

Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae)'nin larva dönemlerine uygulanan *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*'in, sindirim sistemi üzerindeki etkileri

Ferit TURANLI**

Şeniz KISMALI**

Summary

Investigations on the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* on digestive system of larval stages of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae)

This study was carried out to determine the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* on alimentary canal of larval stages of *Leptinotarsa decemlineata*. Different ages of the larvae and Novodor commercial biopreparate consist of *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* were used in the experiments.

During the studies, the laboratory conditions were 60-70% relative humidity and $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ during 16:8 light period for growing of *L. decemlineata* and potato plants. The fixations were done healthy larvae fed on untreated potato plants in every 6-hours from the beginning of hatching. The same process were applied to the larvae fed on plant leaves treated by dipping in biopreparation which were prepared as recommended 10 ml/liter distilled water. Dissections from the larvae fixed were evaluated with healthy and treated comparison. In conclusion, gave rise to histopathological variations in midgut cells of the larvae. Observed effects were particularly as broken down completely microvillus layer at apical sections, following swollen cells with lysis and then discharged whole contents into gut lumen blown up in result of excessive swelling. Nucleus and length of these cells were more longer than the normal ones. Due to these effects, feeding of the larvae were ended.

Key words: *Leptinotarsa decemlineata*, *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, alimentary canal, histopathology

Anahtar sözcükler: *Leptinotarsa decemlineata*, *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, sindirim sistemi, histopatoloji

* Bu çalışma, Ferit Turanlı'nın doktora tezinin özeliidir.

** E.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 35100 Bornova, İzmir
e-mail: turanli@ziraat.ege.edu.tr
Alınış (Received): 25.12.2001

Giriş

Dünya'da araştırmacılar insanlığın buğdaydan sonra önemli besin maddelerinden birisi olan patatesin birim alandaki verimini arttırıcı çeşitli ıslah ve gübreleme çalışmaları yaparken bir taraftan da patates zararlılarından doğan kayıpları en aza indirmeye çalışmışlardır. Patatesin Dünyada en önemli zararlısı Patates böceği, **Leptinotarsa decemlineata** (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) ile mücadele yapılmadığı takdirde %40, hatalı mücadele uygulamalarında %23 oranında ürün kaybına neden olmakta ve küçük yumru sayısını arttırmaktadır (Has, 1992).

Bu denli önemli bir zararlı ile uzun yıllar sentetik ilaçlar kullanılarak mücadele edilmeye çalışılmış, çok büyük miktarlarda para ve işgücü kullanılmış bunun sonucunda zararlıya karşı kesin bir çözüm bulunamamış hatta bu ilaçlar insanlar ve çevre üzerinde olumsuz etkiler bırakmaya başlamıştır. Bilinçsiz ve yanlış kullanımın beraberinde getirdiği en önemli sorun da bu böceğin bilinen sentetik insektisitlere dayanıklılık kazanması olmuştur.

Yaşanan bu sorunları aşabilmek için bilinen sentetik kimyasalların yerine Entegre Zararlı Mücadelesi (IPM) çalışmalarının da vazgeçilmez bir parçası olan mikrobiyal etmenler kullanılmaya başlanmıştır.

Günümüzde tüm dünyada en iyi bilinen böcek patojeni olan **Bacillus thuringiensis** Berliner bakteri türünün 1000'e yakın izolatu ve toplam 30 varyetesi bulunmuştur. Bunlardan **B. thuringiensis** var. **tenebrionis** 1982 yılında Almanya'da izole edilerek, özellikle Chrysomelidae (Coleoptera) familyası türlerine karşı etkili olduğuna dikkat çekilmiştir. Bu familya'ya bağlı olan Patates böceğinin larvalarına karşı yapılmış pek çok çalışmada özellikle **B. thuringiensis** var. **tenebrionis**'in etkili olduğu sonucuna varılmış ve bu varyetenin esas alındığı bazı ticari biopreparatlar piyasada satılmaya başlanmıştır (Huger et al., 1986; Carroll et al., 1997).

Ülkemizde **B. thuringiensis** esaslı preparatlar ile bazı Lepidoptera takımı türlerine karşı yapılmış başarılı çalışmalar mevcuttur (Ataç et al., 1990; Ecevit et al., 1994; Demir et al., 1999). Ancak bu çalışmalar genellikle yüzde ölüm oranları yani etkililik ve doz ayarlaması üzerine yapılmış çalışmalardır. Henüz ülkemizde **B. thuringiensis**'in hangi yolla etkili olduğu, etki mekanizması, böcekte oluşturduğu patolojik değişiklikler konusunda her hangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada patates bitkisinin birinci derecede zararlısı olan Patates böceğinin larva dönemlerine besin yoluyla uygulanan **B. thuringiensis** var. **tenebrionis**'in, zararlının sindirim sisteminde meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir. Böylece bu yöndeki eksiklik giderilmeye çalışılmış ve ileride yapılacak bu alandaki çalışmalara temel oluşturması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma 1999-2001 yılları arasında Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Entomoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ana materyalini Afyon ili patates üretim alanlarından getirilerek üretilen Patates böceği

Leptinotarsa decemlineata, zararlının beslenmesi için kullanılacak patates bitkileri ve zararlı türün savaşımında kullanılan **Bacillus thuringiensis** var. **tenebrionis**'i %2 oranında içeren Novodor isimli biopreparat oluşturmuştur.

Çalışmalar için gerekli olan patates bitkisi ve Patates böceği üretimi sürekli olarak $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve %60 - 70 orantılı nem ile 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyodun sağlandığı steril iklim odalarında çalışma boyunca seri halde gerçekleştirilmiştir.

Afyon ilinden araziden toplanarak getirilen erginlerden elde edilen dölün bireyleri 70x50x50 cm boyutlarında alt yüzü dışında diğer yüzeyleri camla kapalı olan ve camların ortasında da 15 cm çapında tülbentle kapatılmış havalandırma delikleri bulunan tahta kafeslerdeki patates bitkileri üzerine bırakılarak üretilmiştir.

Erginler tarafından bitkilerin yapraklarına bırakılan yumurtalar, buldukları yapraklar kesilerek alt yüzeylerinde nemli filtre kağıdı olan petrilere konulmuştur. Yumurtaların bulunduğu petrilere gün boyunca 6'şar saat aralıklarla kontrol edilerek yeni açılmaya başlayan yumurta kümeleri, yine altında nemli kurutma kağıdı bulunan başka petrilere içine alınmıştır. Larvaların yetiştirildiği bu petrilere ek besin olarak patates bitkilerinin taze yapraklarından konulmuştur. Petrilere erken dönemlerde günde bir kez, ileri dönem larvalarda günde iki kez değiştirilerek temizlenmiştir. Geceleri kontrol yapılamadığı için sabah ilk kontrolde açılmış olan yumurta kümeleri ile yumurta açılımında homojenlik göstermeyen yumurta kümeleri ikinci gruptaki üretim kafeslerine aktarılmıştır (Has, 1992). Larvalar petri içinde ikinci gömleği değiştirip üçüncü döneme geçtiklerinde her petri içinde 10'ar larva kalacak şekilde daha büyük petrilere alınarak üretim sürdürülmüştür.

***Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*'in *L. decemlineata* Larvalarına Uygulanması ve Sindirim Sistemi Preparatlarının Yapılması**

Petrilere açılan yumurta kümelerinden alınan larvalar, beslenmeleri için bir kısmı temiz yapraklar üzerine bırakılırken, diğer kısmı da her gün yenilenen Novodor' lu solusyona 3 saniye süre ile batırılmış yapraklar üzerine konulmuştur. Çalışmanın amacı dozlar arasındaki etki farklılıklarını değil önerilen dozun etkisinin incelenmesi olduğu için %2 oranında aktif madde içeren preparattan, 1 lt saf suya 10 ml hesabıyla üretici firmanın önerdiği doz uygulanmıştır.

Kontrol ve biopreparatlı yapraklarla beslenen **L. decemlineata** larvaları, sindirim sistemi preparatlarının hazırlanması için fiksasyon, dehidratasyon, şeffaştırma, parafine yatırma ve bloklaşma, kesitlerin alınması ve boyama safhalarından sonra preparat haline getirilerek değerlendirilme işlemlerine geçilmiştir.

Fiksasyon işlemleri

Denemelerde kontrol olarak değerlendirilecek larvalar, yumurta açıldığı andan itibaren alınarak temiz yapraklarla beslenmiş ve 6'şar saatlik periyotlarla fiksasyon işlemi yapılmıştır. Böylece 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84 saatlik olmak üzere toplam larva süresi olan 13 gün boyunca her 6 saatte bir larvalar fikse edilmiştir.

Fiksasyon işlemleri %10'luk formalin solusyonunda yapılmıştır. Bunun için 100 ml %40'luk formalin ile 900 ml saf su karıştırılmıştır (Küpelioğlu ve Pabuççuoğlu, 1995).

Novodorlu yapraklarla beslenen larvaların fiksasyon işlemleri için; önce bir gözlem yapılarak preparat uygulanmış yaprakların besin olarak verildiği larvaların 48 saat sonra öldükleri görülmüştür. Bu nedenle preparat uygulanmış yapraklarla beslenen larvaların fiksasyonları 48'er saatlik periyotlara bölünmüştür. Yumurtadan çıktıktan sonraki ilk 48 saatlik larva döneminde Novodorlu yapraklarla beslenen larvalar 6'şar saatlik periyotlarla fikse edilmiştir. Yumurtadan yeni çıkan başka bir grup larva ise 0-48 saat süresince temiz yapraklarla beslenerek 49. saatten itibaren diğer bir 48 saatlik periyot olan 49-96 saatleri arasında, Novodorlu yapraklara beslenmek üzere bırakılmış ve yine 6 saatte bir fikse edilmişlerdir. Üçüncü ve dördüncü larva dönemlerinde petri içindeki besinler larvalara 48 saat süresince yeterli olmadığı için, daha önce hazırlanan yapraklar aynı ortamda bekletilip gerektiğinde kullanılmıştır. Fiksasyon işlemi böylece larva süresi olan 13 gün boyunca 6 saatte bir uygulanarak devam ettirilmiştir. Petrilerin içi çabuk kirlendiği için ilk iki larva döneminde her gün, üçüncü ve dördüncü larva dönemlerinde günde iki kez temizlenmiştir.

Dehidratasyon, şeffaflaştırma ve parafinleme işlemleri

Her fiksasyon şişesinden tesadüfen 6 larva seçilerek üç adedi dorso-ventral yönde bileteral simetrik olacak şekilde ortadan ikiye ayrılmış diğer üç adedi de toraks ile abdomenin birleştiği yerden ikiye ayrılmıştır. İkiye ayrılan larvalar hemen dehidratasyon, şeffaflaştırma ve parafinleme işlemlerinin yapılacağı Reichhert Junk-Histokinette 2000 marka alete alınmıştır. Her bir örnek bu alet içinde Sekendiz (1979), Küpelioğlu ve Pabuççuoğlu (1995)'nda belirtilen, 12 değişik kimyasal ortamda, otomatik olarak farklı sıcaklık ve sürelerde tutularak dehidratasyon, şeffaflaştırma ve parafinleme işlemleri tamamlanmıştır.

Parafin blokların hazırlanması

Parafinleme işlemi sonrası larvalar, parafin blokların yapılacağı Shandon Histocentre 2 marka aletin otomatik olarak sürekli 62°C'de tutulan sıcak tablası üzerine alınmış böylece parafinleme işlemindeki sıcaklık sağlanarak larva içindeki sıvı parafinin donması engellenmiştir. Her blokama kaseti içinde serbest halde bulunan, daha önce açıklandığı şekilde ikiye bölünmüş larva örnekleri alınmış ve kesildikleri yüzeyleri sıvı parafin doldurulmuş kaselerin dip kısmına gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Örneklerin bu kaseler içine kesit pozisyonuna göre yerleştirilip sabitlenmesi işlemi, ancak yavaş donan parafine gömülmesi ile sağlanacağı için, aletin sürekli olarak 10°C'ye soğutulan tablası üzerinde parafinin donmasına fırsat vermeden çok hızlı bir şekilde yapılmıştır. Daha sonra kaseenin kapağı kapatılmıştır. İçerisindeki yarı donmuş parafinle birlikte 10°C'lik tablanın üzerine sıralanan bu kaseler burada parafin donuncaya kadar bırakılmıştır. Bu işlemler dizini ile 6'şar saatlik toplam 13 güne ait 52 fiksasyon grubundan alınan 6'şar bireyin toplam 312 parafin bloğu hazırlanmıştır.

Kesitlerin alınması

Kesit alınması için Leica Junk Histoslid 2000 marka mikrotoma konulan her blokta, 6 mikron kalınlığında kesitler alınmaya başlanmıştır. Alınan kesitler mikrotomun bıçağından fırça yardımıyla alınarak, parafinin açılması için 45-50°C' deki saf su havuzuna bırakılmıştır.

Lamlar saf su havuzu içine daldırılarak üzerlerine kesitler alınmış ve sonra bir süre yatay olarak bekletilerek kurumaları sağlanmıştır. Her lam üzerine 3-4 kesit yan yana olmak üzere her örnekten ortalama 10 lam üzerine yaklaşık 35- 40 kesit alınmıştır. Daha sonra üzerinde kesitler olan bu lamlar, lam sepetine konularak parafinlerin erimesi ve dokudan uzaklaştırılması için 1 saat süre ile etüvde 65°C'de bırakılmıştır (Küpelioğlu ve Pabuççuoğlu, 1995).

Boyama işlemleri

Sindirim sistemi kesitlerinde doku ve hücrelerin değişik özelliklerini ortaya çıkararak incelemek amacıyla üç ayrı boya kullanılmıştır.

Hematoksilen- Eozin (HE) boyası;

Bu boya, doku boyası olarak da bilinen ve histolojik çalışmalarda en yoğun olarak kullanılan boya tipidir. Boyanın hücre sitoplazması ile hücre çekirdeğini birbirinden ayırıcı bir özelliği de vardır. Kesitlerinin bulunduğu lamları ihtiva eden lam sepetleri etüvden çıkartılarak boyama işleminin yapılacağı Leica Autostainer XL marka otomatik boyama aletine konulmuştur. Preparatlar bu alet içinde hazır halde bulunan ortamlardan sıra ile geçirilerek önce Hematoksilen (Hematoksilen 6 gr+ %99 alkol 60 ml) ve sonra Eozin (Eozin Y 25 gr+ saf su 1250 ml+ Glasiyal asetik asit 2-4 ml) ile boyanmışlardır (Sekendiz, 1979; Ozban, 1982; Küpelioğlu ve Pabuççuoğlu, 1995).

Gram boyası;

Gram boyama, preparat haline dönüşmüş olan doku veya organ içindeki gram pozitif ve gram negatif bakterileri boyamak amacıyla kullanılmaktadır. Gram boyası ile boyanan dokuda eğer gram pozitif bir bakteri varsa bakterinin çepere ve dolayısı ile bulunduğu bölümler de mor renkte, gram negatif bakterilerin bulunduğu alanlar ise kırmızı renkte boyanmaktadır.

Bu çalışmada **B. thuringiensis** var. **tenebrionis**'li yapraklarla beslenen larvaların sindirim sistemi içerisinde bakteri kalıntılarının olup olmadığı izlenmeye çalışılmıştır. Gram boyama işlemleri elle yapılmıştır (Hucker and Conn, 1927; Sekendiz, 1979; Küpelioğlu ve Pabuççuoğlu, 1995).

Giemsa boyası;

Giemsa boyası hücrenin nukleusunu, sitoplazmasını ve dokudaki bakterileri boyama amacıyla kullanılan bir boya çeşididir. Bu boya ile boyanan kesitlerde nukleuslar mavi, sitoplazma pembe ve bakteriler de yine mavi bir renk alır. Bakteri kalıntıları, Gram boyama ile ortabarsakda çok net görülebilmemesine karşılık önbarsakda net görülemediği için, Giemsa boyası ile daha net önbarsak görüntülerinin

elde edilmesi amaçlanmıştır. Giemsa boyama işlemleri de elle yapılmıştır (Gridley ve Aker, 1954; Sekendiz, 1979).

Preparatların yapılması ve değerlendirilmesi

Boyama işleminden sonra ksilol ile şeffaflaştırılan dokular lamelle kapatılmıştır. Patates böceğinin kontrol ve bakteri ile beslenmiş her larva dönemine ait hazırlanan tüm preparatlar ışık mikroskopunda x40, x100, x400 ve x1000 (immersiyon yağı ile) büyütmelede karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. İncelemeler sonucunda dokulardaki görüntülerin 3. ile 4. dönem larvalardan alınan kesitlerde daha net olması nedeniyle fotoğrafların ve değerlendirmelerin bu preparatlar üzerinde yapılması uygun görülmüştür. Larva dönemleri süresince 48 saatlik periyotlar halinde *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* uygulamasından sonraki 6'şar saatlik periyotlardaki sindirim sisteminde oluşan etki farklılıkları belirlenmeye çalışılmış normal ve bozulmuş hücrelerin ölçümleri yapılarak sonuçları karşılaştırılmıştır. Kontrol ve muamele yapılmış larvalardaki tüm bulguların fotoğrafları çekilerek, histolojik etkiler karşılaştırmalı olarak tanımlanmıştır.

Tüm preparatlardaki görüntüler literatür bilgilerinin ışığında incelenerek sonuçlar yorumlanmıştır. Bu deneme tesadüf blokları deneme desenine uygun olarak kurulmuş ve sonuçlar TARİST (Tarımsal İstatistik Paket Programı) yardımıyla değerlendirilmiştir (Açıkgöz, 1993).

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Böceklerde sindirim sistemi önbarsak (stomodeum), ortabarsak (mesenteron, ventriculus) ve artbarsak (proctodeum) olmak üzere üç ana bölümden oluşmuştur. Bu üç bölüm embriyonik gelişmenin ilk başlarında ayrı ayrı gelişir ve sonlarına doğru kesintisiz düz bir boru şeklinde sindirim sistemini oluşturmak üzere birleşirler (Baldwin et al. 1996).

Böceklerin sindirim sistemi genel olarak tüm ergin ve ergin öncesi dönemlerde benzer özelliklere sahiptir.

Önbarsak İle İlgili Bulgular

Önbarsak sindirim sisteminin diğer bölümlerinde olduğu gibi tek sıralı hücre tabakasından oluşmaktadır. Hücreler genellikle yassı ve diğer bölümlerdeki hücrelere göre daha küçük boyutludurlar (Şekil 1). Bu hücrelerin fiziksel sindirimi gerçekleştirme dışında herhangi bir özellikleri saptanmamıştır (Chapman, 1972; 1985). Önbarsağın içi intima adı verilen bir kılıf ile kaplıdır. Bu kılıf sclerotize olmamış kutikula yapısında ve bükülebilir özellikte olup bazı kısımlarının yüzeyinde diş veya diken şeklinde yapılar mevcuttur. Böceklerin ısırıcı-çiğneyici ağız yapısına sahip takımlarında bu yapılar çok iyi incelenmiş, pharynx ve oesophagus dahil önbarsağın her yerinde geriye doğru kavisli, kıvrılmış, farklı yapıda dikenlerin olduğu saptanmıştır (Chapman, 1985).

B. thuringiensis var. *tenebrionis* ile muamele edilmiş yapraklarla beslenen ve kontrol larvalardan alınan kesitler incelendiğinde, önbarsak yüzeyi yapısında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 2). Preparat uygulanmış yaprakla

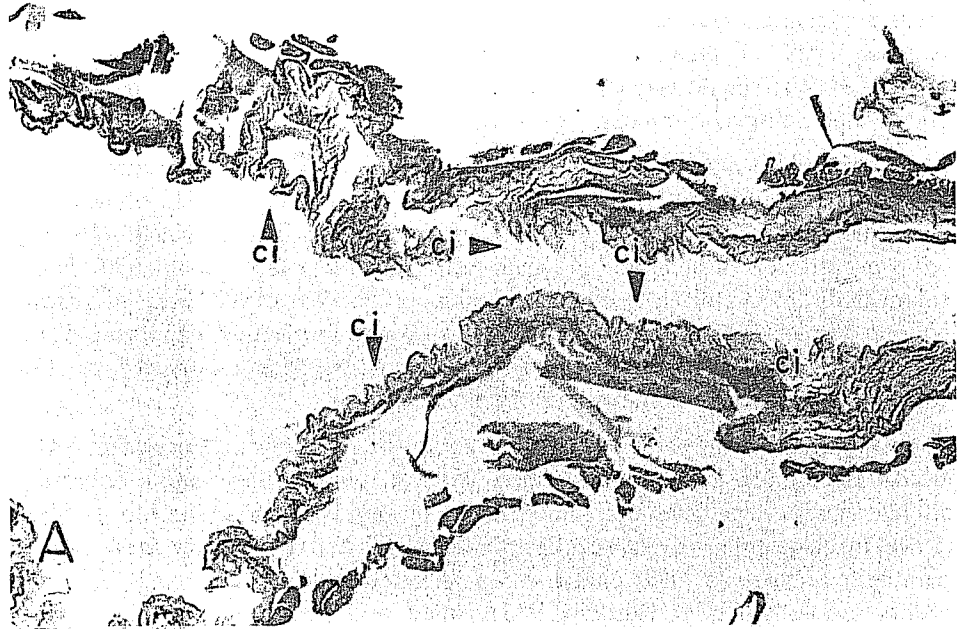


Şekil 1. Kontrol *Leptinotarsa decemlineata*'nın 9 günlük larvalarında önbarsağın boyuna kesiti (x40)
(Hematoksilen-Eozin) (pr: Proventriculus, c: Crop, oe: Öesophagus, p: Pharynx, mth: Ağız).

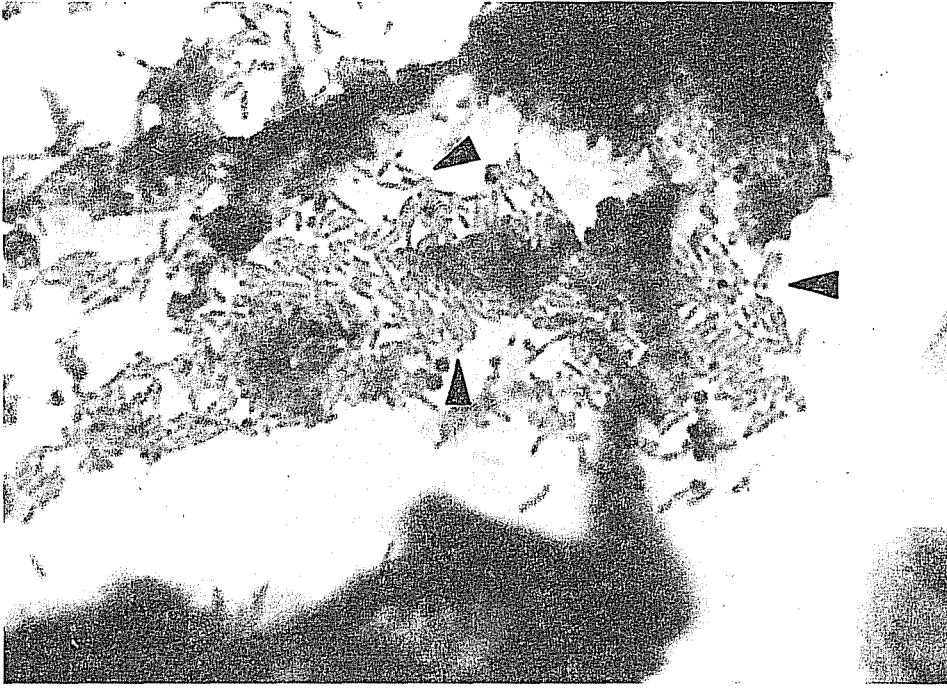
beslenen larvalardan alınan kesitlerde besin parçalamaya yarayan kitinsel dişler, bunları oluşturan kutikular kılıf ve bu kılıfın tamamen kapladığı tek tabakadan oluşmuş basit önbarsak hücrelerinde herhangi bir bozulma saptanmamıştır. Böylece *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*'in önbarsakta herhangi bir patolojik etkiye neden olmadığı sonucuna varılmıştır.

Preparat uygulanmış yapraklarla beslenen larvaların önbarsaklarından alınan kesitlerde bakterinin varlığı Hematoksilen- Eozin boyası ile görüntülenemediği için bu kesitler Giemsa ve Gram boyası ile boyanmıştır. Şekil 3'de görüldüğü gibi crop ve proventriculus kısımlarının içinde mor renkli alanların bulunduğu dikkati çekmektedir. Hematoksilen- Eozin boyasıyla görülmeyen ancak Gram ve Giemsa boyaları ile görülebilen bu mor renkli alanların *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* bakteri basilleri olduğu sonucuna varılmıştır. Her iki boyamada da basiller özellikle crop bölgesinde yoğun kümeler oluşturmaktadırlar.

Kontrol ve preparat uygulanmış yapraklarla beslenen larvalardan alınan kesitler birbirleriyle karşılaştırıldıklarında, ilerleyen zamana bağlı olarak önbarsağa ait hücrelerde veya dokularda bir bozulma görülmemesi, Pietrantonio and Gill (1996)'in bulgularıyla paralellik göstermektedir. *B. thuringiensis* esaslı biopreparatların önbarsakta etkili olmadığı sadece ortabarsakta etkiye sahip olduğunu bildiren Cooksey (1971), Burges (1981), Navon and Wysoki (1989), Pietrantonio et al. (1993), Escrache et al. (1997; 1998) ve Rausell et al. (2000) bunun nedenini, ön barsakta, ortabarsakta olduğu gibi reseptörlerin olmayışı, alkali bir barsak sıvısının olmayışı ve hücrelerin üst kısımlarının kitinsel yapıda olmasına bağlamaktadırlar.



Şekil 2. *Leptinotarsa decemlineata*'nın 8 günlük larvalarının *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* uygulanmış yapraklarla beslenmelerinden 36 saat sonra önbarsağın yüzeyindeki hücre ve kitinsel dişler A) x100, B) x400 (Hematoksilen-Eozin) (ec: Epitel hücresi, ci: Kitinsel intima).



Şekil 3. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* uygulanmış yapraklarla beslenen *Leptinotarsa decemlineata*'nın 10 günlük larvalarının beslenmeden 12 saat sonra önbarsaklarındaki bakteri basilleri (▲) (x1000) (Giemsa).

Ortabarsak İle İlgili Bulgular

Ortabarsak, önbarsak ile birleştiği yerde körbarsak adı verilen ve sayısı 2 ile 3 arasında değişen caeca'ya sahiptir. Körbarsakların kıvrımlı şekilde olan yapısında önbarsak tarafının hücre tipi, ortabarsak tarafının hücre tipinden farklıdır. Böylece körbarsaklar ön ve ortabarsak arasında birleştirici bir fonksiyona sahipler.

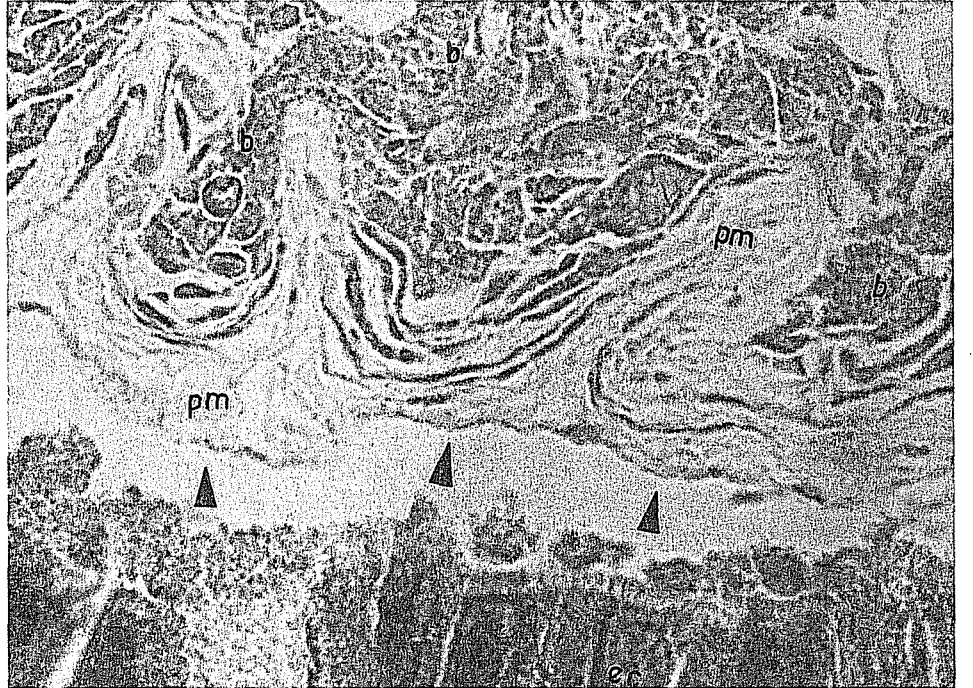
Genel olarak böceklerin ortabarsağı, bazal tabaka üzerine yayılmış olan tek sıralı ve öncelikli görevleri sindirim enzimlerinin üretilip salınması ve sindirim ürünlerinin emilmesi olan hücrelerden oluşmuştur. Bu hücreler ışık mikroskobu ile de rahatlıkla görülebilen yuvarlak ve büyük bir nukleusa sahiptir. Hücrelerin ortalarına yakın bölgelerde bulunan nukleusların hücrenin üçte birlik alanını kapladığı belirlenmiştir.

Böceklerde ortabarsakla ilgili yapılmış pek çok çalışmada, değişik hücre tipleri ve fonksiyonlarının yanı sıra diğer bazı yapıların da son derece önemli olduğu ve sindirimde önemli rollere sahip oldukları belirtilmiştir. Besini ortabarsak içinde tüp şeklinde çevreleyerek, barsak hücrelerinden ayıran peritrofik zar bu yapıların en önemlisidir. Diğer pek çok hayvan gruplarında bulunan musin yerine böceklerde bulunan bu zar ilk kez geçen yüzyılın başında fark edildiğinde zarımsı bir kese olarak tanımlanmıştır (Tellam, 1996). Bu zar her zaman proventriculus tarafından oluşturulur ancak ortabarsak hücreleri tarafından bu zara bazı katlar eklenebilir.

L. decemlineata kontrol larvalarının ortabarsak kesiti incelendiğinde barsak hücreleri ve mikrovillusların üzerinde katlanmış bir tabaka halinde peritrofik zar görülmektedir. Bu zarın üst kısmında ortabarsağın içini dolduran besin parçacıkları yer almaktadır (Şekil 4).

Peritrofik zarın fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte değişik tahminler yapılmıştır. Pek çok sıvı besin alan böcekte bu zarın olmaması fakat katı besinlerle beslenen böceklerde bulunup ortabarsak hücrelerinin aşınmasını engellemeye yaradığı yönünde yorumlanmıştır (Day and Waterhouse, 1953). Bu zarın, belli mikroorganizmaların böcek bünyesine girişini engellemek gibi önemli bir görevi olduğu düşünülmüşse de bazı türlerde bu zarın yokluğu, bunun çok önemli bir fonksiyon olmadığını göstermiştir (Tellam, 1996). Buna ek olarak bazı mikroorganizmaların da zardan geçebildikleri saptanmıştır. Değişik araştırmacılar tarafından yapılan araştırmalar bu zarın suyu, tuzları, glikozu ve aminoasitleri serbestçe geçirdiğini bunun yanında ortabarsak hücrelerinin oluşturduğu enzimleri içine alırken polisakkaritlerin veya proteinlerin dışarı çıkışlarını engellediğini ortaya koymuştur. Peritrofik zarın bir diğer önemli fonksiyonu da ortabarsak sindirim enzimlerini ve enzim kaynaklarını korumasıdır.

L. decemlineata larvalarının ortabarsak kesitleri incelendiğinde; kontrol bireylerde bazal tabakanın hemen üstünde sıralanmış olan hücreler, ortabarsağın iç yüzeyinde düzenli ve düz bir çizgi şeklinde yer almaktadır. Ortabarsağa geçmiş olan ve peritrofik zar tarafından çevrelenen besin kitlesi homojen bir dağılım göstermektedir. Ortabarsağı çevreleyen sütun şeklindeki hücrelerin ortasında oldukça büyük



Şekil 4. Kontrol 11 günlük *Leptinotarsa decemlineata* larvalarının ortabarsağında peritrofik zar (▲) (x400) (Hematoksilen-Eozin) (b: Besin, pm: Peritrofik zar).

ve yuvarlak şekilde bir nukleus ile hücrelerin barsak boşluğuna bakan yüzeylerini fırça gibi tamamen kaplayan mikrovillus bulunmaktadır (Şekil 5). Microvilluslar üzerinde yapılan değerlendirmelerde, 50 hücre ölçülmüş ve boylarının 2 - 3 µm arasında değiştiği saptanmıştır.

B. thuringiensis var. **tenebrionis** uygulanmış yapraklarla beslenen 4. dönem **L. decemlineata** larvalarının ortabarsak kesitleri incelendiğinde kontrol larvaların ortabarsak görüntüsünden oldukça farklı bir görüntü ortaya çıkmıştır. Kontrol larvalarda bazal tabaka üzerinde düz bir çizgi halinde yer alan hücrelerin mikrovillusla kaplı olan yüzeyleri başta olmak üzere parçalanarak ortabarsak içine dağıldıkları saptanmıştır (Şekil 6). Ayrıca peritrofik zar yok olmuş ve barsak içerisindeki besin kitlesi homojenliğini kaybetmiştir. Preparat uygulanmış barsak hücreleri daha yakından incelendiğinde kontrol bireylere göre daha ince ve uzun yapıda olup, hücreler arası boşluklar oluşmuş ve nukleus normal şeklini kaybederek inceliş uzamıştır (Şekil 6).

Kontrol ve muameleli 4. dönem larvalarının ortabarsak hücrelerinin ölçüm değerleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Kontrol ve *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* uygulanmış yapraklarla beslenen 4. dönem *Leptinotarsa decemlineata* larvalarında ortabarsak hücrelerinin ortalama ölçüm değerleri

		Hücre Sayısı	Ortalama (µm)	Ekstrem Değerler (µm)		Standart Sapma	Standart Hata
				Min	Max		
Kontrol	Hücre Boyu	50	43.950	35.000	57.500	4.228	0.597
	Hücre Eni	50	13.940	7.500	20.000	2.156	0.304
	Nukleus Boyu	50	9.650	7.500	12.500	1.516	0.214
Muamele	Hücre Boyu	50	68.450	55.000	82.500	6.679	0.944
	Hücre Eni	50	7.100	5.000	15.000	1.054	0.149
	Nukleus Boyu	50	12.700	10.000	17.500	2.305	0.326

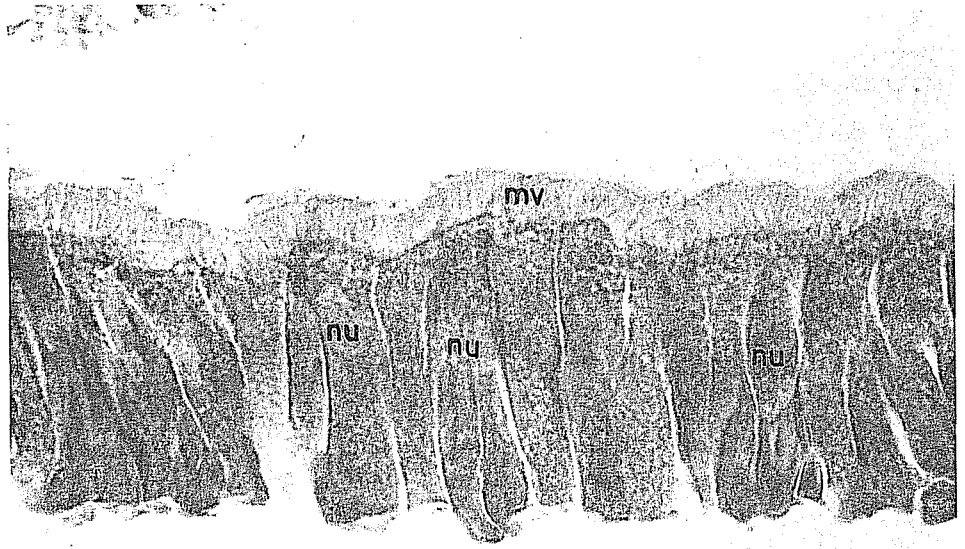
Çizelge'de görüldüğü gibi kontrol 4. dönem larvalarda ortalama hücre boyu 43.950 µm eni 13.940 µm, nukleus boyu ortalama 9.650 µm olarak saptanmıştır. Muameleli larvalarda normal şekilleri bozulmuş olan bu hücrelerin boyları ortalama 68.450 µm, eni 7.100 µm, nukleus boyu 12.700 µm olarak saptanmıştır.

Kontrol ve preparat uygulanmış yapraklarla beslenen larvalardaki ortabarsak hücrelerinin boyu, eni ve nukleus boyu varyans analizine tabi tutulmuş ($\alpha= 0.01$ ve $\alpha= 0.05$) ve analiz sonucunda hücre boyları, hücre enleri ve nukleus boyları arasında farklılık olduğu saptanmıştır (Çizelge 2).

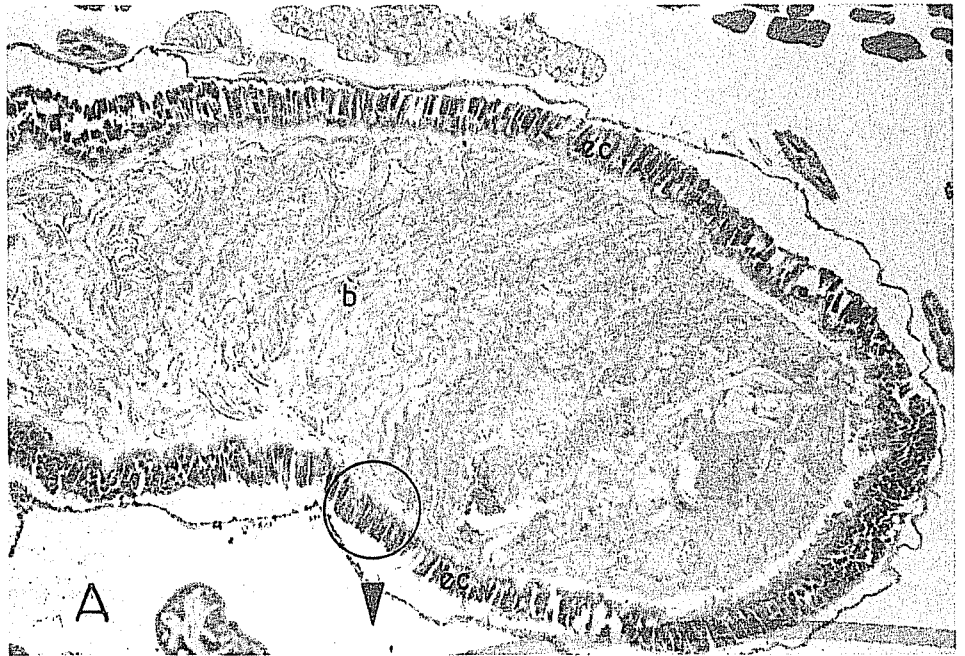
Çizelge 2. Kontrol ve preparat uygulanmış yapraklarla beslenen 4. dönem *Leptinotarsa decemlineata* larvalarının ortabarsak hücrelerinin kareler ortalaması ve önemli olma durumları

Varyasyon Kaynağı	Ort. Hücre Boyu	Ort. Hücre Eni	Ort. Nukleus Boyu
Kontrol /İlaçlı	15006.250**	1169.640**	232.562**

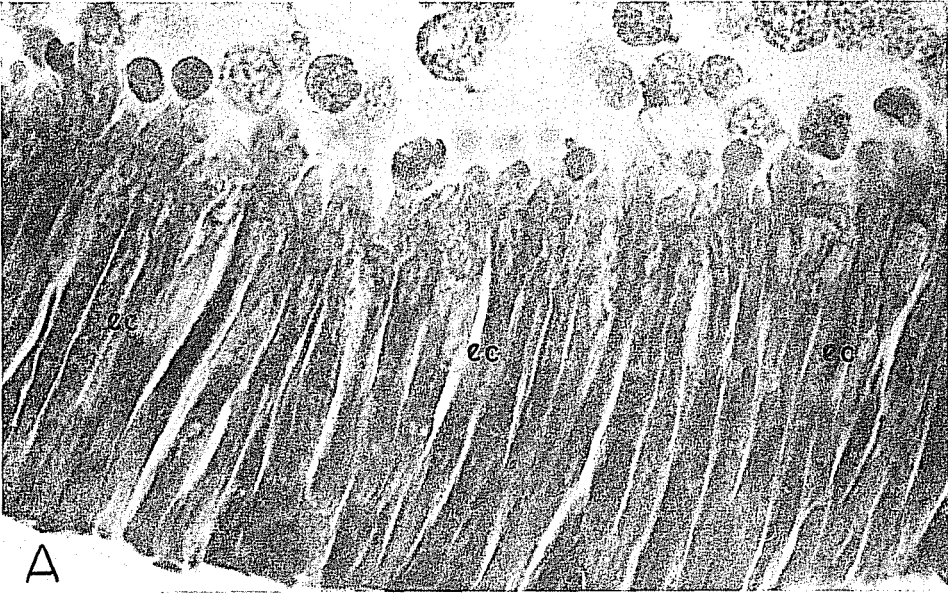
** = %1' e göre önemli



B



Şekil 5. Kontrol *Leptinotarsa decemlineata*'nın 10 günlük larvasında boyuna kesitte ortabarsağının genel yapısı, A) x40, B) x400 (Hematoksilen-Eozin) (ec: Epitel hücresi, b: Besin, mv: Mikrovillus, nu: Nukleus).



A



B

Şekil 6. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* uygulanmış yapraklarla beslenen 10 günlük *Leptinotarsa decemlineata* larvalarında beslenmeden 6 saat sonra ortabarsak hücrelerinin yapısı A) x400, B) x1000 (Hematoksilen-Eozin) (ec: Epitel hücresi, nu: Nükleus).

İstatistiki açıdan farklılıkları ispatlanan (Çizelge 2) karakterlerin $\alpha= 0.05$ olasılığında LSD testine tabi tutulmuş ve Çizelge 3'deki sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 3. Kontrol ve preparat uygulanmış yapraklarla beslenen 4. dönem *Leptinotarsa decemlineata* larvalarının ortabarsak hücre boyutlarına ait LSD test sonuçları

	Ort. Hücre Boyu		Ort. Hücre Eni		Ort. Nükleus Boyu	
Kontrol	43.950	B	13.940	A	9.650	B
Muamele	68.450	A	7.100	B	12.700	A

Böylece preparat uygulanmış yapraklarla beslenen larvaların ortabarsak hücrelerinin kontrole göre daha uzun, daha dar ve yassı- uzun şekilli nükleuslara sahip oldukları saptanmıştır.

B. thuringiensis var. **tenebrionis** uygulanmış yapraklarla beslenen larvaların ortabarsak kesitlerinde bakterinin varlığını saptamak amacıyla uygulanan Gram ve Giemsa boyamaları sonucunda ortabarsak lümeninde bakteri kümelerinin olduğu görülmüştür. Bu durum önbarsakda sindirilememiş olan bakterinin ortabarsakdaki alkali barsak sıvısının etkisiyle parçalanan basillerinin, küçük bakteri kümelerine dönüştükleri şeklinde açıklanabilir. Ortabarsak bölümünde görülen mor renkli bu bakteri kümeciklerinin hangi bakteriye ait olduğunu saptamak üzere yapılan reizolasyon çalışmasıyla, **B. thuringiensis** var. **tenebrionis**'e ait olduğu saptanmıştır.

Yapılan çalışmalarda **B. thuringiensis** uygulamalarından hemen sonra bireylerin ölmedikleri ancak belli bir süre geçtikten sonra öldükleri gözlenmiştir. Ben-Yehuda et al.(1993) tarafından **Cryptoblabes gnidiella** Milliére (Lepidoptera; Pyralidae) ile yapılan çalışmada, zararlı türe değişik konsantrasyonlarda **B. thuringiensis** uygulamalarının sonucunda beslenmenin hemen durmasına karşın ölümlerin ancak 5-6 gün içerisinde gerçekleştiği saptanmıştır. Wysoki and Scheepens (1988) tarafından **Boarmia selenaria** (Denis & Schiffermiller) (Lepidoptera: Geometridae) üzerinde yapılan uygulamalarda da maksimum ölümlerin 4. günde görüldüğü belirtilmektedir. Yapılmış olan bu çalışmada **L. decemlineata** larvalarının preparat uygulanmış yapraklarla beslenmelerinden 48 saat sonra ölümlerin başladığı saptanmıştır.

Artbarsak İle İlgili Bulgular

Artbarsağın en iyi bilinen özelliği bu bölüme gelen sindirim artıklarındaki suyun ve tuzların absorbe edilip dışkıının kuvvetli kaslar sayesinde türe özel şekiller verilerek anüs yoluyla dışarıya atılmasıdır. Artbarsakta sindirim ürünlerinden artakalan atık maddelerin uzaklaştırılması için kullanılan Malphigi tüpleri pylorus kısmına açılır. Artbarsakta türün yaşama yerine bağlı olarak bazı özelleşmiş kısımlara da rastlanabilmektedir (Chapman, 1985).

Artbarsak, ön ve ortabarsak bölümlerinde olduğu gibi düz bir tüp şeklinde olmayıp kenarlara doğru derin katlanmalar ve küçük kanallar bulunan bir yapıya sahiptir (Şekil 7). Şekilde görüldüğü gibi ortabarsağın sonuna yakın kısmından

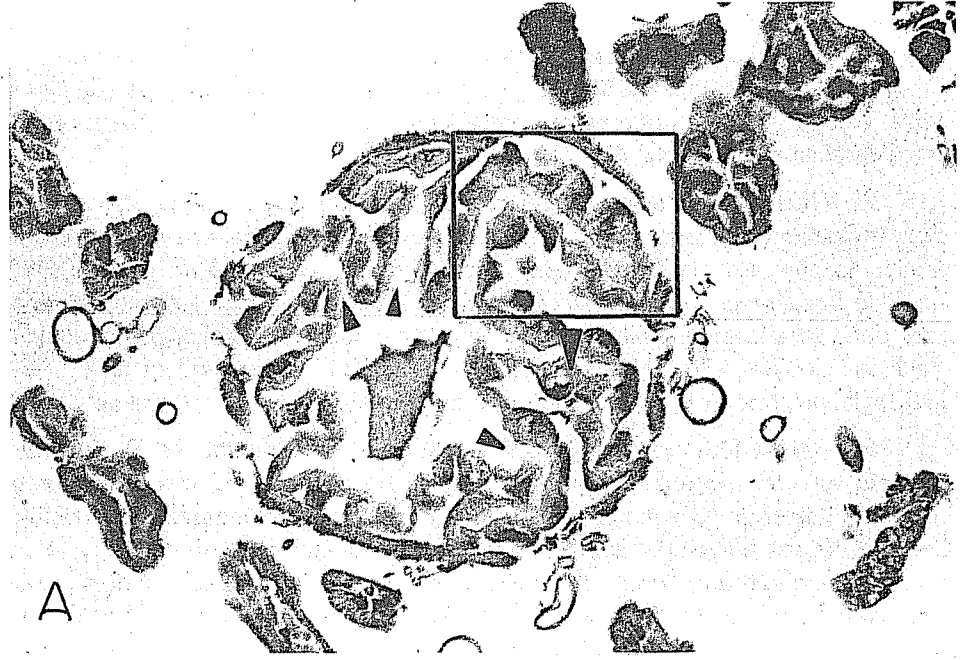
başlayan katlanmalar artbarsak boyunca devam etmektedir. Bu katlanmaların çevresindeki hücreler ortabarsaktaki hücrelerin aksine yassı ve kübik şekilde olup yapısal olarak önbarsaktaki hücelere benzer ve üzerlerinde kitinsel bir kılıf bulunur. Chapman (1985)'a göre bu kitinsel kılıf önbarsağa göre daha ince yapıdadır ve böyle olduğu için de artbarsakta, önbarsağın aksine su ve tuz absorpsiyonu gerçekleşebilmektedir (Şekil 8).

B. thuringiensis var. **tenebrionis** uygulanmış yapraklarla beslenen **L. decemlineata** larvalarının artbarsakları incelendiğinde, kontrol bireylerde görülen yapılar ile aynı oldukları ve herhangi bir değişikliğe uğramadıkları görülmüştür. Özellikle bozulmanın beklenebileceği yassı ve kübik epitel hücrelerin, önbarsağa göre daha ince olan kutikular kılıf altında normal yapısını koruduğu saptanmıştır (Şekil 9). Cooksey (1971), Pietrantonio et al. (1993) ve Escriche et al. (1997, 1998) gibi araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

Elde edilen tüm bulgular göz önüne alındığında entomopatojen **B. thuringiensis** var. **tenebrionis** uygulanan yapraklarla beslenen **L. decemlineata** larvalarının sindirim sistemindeki etki yalnızca ortabarsak bölümünde görülmüştür. Ön ve artbarsak hücrelerini kaplayan kitinsel yapı, bakterinin bu bölümlerde etkili olmasını tamamen engellerken ortabarsağın hücreleri çok ince yapıli peritrofik zar tarafından korunamadığı için önemli patolojik bozulmalara uğramışlardır. Yoğun bir salgılama ve absorpsiyon işlevi içerisinde olan ortabarsak hücrelerinin doğal olarak açık olması gereken üst kısımlarındaki mikrovillar alan, etkiye maruz kaldıktan sonra normal işlevlerini yapamamakta ve ortabarsak hücrelerinin önce



Şekil 7. Kontrol 9 günlük **Leptinotarsa decemlineata** larvalarında artbarsağın yapısı (boyuna kesit) (x40) (Hematoksilen- Eozin) (mg ortabarsak; hg: artbarsak).



Şekil 8. Kontrol 9 günlük *Leptinotarsa decemlineata* larvalarında artbarsak hücrelerinin yapısı A) x100, B) x400 (Hematoksilen-Eozin) (ec: Epitel hücresi, ci: Kitinsel intima).



Şekil 9. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* uygulanmış yapraklarla beslenen 8 günlük *Leptinotarsa decemlineata* larvalarında beslenmeden 36 saat sonra alınan enine kesitlerde artbarsak hücrelerinin yapısı (x100) (Hematoksilen-Eozin) (ec: Epitel hücresi).

toksin tarafından kaplanan üst kısımları bozulmaya uğrayarak, hücreler şişip patlamak suretiyle barsak epitelinin yapısı tamamen bozulmaktadır. Yapısı bozulan ortabarsak içindeki sindirilemeyen besinler sürekli olarak kalmakta ve larva açlık hissetmemektedir. Bu döngünün doğal bir sonucu olarak larva bir iki gün gibi kısa bir süre içerisinde ölmektedir. Tüm bu bulgular daha önce diğer böcek larvalarının sindirim sistemleri ile yapılan çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermiştir.

Teşekkür

Çalışma boyunca kesitlerin alınması, preparat yapılması ve preparatların değerlendirilmesinde değerli zamanlarını ayıran E. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Gürsel Ergen ve Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvar sorumlusu sayın Dr. Metin Çabuk'a teşekkür ederiz.

Özet

Bacillus thuringiensis var. *tenebrionis*'in Patates böceği, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera; Chrysomelidae)'nın larva dönemlerinde uygulanmasıyla sindirim sisteminde meydana getirdiği histopatolojik etkilerini saptamak amacıyla bu çalışma yapılmıştır. Çalışmanın ana materyalini patatete zararlı olan *L. decemlineata*'nın farklı dönemlerdeki larvaları ve *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* esaslı Novodor ticari biopreparat oluşturmuştur.

Çalışma $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık, 16:8 aydınlanma periyodu ve %60-70 orantılı nem ortamı sağlanmış iklim odalarında yürütülmüştür. Kontrol larvalar ile biopreparatla (10 ml/l) muamele

edilmiş yapraklarla beslenen larvalar yumurtadan çıkıştan itibaren her 6 saatlik periyotta fikse edilmiştir. Fikse edilen örneklerden alınan kontrol ve preparat uygulanmış larvaların sindirim sistemi kesitleri kıyaslama ve ölçümlerle değerlendirilmiştir. Sonuçta bakteri esaslı biopreparatın zararlı türün larvalarının ortabarsak epitel hücrelerde histopatolojik etkilere neden olduğu, bu etkilerin özellikle epitel hücrelerinin apikal kısmındaki mikrovillus tabakasının parçalanması sonucunda hücrelerin şişmeleri ve aşırı şişme sonucu patlayarak tüm içeriklerini barsak lümenine boşaltmaları şeklinde etki gösterdiği saptanmıştır. Bu hücrelerin boyları ve nukleusları normale göre uzamış, hücreler arası boşluklar oluşmuş sindirim işlevini yitiren hücreler nedeniyle larvalarda beslenme durmuştur.

Literatür

- Açıkgöz, N., 1993. Tarist: PC'ler İçin İstatistik ve Kantitatif Genetik Paketi.
- Ataç, Ö., H. Bulut & T. Çevik, 1990. Salkım Güvesi (*Lobesia botrana* Den. et Schiff)'ne karşı *Bacillus thuringiensis*'in tek başına ve Carbaryl'in düşük dozu ile birlikte etkisinin araştırılması. Türkiye II. Biyolojik Mücadele Kongresi, 26-29 Eylül 1990, Ankara, 127-135 s.
- Baldwin, K.M., R.S. Hakim, M.J. Loeb & S.Y. Sadrud-Din, 1996. Midgut Development (31-55 pp). In: Biology of the Insect Midgut (Eds: M.J. Lehane and P.F. Billingsley). Chapman & Hall, London, 486 pp.
- Ben-Yehuda, S., M. Wysoki & D. Rosen, 1993. Laboratory Evaluation of Microbial Pesticides Against the Honeydew Moth. **Insect Sci. Applic.**, (14) (5/6): 627- 630.
- Burges, H.D., 1981. Progressing in the Microbial Control of Pests, 1970-80 (1-6 pp). In: Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970- 1980 (Ed: H.D Burges). Academic Press Inc., London, 949 pp.
- Carroll, J., J.-van Damme, A. Boets, J.-van Rie & D.J. Ellar, 1997. Intramolecular Proteolytic Cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A Delta- Endotoxin may Facilitate Its Coleopteran Toxicity. **Journal of Invertebrata Pathology**, 70 (1): 41-49.
- Chapman, R.F., 1972. The Insects. Structure and Function. The English Universities Press Ltd., London, 819 pp.
- Chapman, R.F., 1985. Structure of the Digestive System (165-205 pp). In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Regulation: Digestion, Nutrition and Excretion (Eds: A.G. Kerkut and L.I. Gilbert), Vol. IV: 639 pp.
- Cooksey, K.E., 1971. The Protein Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis*: Biochemistry and Mode of Action (247-274 pp). In: Microbial Control of Insects and Mites (Eds: Burges, H.D. and N.W. Hussey). Academic Press Inc., London, 861 pp.
- Day, M.F. & D.F. Waterhouse, 1953. Functions of the Alimentary System (299-311 pp). In: Insect Physiology (Ed: D.K. Roeder). Chapman & Hall., London, 1100 pp.
- Demir, G., N. Üstün & A. Derin, 1999. Determination of *Bacillus thuringiensis* Varieties Pathogenic on Maize Stem Borers and Their Insecticidal activity. Proceedings of the Conference of the International Working Group on *Ostrinia* and Other Maize Pests 4-10 September, Adana (Turkey), 143-148 pp.
- Ecevit, O., C. Tuncer, G. Hatat & S. Keçeci, 1994. İki farklı *Bacillus thuringiensis* preparatı (Thuricide ve Biobit) ile azinphos- methyl ve treflumuron'un Amerikan beyaz kelebeği (*Hyphantria cunea* Drury Lepidoptera: Arctiidae)'ne etkinliği üzerinde çalışmalar. Türkiye III. Biyolojik Mücadele Kongresi, 25-28 Ocak 1994, İzmir, 519-528 s.

- Escriche, B., N. De Decker, J. Van Rie, P. Steels & E. Van Kerkhove, 1997. Electro-physiological Effects of δ - endotoxins on a Cell Model. International Molecular and Cell Physiology Conference on Ion Transport and Regulation of Cellular Function, Liverpool (U.K.), March, 15-16.
- Escriche, B., N. De Decker, J. Van Rie, S. Jansens & E. Van Kerkhove, 1998. Changes in Permeability of Brush Border Membrane Vesicles From *Spodoptera littoralis* Midgut Induced By Insecticidal Crystal Proteins From *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, **64**(4): 1563-1565.
- Gridley M.F. & O.N. Aker, 1954. Laboratuvar El Kitabı. Hususi Boyama Teknikleri. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Patolojik Anatomi Enstitüsü Yayınları, No: 1. Ankara, 234 s.
- Has, A., 1992. Orta Anadolu Bölgesi Koşullarında Patates Böceği *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera; Chrysomelidae)'nın Biyoekolojisi ve Özellikle Konukçu Bitki İlişkileri Üzerinde Araştırmalar. Grafik Tasarım Basımevi Ltd., İstanbul, 194 s.
- Hucker, G.J. & H.J. Conn, 1927. Further Studies on the Methods of Gram Staining. **N.Y. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull.**, **128**: 27-35.
- 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. Pabuççuoğlu, 1995. Patoloji ve Sitopatoloji Laboratuvar Teknikleri. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Yayınları, Yayın No: 3, İzmir, 121 s.
- Navon, A. & M. Wysoki, 1989. *Bacillus thuringiensis* as a Biocontrol Agent Against Agricultural Pests. **Israel Agresearch**, **3**: 1-2.
- Ozban, N. 1982. Mikropreparasyon Yöntemleri. İstanbul Üniversitesi Yayınları. Sayı: 2984, Fen Fakültesi Basım Evi, No: 170, 141 s.
- Pietrantonio, P.V. & S.S. Gill, 1996. *Bacillus thuringiensis* Endotoxins: Action on the Insect Midgut (345-366 pp). In: Biology of the Insect Midgut (Eds: M.J. Lehane and P.F. Billingsley), Chapman & Hall, London, 486 pp.
- Pietrantonio, P.V., B.A. Federici & S.S. Gill, 1993. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Endotoxins With The Insect Midgut Epithelium (55-80 pp). In: Parasites and Pathogens of Insects (Eds: N.E. Beckage, S.N. Thompson and B.A. Federici). Academic Press, Inc., London, 2, 294 pp.
- Rausell, C., N. De Decker, I. Garcia- Robles, B. Escriche, E. van Kerkhove, M.D. Real & A.C. Martinez- Ramirez, 2000. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the Midgut of the Nun Moth, *Lymantria monacha*. Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Mexico.
- Sekendiz, O.A., 1979. Entomoloji Çalışmalarında Histoloji Laboratuvarı Tekniği. Karadeniz Teknik Üniversitesi Basım Evi, Genel Yayın No: 113, Orman Fakültesi Yayın No: 7, 65 s.
- Tellam, R.L., 1996. The Peritrophic Matrix (86-108 pp). In: Biology of the Insect Midgut (Eds: M.J. Lehane and P.F. Billingsley). Chapman & Hall, London, 486 pp.
- Wysoki, M. & M.H.M. Scheepens, 1988. Effect of 20 Strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner on Larvae of *Boarmia selenaria* Schiffermüller (Lepidoptera: Geometridae). **Insect Sci. Applic.**, **9**(4): 433- 436.