuyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların fotoğrafları "Digital Microscopy Camera Olympus DP 50" marka fotoğraf aparatıyla çekilmiş ve fotoğraflar "Viewfinder lite, Studio lite" fotoğraf programı geliştirilerek incelenmiştir.

### Üretim çalışmaları

Patates bitkisi ve Patates böceği üretimi  $25\pm 2$  °C sıcaklık ve % 60 – 70 oranlı nem ile 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyodun sağlandığı, kontrollü iklim odalarında gerçekleştirilmiştir (Turanlı & Kısmalı, 2002).

Patates üretimi için, patates yumru veya parçaları, otoklavda sterilize edilmiş toprak içeren plastik saksılara ekilmiş ve iki günde bir su ihtiyaçları karşılanmıştır. Bu bitkiler 25–30 cm boya ulaştığında böceğe besin olarak verilmiştir.

Patates böceği üretimi için, her gün bırakılan yumurta kümelerinin bulunduğu patates yaprakları makasla kesilerek alınmış ve ayrı ayrı 14 cm çapındaki petri kapları içine konulmuştur. Yumurtalar yine her gün kontrol edilmiş ve açılan yumurta kümelerinin olduğu petrilere besin olarak patates yaprakları bırakılmıştır. Bu larvalar, 4. larva dönemine kadar temiz patates yaprakları ile beslenerek gelişmeleri sağlanmıştır.

### *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*'in *L. decemlineata* larvalarına uygulanması ve sindirim sistemi preparatlarının yapılması

Son larva dönemine henüz geçmiş larvalar Novodor FC ile (firma tarafından önerilen doz 12 ml Novodor FC /100 ml su hesabıyla) hazırlanmış solüsyona bandırılmış patates yaprakları ile beslenmeye başlanmıştır. Kontrol olarak kullanılacak bireyler ise saf suya bandırılmış patates yaprakları ile beslenmiştir.

### Fiksasyon işlemleri

Bir ön deneme ile bakteri uygulanmış yapraklarda beslenme davranışı izlenen larvaların, uygulamadan 4 saat sonra beslenmelerinde yavaşlama olduğu ve

12 saate ulaşıldığında ise beslenmenin çok azaldığı görülmüştür. Bu nedenle, bakterinin etki sürecini izlemek amacıyla uygulamadan sonraki ilk 12 saatlik bölümde, her iki saatte bir; sonraki 12 saatte her 6 saatte bir ve 48 saat tamamlanıncaya kadar her 12 saatte bir, 10' ar larva alınarak fikse edilmiştir.

Fiksasyon işlemi için, Turanlı & Kısmalı (2002)'dan farklı olarak larvaların tamamı yerine sadece sindirim sistemi dissekte edilerek alınmış ve fiksatif olarak da Bouin fiksatifi kullanılmıştır. Alınan larva örneklerinin ortabarsak kısımları fizyolojik su içinde çıkarılmış ve içeriği boşalmadan Bouin fiksatifi (Suda doymuş pikrik asit 75ml+ Formalin 25ml+ Glasiyal asetik asit 5ml) ile dolu 1,5ml lik eppendorf tüpleri içine ayrı ayrı konulmuş ve tüpler üzerine gerekli notlar alınmıştır (Ozban, 1982). Tüpler yatay konularak barsağın düzgün fikse olması sağlanmıştır. Bu işlemlerin sonunda tüpler +4 °C' de saklanmıştır.

### **Dehidratasyon, şeffaflaştırma ve parafine gömme işlemleri**

Sırasıyla her örnek grubu fiksatiften alınarak izleme işlemi başlatılmıştır. İzleme işleminde özellikle fiksatif içerisindeki pikrik asidin sebep olduğu sarı rengin dokudan tamamen uzaklaştırılmasına dikkat edilmiştir. Bunun için % 70'lik alkol içinde değişik sürelerde tutulmuş ve doku izleme işleminin devamı Ozban (1982)'a göre yapılmıştır.

### **Parafin blokların hazırlanması**

Doku izlemesi yapılmış olan örneklerin parafine gömülmesi ve blok hazırlanması işlemleri +60 °C'deki etüvde yapılmıştır. Blokların hazırlanacağı plastik kaplar etüv içine konularak içleri eritilmiş parafinle doldurulmuştur. Dokular yatay biçimde kaplara yerleştirilmiş ve daha sonra etüvden dışarıya alınarak oda sıcaklığında 12 saat bırakılmıştır (Sekendiz, 1979; Küpeliöğlü & Pabuççoğlü, 1995). Bloklar daha sonra +4' deki °C buzdolabında saklanmıştır.

### **Kesitlerin alınması**

Parafin bloklar, plastik kaplardan çıkarılarak kesitlerin alınacağı mikrotomun kaidesine konulmuş ve 5 mikrometre kesit kalınlığına ayarlanarak kesitler alınmıştır. Kesit alınan lamalar üzerine birkaç damla saf su damlatılarak 4 saat süreyle tutulacakları 45°C'deki yatay bir metal ısıtıcı tabla üzerine alınmıştır. Bu tabla üzerinde parafini eriyen ve lama yapışan dokular boyanmak üzere hazır hale gelmiştir (Ozban, 1982).

### **Boyama işlemleri**

Ortabarsak kesitlerinde doku ve hücrelerin değişik özelliklerini ortaya çıkararak incelemek amacıyla Mallory 3'lü boyama seti kullanılmıştır. Boyama işleminde kullanılan ortamlar ve bekletilme süreleri konu ile ilgili literatüre uygun olarak yapılmıştır (Sekendiz, 1979; Ozban, 1982; Küpeliöğlü & Pabuççoğlü, 1995).

### **Preparatların değerlendirilmesi**

Boyama işleminden sonra lamelle kapatılarak hazır hale gelen preparatlar trinoküler ışık mikroskobu ile değerlendirmeye alınmıştır. Kontroldeki ve bakteriyel

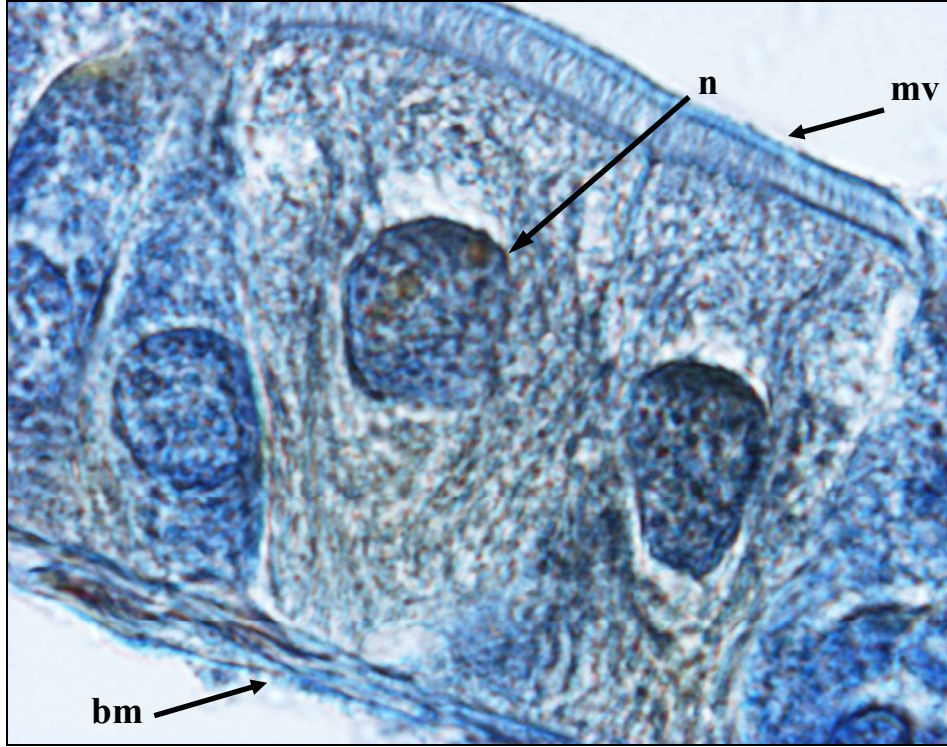
uygulanan bireylerdeki histolojik bulguların karşılaştırılması esasına dayalı bu değerlendirmede elde edilen sonuçların fotoğrafları çekilmiştir.

## Araştırma Sonuçları ve Tartışma

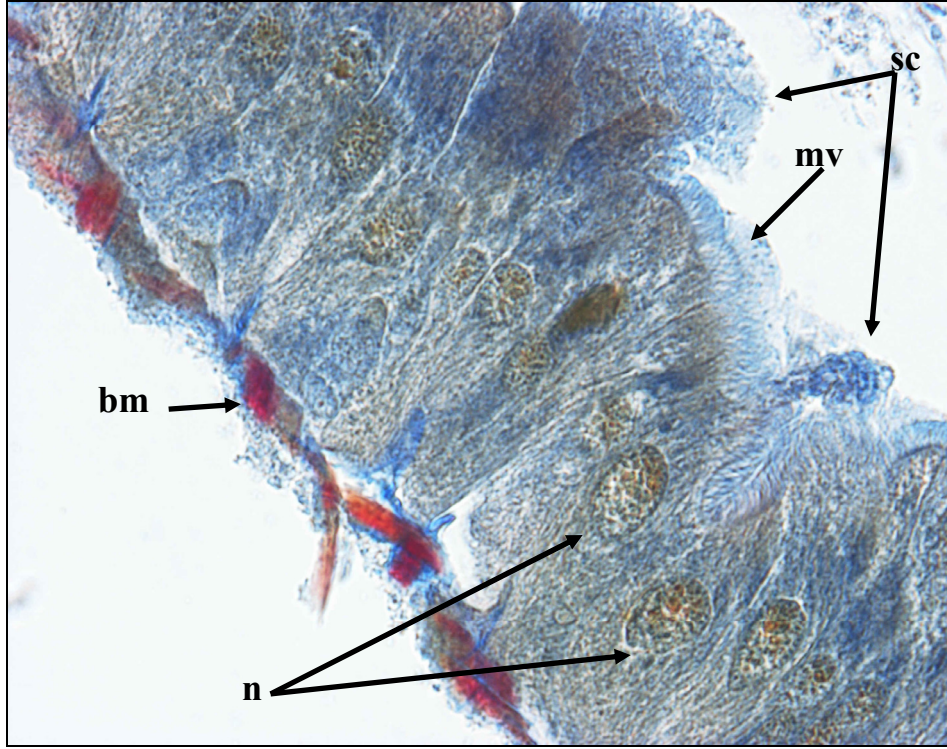
### Kontrol bireylerinden elde edilen bulgular

Etkinin iyi algılanabilmesi için öncelikle kontrol bireylerinden oluşturulan preparatlarda sağlıklı yapılar detaylı bir şekilde incelenmiştir.

Böceklerin ortabarsağının genellikle ortalarında oval nükleusları olan silindirik hücrelerden oluştuğu ve hücrelerin ortabarsak lümenine bakan kısımlarının mikrovilusların oluşturduğu mikrovilar alan ile kaplı olduğu bilinmektedir (Billingsley et al., 1996). Bu çalışmada alınan kesitlerde kolumnar ortabarsak hücrelerinin basal membrana bağlı alt kısımlarının nispeten dar; barsak içine bakan kısımların ise daha geniş olduğu görülmüştür (Şekil 1). Bir kısmı salgılama anındayken izlenen barsak hücrelerin genel olarak düz bir hat şeklinde sıralandıkları, bazen sindirim ve absorpsiyonu artırmak amacıyla olduğu düşünülen katlanmalar gösterdiği de dikkati çekmiştir. Hücrelerin uzunlamasına yapılarıyla orantılı olarak ortalarında yuvarlağa yakın şekilli nükleusları tüm kesitlerde dikkati çekmiştir (Şekil 2).



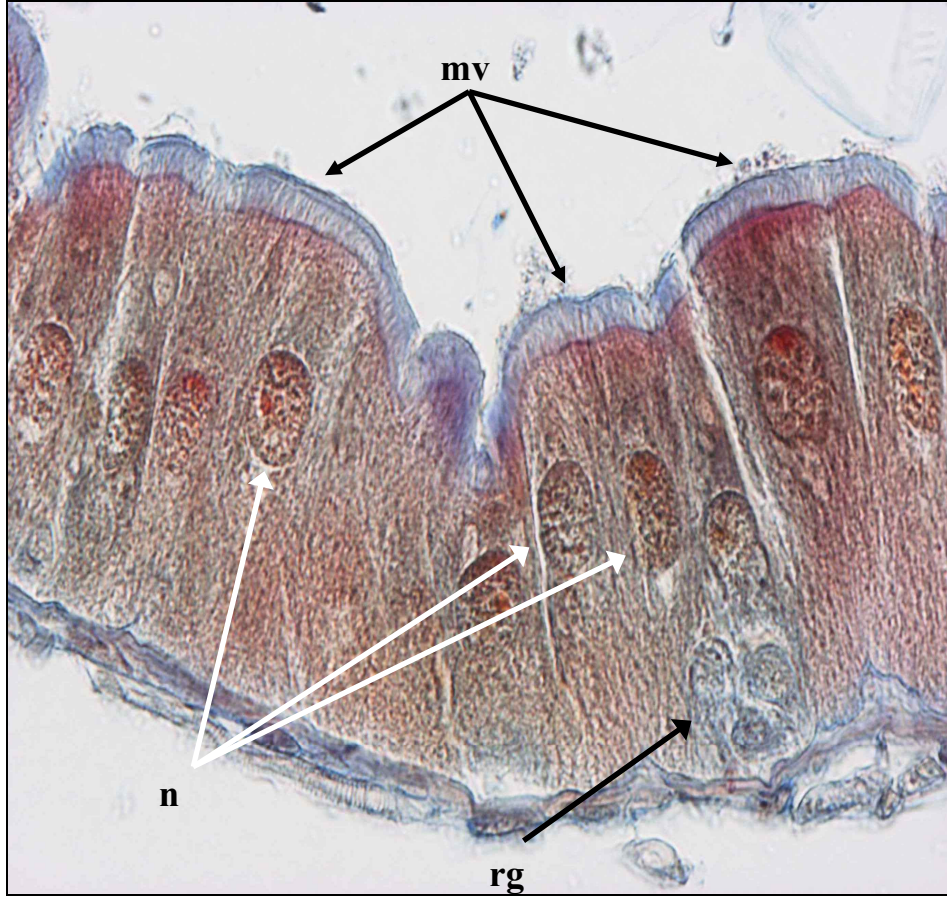
Şekil 1. Kontrol grup *Leptinotarsa decemlineata* (Say) son dönem larvalarında orta barsak hücre yapıları (x1000 immersiyon). mv: mikrovilus, bm: basal membran, n: nükleus.



Şekil 2. Kontrol grup *Leptinotarsa decemlineata* (Say) son dönem larvalarında orta barsak hücre yapıları (x400 obj.). mv: mikrovilus, bm: basal membran, n: nukleus, sc: salgılama.

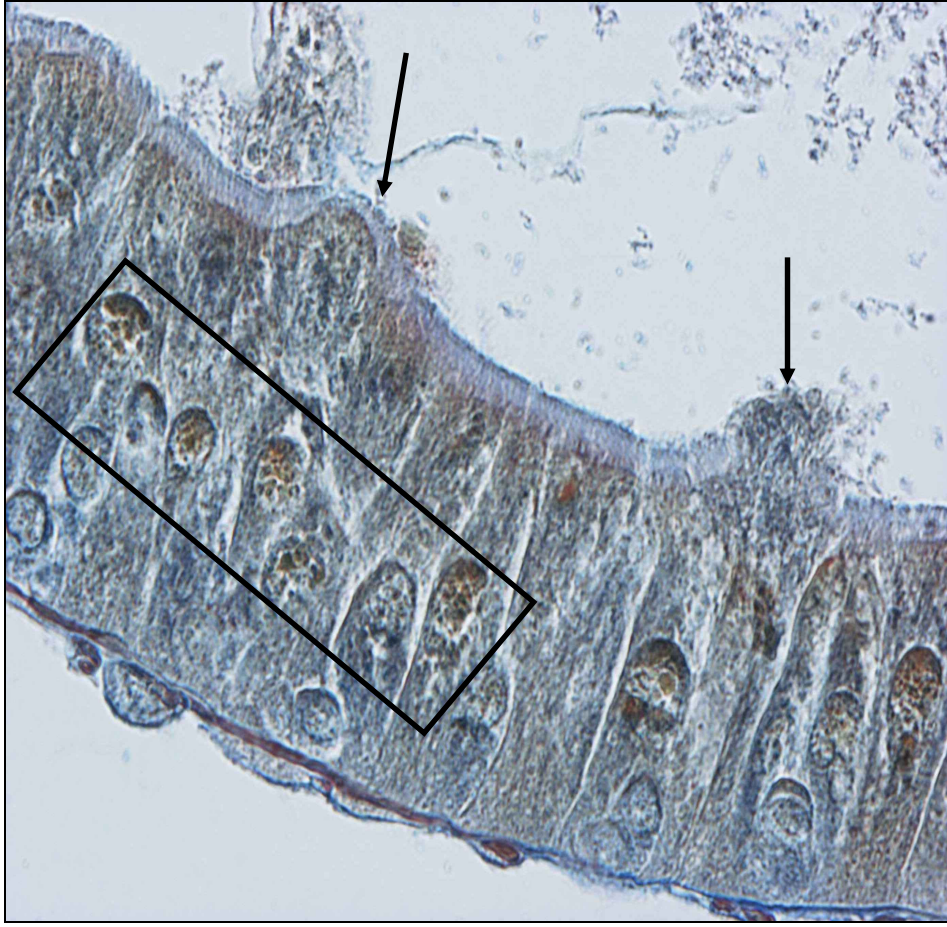
### *Bacillus thuringiensis* uygulaması yapılan bireylerden elde edilen bulgular

Etkinin oluşum sürecini başlangıçtan itibaren izleyebilmek için ilk olarak uygulamadan 2 saat sonra fikse edilmiş örneklerden alınan kesitler incelenmiştir. Bu kesitlerden oluşturulan preparatlarda yapılan incelemelerde ortabarsak hücrelerinin ve çekirdeklerinin sağlıklı hücrelere göre inceliyor, uzamaya başladığı izlenmiştir (Şekil 3). Bulgular toksinin ilk iki saatlik sürede etkisini göstermeye başladığını, ancak bu etkinin henüz barsak içi yapılarda morfolojik bozulmalara sebep olacak düzeyde olmadığını düşündürmüştür. Bunun yanında sağlıklı hücrelerde çok sık görülmeyen hücre yenileme faaliyetinin uygulama yapılmış bu hücrelerin basal membrana bağlandıkları kısımlarda görülmesi, etki sürecinin başladığının bir diğer belirtisi olarak değerlendirilebilir.



Şekil 3. *Leptinotarsa decemlineata* (Say) son dönem larvalarının ortabarsak hücrelerinde *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* uygulamasından 2 saat sonraki etkilenmeler (x400 obj.). mv: mikrovilus, n: nukleus, rg: yenileme hücreleri.

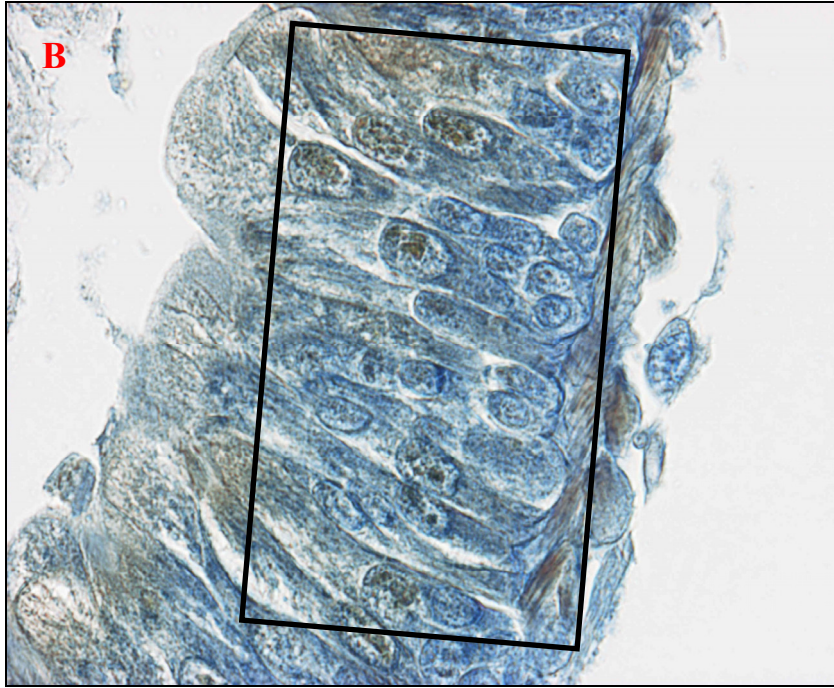
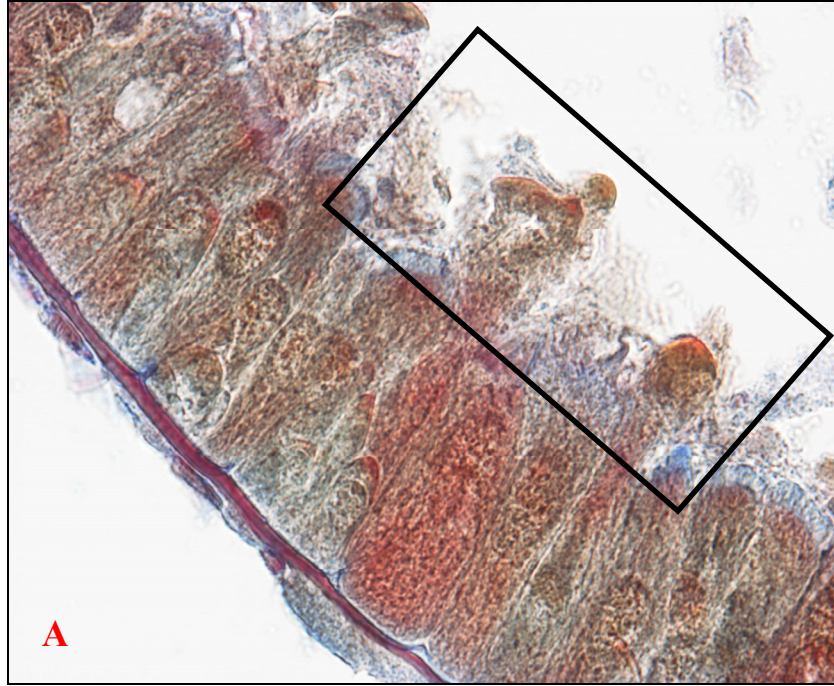
Uygulamadan 4 saat sonra fikse edilen örneklerden elde edilen preparatlarda yapılan incelemelerde etki, hücresel yapılarda daha belirgin olarak izlenmeye başlanmıştır (Şekil 4). Bu belirtilerin en dikkat çekenini ortabarsak hücrelerinin düzenli mikroviluslarının bozulması ve hücreler arası sınırların netliğini kaybetmesi olmuştur. Özellikle Şekil 4'de oklarla gösterilen kısımlarda mikrovilar alanın toksinden etkilenmeye başlamasıyla, hücrelerin zarar görmeye başladıkları izlenmiştir. Bakterinin toksik belirtisinin yanı sıra hücrelerin ve nukleuslarının incelik uzaması şeklindeki diğer tipik belirtisi, uygulamadan sonraki 4. saatte net olarak görülmüştür. Bunun, mikrovilar alanı zarar gören hücrelerin içeriklerinden bazı kayıpların sonucunda oluşabileceği düşünülmüştür. Etkilenmenin olduğu hücrelerde rejenerasyon faaliyetinin hızlandığı ve bazı hücrelerde birden fazla nukleusun meydana geldiği belirlenmiştir.



Şekil 4. *Leptinotarsa decemlineata* (Say) son dönem larvalarının ortabarsak hücrelerinde *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* uygulamasından 4 saat sonra mikrovilar alandaki etkilenmeler (oklar) (x400 obj.).

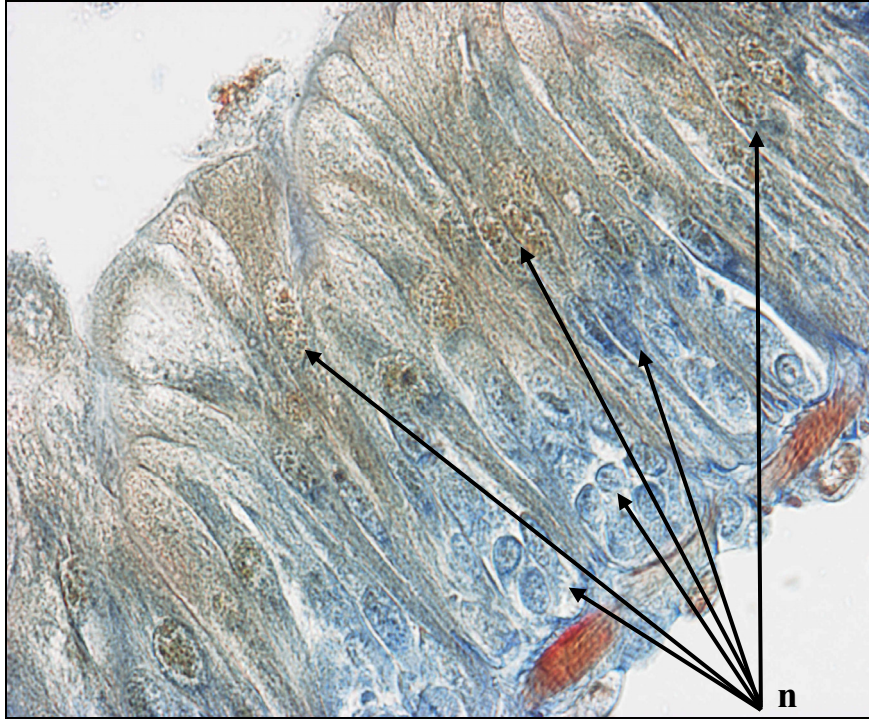
Uygulamadan 6 ve 8 saat sonra yapılan fiksasyonlarda izlenen dokularda ortabarsak hücrelerinin mikrovilar alanlarındaki etkilenmenin arttığı, sindirim ve absorpsiyon için son derece önemli olan bu yapıların parçalanarak barsak içi boşluğa doğru ilerlediği görülmüştür. Bunun yanında zarar gören hücrelerin içeriklerinin de barsak boşluğuna boşalmaya (lysis) başladığı izlenmiştir (Şekil 5A). Bu aşamada içeriği boşalan hücrelerin daha da inceldiği ve bunun sonucunda hücreler arasında boşlukların oluştuğu görülmüştür. Birden fazla sayıda nükleusun bulunduğu hücre sayısının uygulamadan sonraki 8. saat sonunda önemli miktarda arttığı saptanmıştır (Şekil 5B). Bu durumun etki sürecine bağlı olarak rejenerasyon faaliyetinin artması ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür.





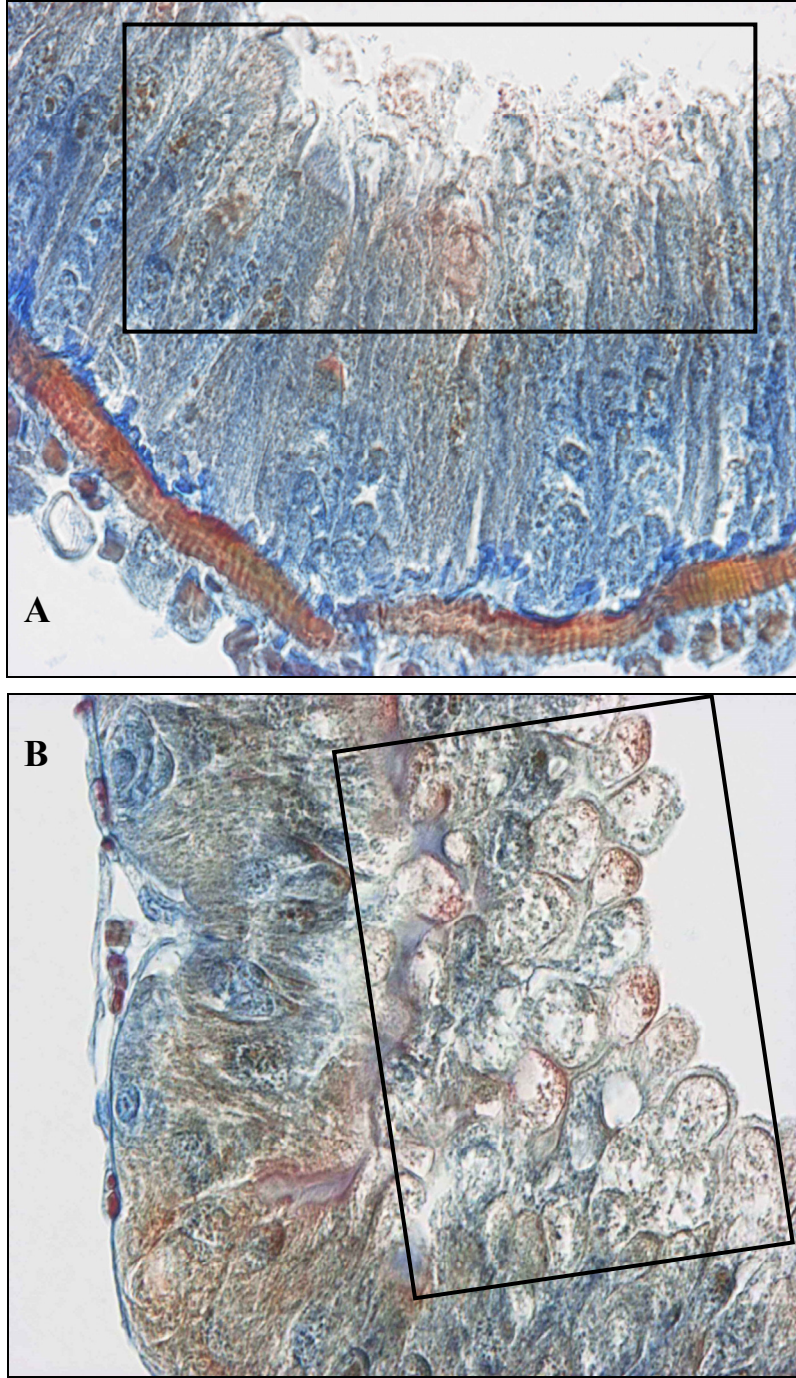
Şekil 5. *Leptinotarsa decemlineata* (Say) son dönem larvalarının ortabarsak hücrelerinde *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* uygulamasından 6 (A) ve 8 (B) saat sonraki etkilenmeler. (A)mikrovilar alandaki etki, (B) çok sayıda nükleus oluşumu (x400 obj.).

Uygulamadan sonraki 12. ve 18. saatlerde fikse edilen örneklerde izlenen yapılarda mikrovilar alanın önemli derecede zarar gördüğü, hücre içeriklerinin boşaldığı ve hücrelerde incelmelerin devam ettiği izlenmiştir. Ayrıca, hücrelerin basal membrana bağlandıkları bölgelerde çok sayıda yeni nükleus oluştuğu ve bu hücrelerin incelik özelliğini kaybetmiş gerçek nükleuslarının da üst kısımlarından barsak boşluğuna doğru bırakıldığı gözlenmiştir. Bazı bölümlerdeki incelmelerin nükleus sınırlarına kadar geldiği ve nükleusun da incelik uzadığı görülmüştür (Şekil 6).



Şekil 6. *Leptinotarsa decemlineata* (Say) son dönem larvalarının ortabarsak hücrelerinde *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* uygulamasından 18 saat sonraki incelik uzayan nükleuslar(oklar) (x400 obj). n: nükleus.

Uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde alınan örneklerde etkinin maksimuma ulaştığı, mikrovilar alanı tamamen yok olan ve tüm içeriğini kaybeden ortabarsak hücrelerinden anlaşılmaktadır. Bu aşamada basal membran üzerindeki hücresel yapılar tamamen yok olmuş durumdadır. Özellikle 48 saate ulaşıldığında etki, basal membran üzerindeki morfolojik yapıların yok olmasına kadar uzayabilmektedir (Şekil 7A ve B). Hücrelerin sadece alt kısımlarının kaldığı, üst kısımlarının ise hava kabarcığı görünümünde boşluklu yapılara dönüştüğü izlenmiştir. Daha önceki kesitlerde hücrelerde izlenen yoğun rejenerasyon faaliyeti de uygulamadan sonraki 24. ve 48. saat sonunda durmuş görünmektedir.



Şekil 7. *Leptinotarsa decemlineata* (Say) son dönem larvalarının ortabarsak hücrelerinde *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* uygulamasından 24 (A) ve 48 (B) saat sonraki etkilenmeler. (A) mikroviluar alanın tamamen yok oluşu, (B)mikrovilar alanda hava kabarcığı şeklindeki oluşumlar (x400 obj.).

Konu ile ilgili değişik araştırıcılar tarafından yapılmış olan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Cavados et al. (2004) tarafından **Simulium pertinax** Kollar (Diptera: Simuliidae) larvaları üzerinde **Bacillus thuringiensis** serovar **israelensis** ile yapılan çalışmada da özellikle uygulamadan 2 saat sonra izlenmeye başlanan etkiler 4. saat sonunda daha net olarak görülmüştür. Bu çalışmada da hücrelerde mikrovilar alandaki bozulmayı hücre içeriklerinin kaybı, buna bağlı rejenerasyon faaliyeti ve sonuçta hücrelerde hava boşluklarına kadar uzanan belirtiler izlenmiştir. Bauer & Pankratz (1992) tarafından **Bacillus thuringiensis** var. **san diego**' nun **Chrysomela scripta** F. (Coleoptera: Chrysomelidae) ortabarsak hücrelerine etkisi konusunda yapılan çalışmada etki 2 saat sonunda görülmeye başlanmış ve bunu takip eden saatlerde artarak sürmüştür. Griego et al. (1980) tarafından **Manduca sexta** (L.) (Lepidoptera: Sphingidae)'nın ortabarsağı üzerinde **B. thuringiensis** toksinlerinin etkileri konusunda yapılan çalışmada elde ettiği sonuçlar bu çalışmada elde edilen sonuçlarla paralellik göstermiştir. Söz konusu çalışmada da bu çalışmada olduğu gibi toksin, uygulanmasından 1 saat sonra ortabarsak epitelinde bir etki göstermezken, 4. saatin sonunda etki net olarak izlenebilmiştir. Coyle et al. (2000)'in yine Novodor preparatı ile yaptığı etkililik denemelerinde uygulamadan sonraki 24 ile 72 saatlerde ölüm etkisi saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda da toksinin ilk iki saate başlayan etkileri sonraki 4. ve 6. saatlerde daha belirgin hale gelmiştir. Bunu takip eden saatlerde hücresel yapılarla kayıplara sebep olabilecek şiddete ulaşan etki yukarıda belirtilen çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermiştir. Bu sonuçlar konuyla ilgili Yunovitz et al. (1986), Escriche et al. (1997) ve Rausell et al. (2000) gibi değişik araştırıcıların yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri sonuçlarla da paralellik göstermiştir.

## zet

Bu çalışmada, gram pozitif bir bakteri olan **Bacillus thuringiensis** var. **tenebrionis**'in protein yapıdaki kristal formlarda olan insektisit etkili  $\delta$ -endotoksinin etki mekanizması detaylandırılmaya çalışılmıştır.

Patates böceği **Leptinotarsa decemlineata** (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae)'nın son dönem larvalarına uygulanan bakterinin sindirim sisteminde oluşturduğu etkiler orta barsak hücreleri üzerinde izlenmiştir. Son döneme yeni geçmiş bir grup larva bakteri ırkının ticari formülasyonu Novodor FC ile önerilen dozda muamele edilmiş patates yaprakları ile beslenirken diğer grup kontrol bireylerini elde etmek amacıyla saf su uygulanmış yapraklarla beslenmiştir. Fiksasyonlar uygulamayı takip eden 12 saatlik dönemde 2 saatlik, sonraki 12 saatlik dönemde 6 saatlik periyotlarda yapılmıştır. Sonraki 24 saatte de fiksasyon süreleri 12 saate yükseltilmiştir. Fikse edilen örneklerden histolojik yöntemlerle hazırlanan preparatlardan izlenen sonuçlara göre bakterinin etkisi beslenmenin başlangıcını takip eden 2. saatin sonunda oluşmaya başlamıştır. 4. ve 6. saatler sonunda daha net görülebilen etki,

izleyen 8, 10 ile 12. saatler de giderek yaygınlaşmış ve şiddetlenmiştir. Özellikle beslenmenin başlangıcından 12 saat sonra ve izleyen saatlerde ortabarsak hücrelerinde ve mikrovillar alandaki etkinin en üst seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir.

## Teşekkür

Çalışmamızı 2002-ZRF-004 no' lu proje olarak destekleyen Ege Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna ve Çek Cumhuriyeti Bilimler Akademisi, Entomoloji Enstitüsü araştırmacılarından Prof. Dr. Frantisek SEHNAL'a elde edilen kesitlerin değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

## Yararlanılan Kaynaklar

- Apaydın, Ö., A. F. Yenidünya, Ş. Harsa & H. Güneş, 2005. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **21**: 285-292.
- Bauer, L.S. & H. S. Pankratz, 1992. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. **Journal of Invertebrate Pathology**, **60**: 15-25
- Billingsley, P. F., & M. J. Lehane, 1996. Structure and ultrastructure of the insect midgut. Lehane, M. J. and P. F. Billingsley (Ed.), *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London. First Edition. p. 3-31.
- Carroll, J., Damme, J.-van., Boets, A., Rie, J.-van. & D. J. Ellar, 1997. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A Delta- endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. **Journal of Invertebrate Pathology**, **70** (1): 41-49.
- Cavados, C. F. G, S. Majerowicz, J. Q. Chaves, C. J. P. C. Araújo-Coutinho & L. Rabinovitch, 2004. Histopathological and ultrastructural effects of  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera: Simuliidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **99**, no.5, pp.:493-498
- Coyle, D. R., J. D. Mc Millin, S. C. Krause & E. R. Hart, 2000. Laboratory and field evaluations of two *Bacillus thuringiensis* formulations, Novodor and Raven, for control of cottonwood leaf beetle (Coleoptera; Chrysomelidae). **J. Econ. Entomol.**, **93** (3):713-720.
- Escriche, B., N. De Decker, J. Van Rie, P. Steels & E. Van Kerkhove, 1997. Electrophysiological effects of  $\delta$ -endotoxins on a cell model. *International Molecular and Cell Physiology Conference on Ion Transportation and Regulation of Cellular Function Proceedings*, Liverpool, U.K., March 15-16.
- Griego, V.M., L.J. Fancher & K.D. Spence, 1980. Scanning electron microscopy of the disruption of Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*, midgut by *Bacillus thuringiensis* endotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, **35**: 186-189.
- Huger, A. M., A. Krieg, G. A. Langenbruch & W. Schnetter, 1986. Discovery of a new strain of *Bacillus thuringiensis* effective against Coleoptera. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft**, **233**: 83-96.

- Küpelioğlu A. A. & H. U. Pabuçcuoğlu, 1995. Patoloji ve sitopatoloji laboratuvar teknikleri. Dokuz Eylöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yöekokulu Yayınları, Yayın No:3, İzmir, 121s.
- Ozban, N. 1982. Mikropreparasyon Yöntemleri. İstanbul Üniversitesi Yayınları. Sayı: 2984, Fen Faköltesi Basım Evi, No: 170, 141 s.
- Rausell, C., N. De Decker, I. Garcia-Robles, B. Escriche, E. Van Kerkhove, M. D. Real & A.C. Martinez-Ramirez, 2000. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins on the midgut of nun moth, *Lymantria monacha*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **75**: 288-291.
- Sekendiz, O. A., 1979. Entomoloji çalışmalarında histoloji laboratuvarı tekniği. Karadeniz Teknik Üniversitesi Basım Evi, Genel Yayın No: 113, Orman Faköltesi Yayın No: 7, 65s.
- Turanlı, F. & ř. Kismalı, 2002. *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) nin larva dönemlerine uygulanan *Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis* in sindirim sistemi üzerindeki etkileri. **Türk. entomol. derg.**, **26** (3): 209-227.
- Whalon, M. E. & B. A. Wingerd, 2003. Bt: Mode of action and use. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, **54**: 200-211.
- Yunovitz, H., B. Sneh, S. Schuster, U. Oron, M. Broza & A. Yawetz, 1986. A sensitive method for determining the toxicity of a highly purified fraction from  $\delta$ - endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus* on isolated larval midgut of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, **48**: 223-231.