

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

Haluk ÖZPARLAK, Burçin BAKAR, Sadettin ÜNSAL
Abdurrahman AKTÜMSEK

Selçuk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya

ÖZET

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

Anahtar Kelimeler: *Galleria mellonella*, Büyük Kovan Güvesi, Teflubenzuron, Kütiküla.

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

ABSTRACT

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

Key Words: *Galleria mellonella*, Greater Wax Moth, Teflubenzuron, Cuticle.

1. GİRİŞ

Günümüzde zararlı böcek türlerine karşı, tarla ve depo şartlarında çok sayıda doğal ve sentetik insektisit kullanılmaktadır. Olumsuz etkilerinden dolayı günümüzde çevreye ve hedef olmayan canlılara daha az toksik olan insektisitlerin önemi artmaktadır. Bu sebeple böceklerde metamorfozu ve deri değiştirmeyi bozarak ölüme yol açan böcek büyüme regülatörleri ve özellikle bu gruba dahil kitin sentez inhibitörleri büyük önem kazanmaktadır [1]. Benzoyilüre (benzoyilfenilüre, asilüre) grubu insektisitler kitin sentez inhibitörü olarak özellikle böcekler üzerinde etki etmekte olup, balıklara, kuşlara ve memelilere nispeten düşük bir toksisiteye sahiptirler [2].

Pek çok insektisit biyokimyasal açıdan nöro-toksik etki gösterirken benzoyilüre grubuna giren insektisitler ise, deri değiştirme siklusu boyunca normal kütikülanın sentezini ve birikmesini önleyerek etkili olmaktadır. Bu etki şekli kütikülanın kimyasıyla ilgilidir çünkü prokütikülanın %20-50'si kitinden oluşmaktadır [3]. Reynolds [4], son yıllarda pek çok entomolog araştırmacının zararlı böceklerin kütikülalarının önemli bir kısmını ve bağırsak epitelinin koruyan peritrofik zarın esasını meydana getiren kitinin, sentezlenmesinin benzoyilüre grubu insektisitler ile engellenmesi sayesinde zararlı böceklerin kontrol altına alınabileceğini ifade ettiklerini bildirmiştir.

Halk arasında “kovan güvesi” olarak bilinen *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) arı kovanlarında ve depolarda özellikle larval evrede petekleri yiyerek büyük zarar vermektedirler [5]. Larval devrede yedi evre geçiren *G. mellonella* larvaları son iki evrede maksimum büyüklüğe ulaşarak olgunlaşırlar. Olgunlaşan son evre larvaları çevrelerine koza öreerek pupa devresine geçerler. Pupalardan da ergin kelebekler oluşur [6].

Bu çalışmada bir kitin sentezi inhibitörü olan teflubenzuronun [1-(3, 5-dichloro-2, 4-difluorophenyl)-3-(2, 6-difluorobenzoyl) urea], ön çalışmalarla tespit edilen 1000 ppm ve bunun azalan değerleri olan 500 ve 250 ppm'lik dozlarının *G. mellonella* beşinci evre larval kütikülası üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Teflubenzuronun kütiküla birikimi üzerindeki etkilerine ait bulguların zararlı böcek mücadelesinde kullanılabilmesi ümit edilmektedir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

Bu araştırmada etkin maddesi teflubenzuron olan Nomolt 50 SC kullanıldı. Denemelerde kullanılan *G. mellonella* larvaları %78 bağıl nem ve tamamen

karanlık olan $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'deki bir inkübatör içerisinde cam kavanozlarda yetiştirilip yarı sentetik besinle (600 g bal + 492 g gliserol + 120 g bal peteği + 1200 g kepek) beslendi [7].

2.2 Yöntem

Mide yoluyla daha etkili bir insektisit olduğu için, bu çalışmada teflubenzuron yarı sentetik besine karıştırılarak oral yolla uygulandı. Denemeler üç tekrar üzerinden gerçekleştirildi. Dördüncü deriyi yeni değiştirmiş beşinci evrenin ilk saatleri içindeki koyulaşmamış tanenleşmemiş) 480 adet *G. mellonella* larvası seçildi. Teflubenzuron uygulamasından önce ayrı bir yere alınan bu larvalar besini aynı derecede yemelerinin sağlanması için yaklaşık 18 saat boyunca aç bırakıldı. Distile suyla seyreltilen teflubenzuron süspansiyonları 1000, 500 ve 250 ppm konsantrasyonlarında 20 g yarı sentetik besin ile iyice karıştırıldı. Kontrol grubunun besinine ise sadece distile su karıştırıldı. Hazırlanan karışımlar cam kavanozlara konuldu, her kavanoza 40 adet larva yerleştirildi ve inkübe edildi. Teflubenzuron ihtiva eden ve ihtiva etmeyen besin larvalara verilmeden önce besine karıştırılan suyun buharlaşması ve teflubenzuronun olabilecek repellent etkisinin ortadan kalkması için larvalara bir saat sonra verildi.

Uygulamadan sonra 12., 24., 36., 48., 60., 72., 84., 96., 108., 120., 132., 144., 156. ve 168. saatlerde özellikle teflubenzurondan etkilenmiş (renk koyulaşması meydana gelen) birer adet larva numune olarak alındı. Ölümünden dolayı meydana gelebilecek histopatolojik değişikliklerden sakınmak için ölen larvalar dikkate alınmadı. Numune olarak alınan larvalar eterle bayıldıktan sonra baş ve son kısımları kesildi. Larvalar nötr formol veya Bouin çözeltilisinde tesbit edildi. Tüm numuneler dehidrasyon işlemlerinden sonra ksilolde saydamlaştırıldı ve parafin bloklar yapıldı. Bloklanmış numunelerden Reichert-Jung marka mikrotomla 7 μm kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitler hematoksilin-eozin ve Crossman modifikasyonu üçlü boyama ile boyandı.

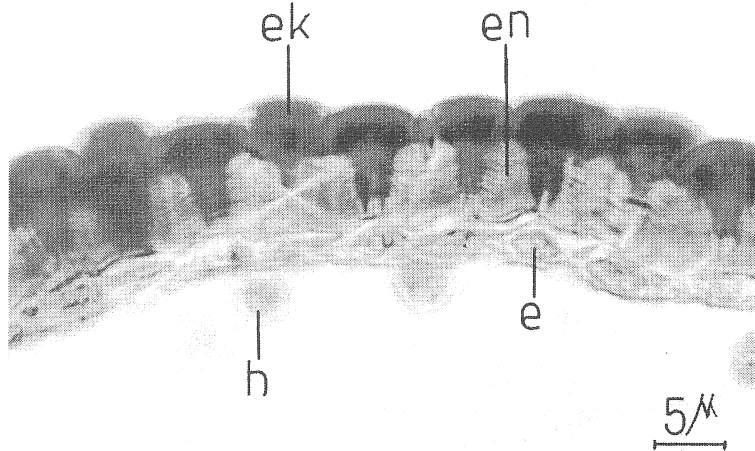
Belirtilen saatlerde alınan numunelerden hazırlanan histolojik kesitlerde ışık mikroskobu yardımıyla her numuneden en az beş adet olmak üzere abdomen bölgesine ait kütikula kalınlık ölçüsü alınarak aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesap edildi. Kontrol ve teflubenzuron uygulanan gruplara ait beşinci evre larvalarının kütikula kalınlık ölçülerine ait ortalamaların karşılaştırılması için varyans analizi ve farklı grupların belirlenmesi için Duncan testi Mstat istatistik programında (5.0 Versiyonu) uygulandı.

3. BULGULAR

3.1 Kontrol Grubu, Beşinci Evre *Galleria mellonella* L. Larvalarına Ait Gözlemler

Beşinci evreye yeni geçmiş (dördüncü deriyi yeni değiştirmiş) larvalara ait yeni kütikula makroskopik olarak beyazımsı açık sarı renkte, ince yumrulara sahip ve parlak bir zar gibi görülür.

G. mellonella'da integüment, tek sıralı yassı hücrelerden oluşan epidermis ile bu hücrelerin salgısından meydana gelen kütiküladan oluşmuştur. 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. Beşinci deriyi değiştirmeden önce epidermal hücreler prizmatikleşerek yeni kütikülayı (altıncı evre kütikulasını) salgılamaya başlamıştır. Deri değiştirmeyi takip eden 2-3 saat içinde baş kapsülünde ve yeni deride koyulaşma ve kısmen sertleşme başlamıştır.

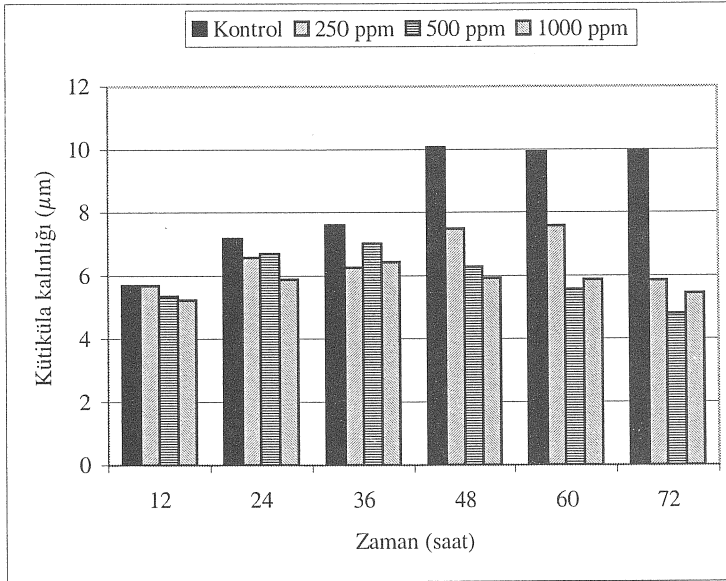


Şekil 1. Beşinci evre *G. mellonella* larvasının karakteristik integüment yapısı. ek:ekzokütikula, en:endokütikula, e:epidermis, h:hemosit (Crossman modifikasyonu üçlü boyama).

Denemelerde histolojik kesitler için numune olarak alınmayan kontrol grubu larvalarının gelişimi izlenmeye devam edilmiştir. Altıncı evreye geçen larvalar gelişimlerine devam ederek yedinci evreye ulaşmışlardır. Bu larvaların ölen birkaç tanesi dışında tamamının pupa devresine ulaştığı ve ergin kelebeklere dönüştüğü gözlenmiştir.

3.2 Kontrol Grubu, Beşinci Evre *Galleria mellonella* L. Larvalarına Ait Kütikula Kalınlık Ölçümleri

Beşinci evre kontrol grubu larvalarına ait histolojik kesitlerden alınan kütikula kalınlık ölçümleri Tablo 1’de, bu değerlere ait ortalama kütikula kalınlık ölçümleri ise Şekil 2’deki histogramda görülmektedir. Şekil 2’deki histogramda açıkça görülebileceği gibi zamana bağlı olarak kontrol grubu larvalarında kütikula kalınlığında belirgin bir artış olmuştur. Tablo 1’de görüldüğü gibi kontrol grubuna ait larvaların 96. ve 108. saatte deri değiştirerek bir üst evre olan altıncı evreye geçmiş olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu larvalarına ait altıncı evre kütikulasındaki kalınlık artışı da, Tablo 1’de görülebileceği gibi devam etmiştir.



Şekil 2. Kontrol grubu ve teflubenzuron uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının zamana bağlı ortalama kütikula kalınlık ölçülerini gösteren histogram.

Tablo 1. Kontrol grubu ile 250, 500 ve 1000 ppm teflubenzuron uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının kütikula kalınlıklarına (μm) ait birinci, ikinci ve üçüncü tekrerrür değerleri [* 5. evreye ait kütikula kalınlığı, # 5. ve 6. evreye ait kütikula bir arada (yeni kütikülaya ait değer), ** 6. evreye ait kütikula kalınlığı, - %100 ölüm gerçekleştiği için değer yok]

Dozlar/ Saatler	Kontrol	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	
	A.O. \pm S.S.	A.O. \pm S.S.	A.O. \pm S.S.	A.O. \pm S.S.	
Birinci tekrerrür sonuçları	12	5.40 \pm 1.10*	6.26 \pm 0.79*	5.18 \pm 1.02*	5.18 \pm 0.48*
	24	7.49 \pm 0.64*	6.62 \pm 0.30*	6.16 \pm 0.77*	5.40 \pm 0.76*
	36	7.70 \pm 0.47*	6.68 \pm 0.37*	5.62 \pm 0.48*	5.76 \pm 0.91*
	48	8.50 \pm 2.12*	7.38 \pm 0.75*	6.88 \pm 0.45*	6.23 \pm 0.47*
	60	10.44 \pm 0.49*	8.06 \pm 0.64*	5.40 \pm 0.99*	6.59 \pm 0.35*
	72	11.48 \pm 0.39*	8.28 \pm 0.40*	6.77 \pm 0.39*	7.49 \pm 0.39*
	84	8.28 \pm 0.75*	2.70 \pm 0.64#	3.46 \pm 0.60#	2.81 \pm 0.64#
	96	8.21 \pm 0.78*	2.88 \pm 0.75#	4.86 \pm 1.21#	2.02 \pm 0.48#
	108	4.50 \pm 0.64**	2.34 \pm 0.80#	2.59 \pm 0.78#	3.31 \pm 0.39#
	120	6.98 \pm 0.94**	4.61 \pm 0.45#	6.52 \pm 0.39#	4.18 \pm 1.08#
	132	6.95 \pm 1.09**	5.36 \pm 0.70#	4.86 \pm 0.80#	2.52 \pm 1.11#
	144	7.88 \pm 0.39**	5.18 \pm 0.48**	3.24 \pm 0.80#	4.81 \pm 1.10#
	156	8.82 \pm 1.17**	5.94 \pm 0.49**	-	-
	168	9.00 \pm 0.90**	-	-	-
İkinci tekrerrür sonuçları	12	6.48 \pm 0.75*	6.05 \pm 0.63*	6.52 \pm 0.39*	5.58 \pm 0.86*
	24	7.11 \pm 0.67*	7.02 \pm 0.65*	7.74 \pm 0.49*	6.70 \pm 0.47*
	36	6.87 \pm 0.45*	6.70 \pm 0.47*	7.92 \pm 0.75*	6.73 \pm 0.43*
	48	10.40 \pm 0.97*	7.74 \pm 1.03*	7.74 \pm 0.49*	4.32 \pm 0.75*
	60	11.27 \pm 0.43*	7.48 \pm 0.71*	6.82 \pm 0.75*	3.92 \pm 0.45*
	72	10.08 \pm 0.75*	3.92 \pm 0.45*	3.78 \pm 0.40*	2.92 \pm 0.75*
	84	8.96 \pm 1.30*	2.92 \pm 0.75#	3.13 \pm 0.43#	2.34 \pm 0.49#
	96	8.37 \pm 0.01*	2.02 \pm 0.48#	3.31 \pm 0.39#	3.56 \pm 0.57#
	108	5.22 \pm 0.75**	3.56 \pm 0.57#	3.74 \pm 0.32#	3.31 \pm 0.39#
	120	6.41 \pm 0.64**	3.42 \pm 0.40#	4.61 \pm 0.78#	4.24 \pm 0.80#
	132	4.43 \pm 0.64**	4.39 \pm 0.64#	4.82 \pm 0.53#	3.88 \pm 0.40#
	144	3.17 \pm 0.40**	4.25 \pm 0.37#	4.03 \pm 0.39#	3.49 \pm 0.47#
	156	7.85 \pm 0.74**	5.72 \pm 0.97**	-	-
	168	11.12 \pm 0.49**	-	-	-
Üçüncü tekrerrür sonuçları	12	5.22 \pm 0.99*	4.79 \pm 0.56*	4.39 \pm 0.10*	4.96 \pm 0.60*
	24	6.91 \pm 0.39*	6.08 \pm 0.41*	6.19 \pm 0.45*	5.54 \pm 0.82*
	36	8.21 \pm 0.45*	5.40 \pm 0.64*	7.49 \pm 0.39*	6.80 \pm 0.97*
	48	11.27 \pm 0.43*	7.34 \pm 0.32*	4.18 \pm 0.39*	7.20 \pm 0.51*
	60	8.06 \pm 0.90*	7.20 \pm 0.51*	4.46 \pm 0.87*	7.07 \pm 0.32*
	72	8.28 \pm 0.99*	5.34 \pm 0.32*	3.88 \pm 0.39*	5.94 \pm 0.49*
	84	10.08 \pm 1.17*	3.02 \pm 0.53*	4.07 \pm 0.35#	5.21 \pm 0.78#
	96	4.46 \pm 0.90#	1.94 \pm 0.32#	4.82 \pm 0.53#	7.92 \pm 0.75#
	108	5.44 \pm 0.70**	3.20 \pm 0.55#	4.97 \pm 0.59#	2.60 \pm 0.78#
	120	5.94 \pm 0.80**	3.74 \pm 0.32#	4.79 \pm 0.56#	4.61 \pm 0.45#
	132	6.55 \pm 0.37**	4.25 \pm 0.37#	4.36 \pm 0.08#	6.08 \pm 0.39#
	144	7.67 \pm 0.43**	4.07 \pm 0.43#	3.96 \pm 0.49#	6.26 \pm 0.20#
	156	5.90 \pm 1.44**	3.13 \pm 0.43#	5.94 \pm 0.80#	2.34 \pm 0.49#
	168	8.46 \pm 1.36**	5.22 \pm 0.75**	-	-

3.3 Teflubenzuronun İntegüment Üzerindeki Etkileri

Teflubenzuronun uygulanan 250, 500 ve 1000 ppm'lik dozları, *G. mellonella* larvalarının integümentinde 36. saatten itibaren aşırı koyulaşmaya ve kararmaya sebep olmuştur. Ayrıca bu larvalarda kontrol grubundaki gibi sağlıklı gelişme gözlenmemiş, hareketsizlik ve ilerleyen saatlerde kanama görülmüştür. Histolojik kesit hazırlamak için belirtilen saatlerde alınan numuneler özellikle bu şekilde etkilenmiş larvalardan seçilmiştir. Ancak bu numunelerin preparasyon ve boyama işlemlerinde güçlükler çekilmiştir. Bu durum muhtemelen teflubenzuronun sebep olduğu patolojik etkilerle ilişkilidir. Ayrıca teflubenzuron uygulanan numunelere ait histolojik preparatlarda, kontrol grubunda bariz olarak görülen endokütikular lameller belirgin olarak gözlenememiştir.

Teflubenzuronun *G. mellonella* larvaları integümenti üzerinde gözlenen bir diğer etkisi de deri değiştirme sürecini bozması ve süre olarak uzatmasıdır. Tablo 1'de beşinci ve altıncı 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 beşinci ve altıncı evre kütikülalarının bir arada bulunduğu anı histolojik kesitlerde gözlemek çok zor olmuştur. Ancak teflubenzuron uygulanan larvalarda deri değiştirme engellendiği ve eski kütikula atılmadığı için histolojik kesitlerde bu olay sürekli gözlenebilmiştir.

Ekdisis anı, yani eski ve yeni kütikulanın bir arada bulunduğu safha histolojik kesitlerde her üç dozda da 84. saatten itibaren 156. saate kadar gözlenebilmiştir (Tablo 1). Dolayısıyla deri değiştirme süreci bozulmuş, teflubenzuronun etkisiyle kontrol grubuna kıyasla uzamıştır. 500 ve 1000 ppm'lik dozlarda 168. saatte her üç denemede de larvaların tamamı öldüğü için numune alınamamış ve değerlendirme yapılamamıştır. Kontrol grubu larvalarında olduğu gibi, teflubenzuron uygulanan ve denemelerde histolojik kesitler için numune olarak alınmayan larvaların gelişimi de izlenmeye devam edilmiştir. 250 ppm teflubenzuron uygulanan larvaların bir kısmı pupa devresine ulaşmış, fakat hiçbirisi sağlıklı ergin kelebek oluşturamamıştır. 500 ve 1000 ppm teflubenzuron uygulanan larvaların hiçbirisi pupa devresine ulaşmamış ve ölmüştür. Bu durum teflubenzuronun uzun süreli insektisit etkisini ispatlamaktadır.

3.4 Teflubenzuronun Kütikula Kalınlığı Üzerindeki Etkileri

250, 500 ve 1000 ppm teflubenzuron uygulanan larvalara ait histolojik kesitlerden yapılan kütikula kalınlık ölçümleri Tablo 1'de ve bu değerlere ait ortalama kütikula kalınlık ölçümleri ise Şekil 2'deki histogramda

görülmektedir. Tablo 1’de görüldüğü gibi kontrol grubu larvaları 96. saatten itibaren altıncı evreye geçmeye başlamıştır. Ancak kontrol grubuna ait kütikula kalınlık ölçümleri ile teflubenzuron uygulanan larvaların kütikula kalınlık ölçümlerini sağlıklı bir şekilde kıyaslayabilmek için beşinci evre kütikula kalınlığı olarak ilk 72 saat değerleri kabul edilmiştir.

Elde edilen kütikula kalınlıklarına ait değerlerin belirtilen her saat için grup ortalamaları varyans analizi ile karşılaştırılmış ve gruplar arasındaki fark Duncan testi ile değerlendirilmiştir (Tablo 2). Tablo 2’deki istatistiki sonuçlarda görüldüğü gibi, uygulanan teflubenzuron 12., 24. ve 36. saatte her üç dozda da kontrol grubuna kıyasla kütikula kalınlığı üzerinde etkili olmamıştır. 48. ve 60. saatlerde 500 ve 1000 ppm’lik dozlardaki teflubenzuron kontrol grubuna göre kütikula kalınlığı üzerinde istatistiki yönden önemli azalmaya sebep olmuştur. Bu saatlerde 250 ppm’lik doz etkisizdir. 72. saatte ise her üç dozun kütikula kalınlığı üzerinde kontrol grubuna göre önemli miktarda azalmaya sebep olduğu görülmektedir. Özellikle 72. saatte, her üç doz kontrol grubuna kıyasla kütikula kalınlığında yaklaşık olarak %50 oranında incelmeye sebep olmuştur. Bununla birlikte 48. 60. ve 72. saatlerde kullanılan dozlar arasında istatistiki yönden önemli fark olmaması ilginçtir. Kullanılan dozlar kütikülada birbirine yakın oranda azalmaya sebep olmuştur. Bu durum, kullanılan dozların birbirine yakın derecede kitin sentezi inhibisyonuna sebep olduğu ve kütikulanın normal şekilde salgılanmadığı şeklinde açıklanabilir.

Tablo 2. Duncan 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	5.70 ± 0.68 a	5.70 ± 0.80 a	5.36 ± 1.08 a	5.24 ± 0.31 a
24	7.17 ± 0.29 a	6.57 ± 0.47 a	6.70 ± 0.90 a	5.88 ± 0.71 a
36	7.59 ± 0.68 a	6.26 ± 0.75 a	7.01 ± 1.12 a	6.43 ± 0.58 a
48	10.06 ± 1.48 a	7.49 ± 0.22 ab	6.27 ± 1.86 b	5.92 ± 1.47 b
60	9.92 ± 1.66 a	7.58 ± 0.44 ab	5.56 ± 1.19 b	5.86 ± 1.70 b
72	9.95 ± 1.60 a	5.85 ± 2.22 b	4.81 ± 1.70 b	5.45 ± 2.32 b

Aynı harf bulunduran ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir (p<0.05).

Tablo 1’de bazı saatlerde, yüksek dozda daha düşük doza oranla, daha az incelme gözlenmiştir. Örneğin; Tablo 1’de görüldüğü gibi üçüncü denemede, 48. saatte 500 ppm’lik dozda kütikula kalınlığı 4.18 µm iken, 1000 ppm’lik dozda 7.20 µm’dir. Yani yüksek dozda daha az incelme gerçekleşmiştir. Bu numunelerin ait olduğu larvalar besini aynı anda ve aynı miktarda yememiş olabilir. Diğer bir faktörde, larvaların besini yeme süratlerindeki farklılıklar ve besini sevmeye yada sevmeme şeklindeki farklı davranışları olarak açıklanabilir.

250 ppm teflubenzuron uygulanan ancak bir üst evreye geçmeyi başaramış larvaların altıncı evre kütikula kalınlıklarına bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla yine bariz bir azalma görülmüştür (Tablo 1). Bu durum teflubenzuronun uzun süreli insektisit etkisinin devam ettiğini gösterir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada kontrol grubuna ait sağlıklı *G. mellonella* larvalarının integüment yapısına ait gözlemler benzer çalışmalarla uyumludur [6,7]. Kontrol grubu larvalarında kütikülada zamana bağlı olarak meydana gelen kalınlık artışı ise, değişik böcek türleri üzerinde yapılan çalışmalarda prokütikülaya lamel ilavesi şeklinde açıklanmıştır [8,9,10].

Teflubenzuronun *G. mellonella* larvalarında kütikülada sebep olduğu kararma ve kanamaya ait gözlemler, kitin sentez inhibitörü diflubenzuronun (DFB) *G. mellonella*, *Manduca* ve *Agrotis segetum* (Denis et. Schiff) larvalarının kütikülasında sebep olduğu çatlamalara, kararmaya ve hemolenf kaybına benzerlik göstermektedir [5,7,11,12].

Denemelerde kullanılan teflubenzuron kontrol grubuna kıyasla kütikula kalınlığı üzerinde özellikle 72. saatte yaklaşık olarak %50 oranında azalmaya sebep olmuştur. Ancak dozlar arasında etki bakımından istatistiki fark olmaması dikkat çekicidir. Kütikülada meydana gelen incelme teflubenzuronun kütikula salgılanması üzerindeki etkisini gösterir. Bu durum, teflubenzuronun kitin sentezini inhibe etmesi ve kütikülaya prokütikular lamel ilavesini bozması şeklinde açıklanabilir. *Mamestra brassicae* L. larvaları üzerinde topikal ve *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvaları üzerinde besin yoluyla uygulanan teflubenzuron kütikülada kitin sentezini sırasıyla %90 ve %50 oranında inhibe etmiştir [13,14]. *S. littoralis* larvalarına topikal olarak teflubenzuron, flufenoxuron ve DFB uygulanmış, her üçünün de kütikülada kitin birikiminde benzer şekilde azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir [9].

Teflubenzuronun böceklerde kütikula kalınlığı üzerindeki etkisine dair literatür bilgisine rastlanmamış ancak benzer şekilde yapılan çalışmalarda, beşinci evre *G. mellonella* larvaları üzerinde besine karıştırma yoluyla uygulanan 1000, 500 ve 250 ppm DFB'un kütikula kalınlığı üzerinde 12. saatten itibaren incelmeye sebep olduğu ve kullanılan üç doz arasında etki bakımından fark olmadığı tespit edilmiştir [6]. DFB enjekte edilen ergin çekirgelerin kütikula kalınlığı sağlıklı çekirge kütikula kalınlığının sadece 1/7'si kadar olabilmıştır [15]. *Chilo suppressalis*'in kültüre alınmış integümenti üzerinde yapılan çalışmada, kitin sentez inhibitörü olarak PH 60-38'in kontrol grubunda 5.4 μm olan kütikula kalınlığını 0.7 μm 'ye ve polyoxin D'nin kontrol grubunda 5.6 μm olan kütikula kalınlığını 0.4 μm 'ye indirdiği gözlenmiştir. Yeni kütikula kalınlığındaki bu indirgenme kitin öncüllerinden kitin sentezlenmesinin inhibe edilmesine bağlanmıştır [16]. Topikal yolla yeni deri değiştirmiş beşinci evre *Manduca* larvalarına uygulanan DFB kütikula birikim oranını etkilemiş, kontrol grubuna kıyasla kütikula kalınlığını, 1/3 oranında azaltmıştır [11]. Benzoylfenilüre grubundan 2,6-difluoro- ve 2,6-dichloro-benzoyl-4-chlorophenylurea'nin çok düşük konsantrasyonlarının bile kültüre edilmiş *C. suppressalis* integümentinde, yeni kütikular büyümeyi kontrol grubuna kıyasla %50 oranında inhibe etmek için yeterli olduğu bulunmuştur [17]. DFB muamelesinden sonra gelişim inhibisyonu gösteren *Tenebrio molitor* L. pupalarında, DFB etkisiyle pupal kütikula kalınlığı yaklaşık %70 oranında ayrıca anormal gelişen erginlerin kütikula kalınlığı da kontrol ergin kütikulası ile karşılaştırıldığında %25-40 oranında azalma tespit edilmiştir [18]. DFB ile muamele edilmiş *S. littoralis* larvalarında ikinci torasik tergal plakların kütikula kalınlığında papilla ve interpapilla bölgelerinde kontrol grubuna kıyasla %20'lik bir azalma tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, dördüncü abdominal tergitlerin kütikula kalınlığında da %10-22'lik bir azalma gözlenmiştir [19]. DFB ile muamele edilen birinci evre *Leptinotorsa decemlineata* larvalarının kütikulasındaki lamellerin daha ince olduğu gözlenmiş, prokütikula kalınlığının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %50'den daha fazla oranda azaldığı görülmüştür. Prokütikulanın ince yapısı incelendiğinde ise kitin mikrofibrillerin tamamlanmamış ve bozuk biçimlenmesinden dolayı lamelli yapının kısmen bozulduğu ifade edilmiştir [20]. DFB ve flufenoxuronun topikal yolla uygulanması sonucu *S. littoralis* larvalarında endokütikula içine kitin mikrofibrillerinin birikimi durmuş, lamel miktarının artışı engellenmiş, amorf bir endokütikula gözlenmiş, subkütikula genişlemiş ve subkütikulada vakuoller ortaya çıkmıştır [9]. Buprofezin etkisiyle *Trialeurodes vaporariorum* pupal kütikulasında, lamelleri olmayan ve düzensiz kalınlıkta amorf bir prokütikula gözlenmiştir [21]. Cyromazine, üçüncü evre *Ceratitis capitata* Wied. larvalarının integümentinde anormalliklere ve özellikle kütikula kalınlığında

düzensizliklere sebep olmuştur [22]. Triflumuron ile muamele edilmiş *T. molitor* pupalarında post-ekdisial pupal kütiküla kalınlığında yaklaşık %10-43 oranında azalma meydana gelmiş ve bu azalma kütiküladaki kitin miktarının azalması ile desteklenmiştir [23]. Yeni deri değiştirmiş dördüncü evre *Culex pipiens pipiens* L. larvalarına uygulanan triflumuron ise larval kütiküla kalınlığında %37-41, pre-ekdisial pupal kütiküla kalınlığında %39-52 oranında azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir [24].

Kontrol grubuna ait sağlıklı *G. mellonella* larvalarına ait histolojik preparatlarda larvaların en geç 108. ve 120. saatlerde deri değiştirmiş olduğu ve bir üst evreye geçtiği, teflubenzuron uygulanan larvalarda ise her üç dozda da 156. saate kadar eski ve yeni derinin birlikte olduğu safha sürekli olarak gözlenebilmiştir. Bu durum teflubenzuron uygulanan larvaların ekdisisi başaramamalarına yani eski derilerini atmada zorluk çektiklerine, teflubenzuronun etkisiyle yeni sentezlenen kütikülanın zayıflığına ve yetersizliğine işaret eder. Sağlıklı yeni bir kütiküla sentezlenmediği için larvalar eski kütikülalarını atamamaktadır. Dolayısıyla etkilenen larvalarda deri değiştirme süresi uzamıştır. Reynolds [4], benzoyilüreler ile zehirlenen böceklerin her zamanki gibi deri değiştirme siklusunu başlattığını ancak ekdisis zamanı geldiğinde zayıf düşen böceğin eski kütikülayı atmayı başaramadığını, çünkü yeni kütikülanın hem sertliğinin hem de sağlamlığının ciddi şekilde bozulduğunu belirtmiştir. Clarke ve Jewess [14], benzoyilürelerin deri değiştirmede ölüme sebep olmasını kasların bağlanma ve hareketleri için gerekli iskelet sertliğinin noksanlığına bağlamış, bu durumu da kütiküлада kitin miktarının indirgenmesiyle ilişkilendirmiştir. Ker [15], 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 dördüncü evre *S. littoralis* larvalarının deri değiştirme süresi 12 saat sürerken, DFB'la beslenmiş olanlarda 24 saatten daha fazla sürmüş, deri değiştirme süresinin uzaması gelişim inhibisyonuna bağlanmıştır [19]. Sağlıklı *Musca domestica* birinci evre larvaları yaklaşık 30 saatte ekdisise uğrarken DFB ile muamele edilmiş larvalarda bu süre 48 saati çok aşmaktadır. Bu durum normal prokütikülanın oluşmamasına bağlanmıştır [25].

Sağlıklı *L. decemlineata* bireylerinde elitrada ergin oluşumundan yaklaşık 10 gün sonrasına kadar geçirgenlik azalmış, Grosscurt [26], DFB'un kitin sentezi inhibisyonundan dolayı geçirgenlikteki bu azalmayı bloke edebileceğini önermiştir. 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 hücrelere ulaşmasında etkili bir bariyer oluşturduğunu göstermişlerdir. Bizim görüşümüze göre, teflubenzuronun kütikülada sebep olduğu incelmeyi, temas yoluyla etkili olan diğer insektisitlerin kütiküladaki penetrasyonunu hızlandırması ve kolaylaştırması da muhtemeldir. Bu sebeple teflubenzuronun temas yoluyla etkili insektisitlerle kombine olarak kullanılması zararlı böceklere karşı kimyasal mücadelede daha başarılı olmayı ve kullanılan insektisit miktarının azalmasını sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Mondal K. A. M. S. H., Parween S., Insect growth regulators and potential in the management of stored-product insect pests, *Integrated Pest Management Rev.*, 5: 255-295, (2000).
2. Gupta D., Verma A. K., Effect of three benzoylphenyl urea compounds on larvae of rice moth, *Corcyra cephalonica* Station, *Indian J. Plant Prot.*, 20: 174-177, (1992).
3. Andersen S. O., Biochemistry of insect cuticle, *Ann. Rev. Entomol.*, 24: 29-61, (1979).
4. 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).
5. Özparlak H., Ünsal S., Aktümsek A., Diflubenzuron'un (DFB) *Galleria mellonella* L. larvalarının orta bağırsağına etkileri, *Veterinarium*, 12: (1), 86-93, (2001).
6. Özparlak H., Diflubenzuron'un *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları üzerindeki etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2001).
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. 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).
9. 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).
 10. 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).
 11. 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).
 12. Erinç M., *Bacillus thuringiensis* ve bazı kimyasal insektisitlerin *Agrotis segetum* (Denis et. Schiff) (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarına etkileri, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (1996).
 13. Tada M., Matsumoto Y., Mitsui T., Nobusawa C., Fukami J., Inhibition of chitin synthesis by 1(3, 5- Dichloro- 2, 4- difluorophenyl)- 3- (2, 6- difluorobenzoyl) urea (CME-134) in the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L., *J. Pesticide Sci.*, 11: 189-195, (1986).
 14. Clarke B. S., Jewess P. J., The inhibition of chitin synthesis in *Spodoptera littoralis* larvae by flufenoxuron, teflubenzuron and diflubenzuron, *Pest. Sci.*, 28: 377-388, (1990).
 15. Ker R. F., Investigation of locust cuticle using the insecticide diflubenzuron, *J. Insect Physiol.*, 23: 39-48, (1977).
 16. 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).
 17. 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).
 18. 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. and Physiol.*, 21: 256-264, (1984).

19. 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).
20. 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).
21. 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).
22. Vinuela E., Budia F., Ultrastructure of *Ceratitis capitata* Wiedemann larval integument and changes induced by the IGI cyromazine, Pest. Biochem. and Physiol., 48: 191-201, (1994).
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. Hegazy G., Degheele D., The effect of DFB on the ultrastructure of the integument during moult events of *Musca domestica*, Parasitica, 48: (1), 3-14, (1992).
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).