



Araştırma/Research

Anadolu Tarım Bilim. Derg./Anadolu J Agr Sci, 34 (2019)

ISSN: 1308-8750 (Print) 1308-8769 (Online)

doi: 10.7161/omuanajas.479363

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* tarafından enfekte edilen *Malacosoma neustria* larvalarının hayatta kalmasına ve bazı bağışıklık enzimlerine bitkideki metal iyonlarının etkisi

Oğuzhan Yanar

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun, Türkiye
Sorumlu yazar/Corresponding author: oyanar46@gmail.com

Geliş/Received 06/11/2018

Kabul/Accepted 27/01/2019

ÖZET

Bu çalışmanın amacı 4 farklı bitki türü *Elaeagnus rhamnoides*, *Quercus cerris*, *Coryllus maxima* ve *Crataegus monogyna* ile besleyerek *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* tarafından enfekte edilen *Malacosoma neustria* larvalarının hayatta kalmasına ve bazı bağışıklık enzimlerine bitkilerdeki krom, nikel, bakır ve çinko metal iyonlarının etkisini araştırmaktır. Düşük nikel miktarına sahip *Q. cerris* ve *C. monogyna* bitkileriyle beslenen larvalarda hayatta kalma oranı yüksek nikel miktarına sahip olan *E. rhamnoides* ve *C. maxima*'ya göre daha düşüktür. En yüksek bakır miktarına sahip *Q. cerris* bitkisi ile beslenen larvalarda katalaz enzimi diğer bitkilerle beslenen larvalara göre yüksektir. En yüksek çinko ve en düşük nikel miktarına sahip olan *C. monogyna* ile beslenen larvalarda glutatyon peroksidaz aktivitesi en yüksektir. Düşük çinko ve yüksek nikel miktarına sahip olan *E. rhamnoides* ile beslenen larvalarda en düşük glutatyon peroksidaz aktivitesi bulunmuştur. En yüksek çinko içeren *C. monogyna* ile beslenen enfekte edilmiş larvalarda süperoksit dismutaz aktivitesi en yüksektir. Yüksek nikel ve bakır miktarına sahip *E. rhamnoides* ile beslenen larvalarda hemosit sayısı en yüksektir. En düşük hemosit sayısı ise nikel ve bakır miktarının en az olduğu *C. monogyna* bitkisi ile beslenen larvalarda bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler:
Malacosoma neustria
Metal iyonları
Bitki
Bacillus thuringiensis
subsp. *kurstaki*

The Effects of some metal ions in some plants on the survival and some immune enzymes of *Malacosoma neustria* larvae infected by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

ABSTRACT

In this study, *Malacosoma neustria* larvae infected by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* were fed with 4 different types of plant species, *Elaeagnus rhamnoides*, *Quercus cerris*, *Coryllus maxima* and *Crataegus monogyna*, in order to see the effects of chromium, nickel, copper and zinc heavy metal ions in plants on the survival and the immune enzymes of these larvae. The larvae fed the *C. monogyna* plant with the highest zinc content had the lowest survival rate. In the infected groups, the catalase enzyme activity was the highest in larvae fed with the *Q. cerris* plant, which has a high chromium content, and the lowest in the larvae fed with *E. rhamnoides*. In the larvae fed with the highest copper-containing *Q. cerris* plant, the catalase enzyme was higher than the larvae fed with other plants. The larvae fed with *C. monogyna* with the highest zinc content had the highest glutathione peroxidase activity. The lowest glutathione peroxidase activity was found in the larvae fed with *E. rhamnoides* having low zinc content. Superoxide dismutase activity was the highest in the infected larvae fed with the highest zinc containing *C. monogyna*. The highest number of hemocytes were found in the larvae fed with *E. rhamnoides* containing high amounts of nickel and copper, while the lowest hemocyte count was found in larvae fed with *C. monogyna* plant, where the amount of nickel and copper was the lowest.

Keywords:
Malacosoma neustria
Metal ions
Plant
Bacillus thuringiensis
subsp. *kurstaki*

© OMU ANAJAS 2019

1. Giriş

Toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri, çevrede gerçekleşen bir takım olaylar ve aynı zamanda insanlardan kaynaklanan bir takım olaylardan dolayı

sürekli değişmektedir (Probst ve ark., 2012). Bu doğal süreçler (volkanlar, erozyon, kaynak suyu) ve insan kökenli aktiviteler bazen bitki, hayvan ve insanlar için topraklarda toksik düzeylerdeki ağır metallerin lokal birikimine neden olmaktadır (Sharma ve Agrawal, 2005;

Florea ve Büsselberg, 2006; Boyd, 2010). Bu insan kaynaklı toprak kirleticileri çoğunlukla sanayi, madencilik, motorlu araçlar ve tarım dâhil olmak üzere bir takım olayların neticesinde meydana gelmektedir (Butler ve Trumble, 2008). Metaller nispeten küçük miktarlarda organizmalara genellikle toksik olduklarından dolayı kirleticilerin önemli bir grubunu oluştururlar. Ağır metallerle örnek olarak bakır, demir, çinko, kurşun, civa, kobalt, krom, nikel ve kadmiyum verilebilir. Ağır metallerin omurgalı ve omurgasız hayvanlara etkileri literatürde pek çok çalışmayla (Heliövaara ve ark., 1989; Stone ve ark., 2002; van Ooik ve ark., 2007, 2008; Sun ve ark., 2008) ortaya konmuştur. Yapılan çalışmaların çoğunda konak olarak herbivor böcek larvaları kullanılmaktadır. Bunun nedeni böcek larvalarının ağız yapısının en ilkel ağız tipi olan çiğneyici ağız yapısına sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Bu tip bir ağız yapısına sahip olmak bitkilerdeki metal iyonlarının biriktirildiği yaprakları yiyerek onları vücutlarına almaları anlamına gelmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin oluşmasında ve bu türler sebebiyle ortaya çıkan hasarın önlenmesi için vücutta çeşitli savunma mekanizmaları bulunmaktadır. 'Antioksidan savunma sistemleri' olarak bilinen bu sınıflar; serbest radikalleri nötralize edip, neden oldukları hasarı onarmaya yardımcı olur ve vücutun onlardan etkilenmesini en aza indirir veya vücudun kendini onarmasını sağlamaktadırlar (Ames ve ark., 1993). Antioksidan savunma sisteminde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve süperoksit dismutaz yer almaktadır (Tuna, 2007). Süperoksit dismutaz, süperoksit radikallerini, katalaz ve glutatyon peroksidaz reaksiyonları tarafından yıkılabilen peroksite dönüştürür (Freeman ve Crapo, 1980). Glutatyon peroksidaz, elektron kaynağı olarak glutatyonu kullanarak hidrojen peroksit ve organik hiperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir. Mitokondri, sitosol ve hücre membranlarında bulunmaktadır (Deaton ve Marlin, 2003). Katalaz ve glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksidi su ve atomik oksijene indirgemektedirler. Bu enzimlerin aktiviteleri artmadan süperoksit dismutazın aktivitesinin artması hidrojen peroksidin birikmesine ve böylece hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olur (Garewal, 1997). Katalaz, hidrojen peroksidin yüksek konsantrasyonlarında daha etkilidir. Daha düşük hidrojen peroksit konsantrasyonunun söz konusu olduğu durumlarda, bu aktif türün sönmülmesinde glutatyon peroksidaz daha etkili olmaktadır (Duthie ve ark., 1989).

Bacillus thuringiensis Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera grubundaki böceklerle karşı insektisidal özelliğe sahip kristal yapıda toksin üreten, spor oluşturan, gram pozitif ve aerobik bir toprak bakterisidir. *B. thuringiensis* topraktan, böceklerden, depolanmış ürünlerden ve kozalaklı ağaçların iğne yapraklarından izole edilmiştir (Demirbağ ve ark., 2008). Baskın biçimde uygulanmış mikrobiyal kontrol ajanlarından en fazla yaygın olarak kullanılanı *B. thuringiensis* bakterisidir (Lacey ve ark., 2001). *B. thuringiensis*

tarafından üretilen insektisidal proteinler hedef organizmalar üzerinde bağırsak toksisitesine sahiptir. Bu proteinlerin davranış hareketleri, aldıktan birkaç saat içinde böceğin ölümüne yol açan olayların bir kademesine sebep olduğu düşünülmektedir (Höfte ve Whiteley, 1989; Gill ve ark., 1992; Knowles, 1994). Zararlı lepidopter larvalarına karşı aktif olan *B. thuringiensis* insektisidal toksin proteinlerinin böceklere etkisi gösterilmiştir (Harvey ve ark., 1986; Knowles, 1994).

Türkiye'de yüzük kelebeği olarak bilinen *M. neustria*'nın elma, armut, ayva, kayısı, erik, badem, şeftali, vişne, kiraz, ahlat gibi meyve ağaçları ile meşe, söğüt, gül, kuşburnu, kavak, karaağaç gibi çalı ve orman ağaçlarında zararlı olduğu bilinmektedir (Kansu, 1955; Bodenheimer, 1958; Sekendiz, 1974; İren, 1977; Çanakçıoğlu ve Mol, 1998). Bu çalışmanın amacı *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* tarafından enfekte edilen *M. neustria* larvalarının beslendikleri farklı bitki türlerindeki bazı metal iyonlarının onların hayatta kalmalarına ve bazı bağışıklık enzimlerine ve hemosit sayılarına etkisini araştırmaktır. Bu çalışmada metal iyonlarının etkisine odaklanmamızın nedeni büyüme ve hayatta kalmalarına olumsuz etkileri (Butler ve ark., 2009) olabildiği gibi patojenlere karşı savunmada rol oynaması (Boyd ve ark., 1994) gibi farklı etkilere sahip olabilmelerindedir. Aynı zamanda literatürdeki çalışmalarda metal iyonları ile bakteriyle enfeksiyon arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmaların az olmasındandır. Bu çalışmada kullanılan bitki türleri Samsun Kızılırmak Deltasında *M. neustria*'nın beslenmek için en çok tercih ettiği *Elaeagnus rhamnoides*, Samsun ve çevresinde doğal olarak bol bulunan *Quercus cerris*, il sınırları içinde fındık ekili arazilerin çok bulunmasından dolayı *Coryllus maxima* ve yine doğal olarak il sınırları içinde bol bulunan *Crataegus monogyna* bitkisi çalışma için tercih edilmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Larvaların Elde Edilmesi

Samsun ili Bafra ilçesi Kızılırmak Deltası sınırları içindeki Cernek Gölü civarına muhtelif zamanlarda arazi yapılarak *M. neustria* türüne ait larvalar toplanmıştır. Laboratuvara getirilen larvalar beslenmede kullanılacak 4 gruba ayrılarak kaplara alınmış ve son larva evresine kadar o grubun bitkisi ile beslenmiştir.

2.2. Beslenmede Kullanılan Bitkiler

Bu çalışmada *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* tarafından enfekte edilen *M. neustria* larvalarına beslemek amacıyla 4 farklı bitki türü *E. rhamnoides*, *Q. cerris*, *C. maxima* ve *C. monogyna* kullanılmıştır. Bu bitkiler günlük olarak alınarak larvalar beslenmiştir. Ayrıca günlük olarak bitki örnekleri alınarak etüvde kurutulmuştur.

2.3. Beslenme Deneyleri

Beslenme deneyleri iki farklı protokolde yürütülmüştür. Birinci protokolde enfekte olan grup ile kontrol grubu arasında hayatta kalma oranlarının tespiti için her besin grubunda 50 larva olacak şekilde 4 farklı besinle toplamda 200 larva beslenmiştir. İkinci protokolde ise total hemosit ve katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri için 4 farklı besinde her grupta 100 larva olacak şekilde 400 larva beslenmiştir. Toplamda ise 600 larva ile çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmada kullanılan larvalar son larva evresine gelen larvalardan seçilerek yapılmıştır. Kontrol grubu hariç diğer besin grubundaki larvaların besinlerine *Btk* bakterisi bulaştırılarak 28 °C oda sıcaklığında deneye devam edilmiştir.

2.4. Larvaların Bakteri ile Enfeksiyonu

Larvalara bakteri enfeksiyonunu gerçekleştirmek için 600 nm dalga boyunda (OD₆₀₀) 0.189 optik yoğunlukta olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Her bitki grubundaki larvalar laboratuvarında 10 gün beslendikten sonra, yaprak üzerine hazırlanan süspansiyondan 1 ml *Btk* bakterisi bulaştırılarak iklim odasında 28 °C sıcaklık ve ışıklı (aydınlık) ortamda 3 gün boyunca bu larvaların beslenmeleri sağlanmıştır.

2.5. Hemolenfin Alınması

Larvalar 3 gün bakteri bulaştırılmış besinlerle beslendikten sonra larvaların göğüs bölgelerinde (thorax) bulunan 3. bacakları kesilerek hemolenfleri alınmış ve toplam hemosit sayısının hesaplanması için mikrokapiller tüp kullanılarak pupalardan 4 µl hemolenf elde edilmiştir. Hemolenf 36 µl antikoagulant (0.0098 M NaOH, 0.186 M NaCl, 0.017 M Na₂EDTA ve 0.041 M sitrik asit, pH:4.5) içeren ependorf tüplerine transfer edildi. Ependorf tüplerden alınan hemolenf preparata yayılarak, Giemsa boyasıyla boyanmış ve milimetre küpteki hemosit sayısı Jones formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Jones, 1962).

2.6. Enzim Analizleri

Katalaz aktivite tayini Lüch (1963) yöntemiyle yapılmıştır. Süperoksit dismutaz aktivitesi McCord ve Fridovich (1969)'in spektrofotometrik metodu ve Flohe ve Ötting'in (1984) metodu ile belirlenmiştir. Glutatyon peroksidaz enzim aktivite tayini Lawrence ve Burk (1976)'un yöntemiyle yapılmıştır.

2.7. Yaprakların Kurutulması ve Öğütülmesi

Larvaların beslendiği ağaç türlerinden yaprak örnekleri alınarak folyolar içine konulacak iki ay laboratuvar şartlarında ve sonrasında ise beş gün süreyle 50 °C'de etüvde kurutulmuştur. Kurutulan yaprak

örnekleri alınarak öğütülmüş ve öğütülen yaprak örnekleri nylon torbalarda saklanmıştır.

2.8. Bitkideki Metal İyonlarının Analizi

Günlük olarak alınan bitki örnekleri etüvde kurutulduktan sonra 1 gr bitki örneği yaş yakmaya tabi tutularak daha sonra ICP-OES cihazı kullanılarak bitkilerdeki metal iyonlarının analizi yapılmıştır.

2.9. İstatistik Analizler

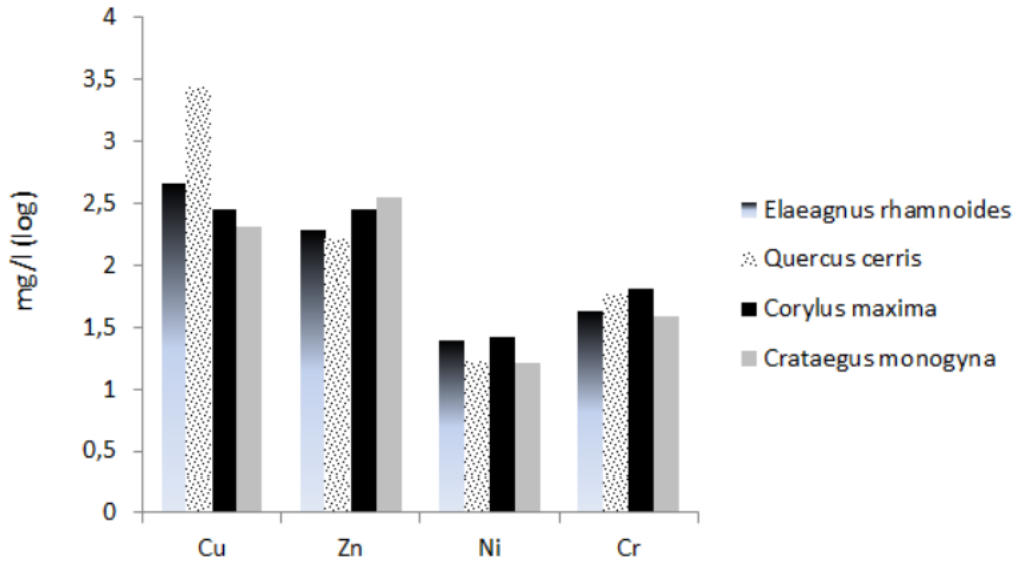
M. neustria larvalarının 4 farklı bitkiye göre hayatta kalma oranları arasındaki ilişki için Kaplan-Meier Yaşam Analizi testlerinden Log Rank testi kullanılmıştır. Beslenme deneylerinden elde edilen hemosit sayısını ve enzim aktivasyonunu tespit etmek için ANOVA Duncan testi kullanılmıştır. Kontrol grubu ile enfekte edilen larvaların hemosit sayısını ve enzim aktivasyonunu tespit etmek için bağımsız iki örneklem t testi kullanılmıştır.

3. Bulgular

ICP-OES cihazı kullanılarak bitkilerdeki krom (Cr), nikel (Ni), bakır (Cu) ve çinko (Zn) ağır metal iyonlarının miktarları tespit edilmiştir. 4 bitki türü içinde krom miktarı en yüksek bitki *C. maxima*'dir. En düşük miktar ise *C. monogyna*'da bulunmuştur.

En düşük nikel miktarı *C. monogyna* bitkisinden elde edilmiştir. Bakır miktarı en yüksek bitki *Q. cerris*'tir. Bu bitkide diğer bitkilere göre yaklaşık 25 kat daha fazla bakır olduğu tespit edilmiştir. Çinko miktarı en yüksek bitki *C. monogyna*'dır. En düşük miktarlar ise *Q. cerris* ve *E. rhamnoides* bitkilerinden elde edilmiştir. Bitkilerde bulunan krom, nikel, çinko ve bakırın logaritmik miktarları (log₁₀) Şekil 1'de gösterilmiştir. Bakteri ile muamele edilmiş dört farklı bitki türü ile beslenen *M. neustria* larvalarının (her grup için 50 larva) 10 günlük işlem süresince hayatta kalma analiz sonuçlarına (Kaplan Meier Testi) göre, *E. rhamnoides* bitkisiyle beslenen larvalarda hayatta kalma oranı % 68, *Q. cerris* ile beslenenlerde % 14, *C. maxima* ile beslenenlerde % 30 ve *C. monogyna* ile beslenenlerde % 6 olarak tespit edilmiştir. Hayatta kalma oranlarının Log Rank testine göre sonuçları Çizelge 1'de gösterilmiştir. Kontrol grubu larvalarında ise *E. rhamnoides* bitkisiyle beslenen larvalarda hayatta kalma oranı % 98, *Q. cerris* ile beslenenlerde % 84, *C. maxima* ile beslenenlerde % 90 ve *C. monogyna* ile beslenenlerde % 84 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile enfekte olan grup arasındaki hayatta kalma oranları Şekil 2'de gösterilmiştir.

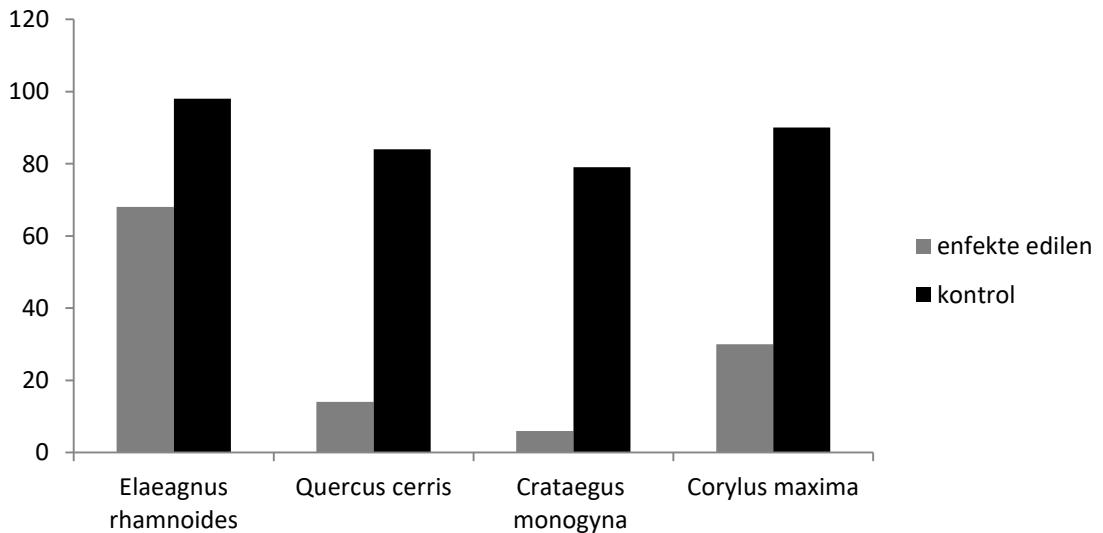
Enfekte edilen larvaların olduğu grupta en yüksek katalaz aktivitesi *Q. cerris* ile beslenen larvalarda gözlenmiştir. En düşük katalaz aktivitesi ise *E. rhamnoides* bitkisiyle beslenen larvalardan elde edilmiştir. Ayrıca enfekte *E. rhamnoides* ile beslenen larvalarda katalaz aktivitesi kontrole kıyasla düşüktür.



Şekil 1. *Quercus cerris*, *Elaeagnus rhamnoides*, *Corylus maxima* ve *Crataegus monogyna*'da bulunan krom, nikel, çinko ve bakırın logaritmik (log) miktarları

Çizelge 1. Bakteri ile enfekte edilmiş larvaların beslendikleri bitkilere göre hayatta kalma oranlarının (Log Rank) karşılaştırılması

Plants	<i>E. rhamnoides</i>		<i>Q. cerris</i>		<i>C. maxima</i>		<i>C. monogyna</i>	
	Chi-Square	P	Chi-Square	P	Chi-Square	P	Chi-Square	P
<i>E. rhamnoides</i>			8.050	0.003	3.543	0.043	9.523	0.003
<i>Q. cerris</i>	8.050	0.003			0.891	0.317	0.178	0.621
<i>C. maxima</i>	3.543	0.043	0.891	0.317			1.649	0.177
<i>C. monogyna</i>	9.523	0.003	0.178	0.621	1.649	0.177		



Şekil 2. Kontrol grubu ve bakteri ile enfekte edilen larvalar arasındaki hayatta kalma oranları

Enfekte edilen gruplar arasında katalaz aktivitesi bakımından ANOVA Duncan testi sonuçlarına (df=39, F=2686.6, P<0.001) göre farklılık olduğu bulunmuştur. En yüksek glutatyon peroksidaz aktivitesi *C. monogyna* ile beslenen larvalarda gözlenmiştir. En düşük glutatyon peroksidaz aktivitesi ise *E. rhamnoides* bitkisiyle beslenen larvalarda gözlenmiştir. Bu farklılıklar arasında sadece enfekte *C. maxima* ile beslenen larvalarda kontrole kıyasla daha düşük bir glutatyon peroksidaz aktivitesi elde edilmiştir. Enfekte edilen gruplar arasında glutatyon peroksidaz aktivitesi bakımından ANOVA Duncan testi sonuçlarına (df=39, F=79099.6, P<0.001) göre farklılık olduğu bulunmuştur. En düşük süperoksit dismutaz aktivitesi *E. rhamnoides* bitkisiyle beslenen larvalarda, en yüksek *C. monogyna* bitkisiyle beslenen larvalarda bulunmuştur. Enfekte edilen gruplar arasında süperoksit dismutaz aktivitesi bakımından ANOVA Duncan testi sonuçlarına (df=39, F=611.5, P<0.001) göre farklılık olduğu bulunmuştur. Enfekte edilen larvalarda SOD aktivitesi kontrollerine kıyasla daha yüksektir. Toplam hemosit sayısı en yüksek *E. rhamnoides* bitkisiyle beslenen larvalarda, en düşük *C. monogyna* bitkisiyle beslenen larvalarda ortaya çıkmıştır. Toplam hemosit sayısı bakımından gruplar arasında ANOVA Duncan testi sonuçlarına (df=39, F=4106.5, P<0.001) göre farklılık olduğu bulunmuştur.

Kontrol grubu larvalarda en yüksek katalaz aktivitesi *E. rhamnoides* ile beslenen larvalarda gözlenmiştir. En düşük katalaz aktivitesi ise *C. maxima* bitkisiyle beslenen larvalardan elde edilmiştir. Enfekte edilen gruplar arasında katalaz aktivitesi bakımından ANOVA Duncan testi sonuçlarına (df=39, F=4630.1, P<0.001) göre farklılık olduğu bulunmuştur. En yüksek glutatyon peroksidaz aktivitesi *C. monogyna* ile beslenen larvalarda gözlenmiştir. En düşük glutatyon peroksidaz aktivitesi ise *E. rhamnoides* bitkisiyle beslenen

larvalarda gözlenmiştir. Enfekte edilen gruplar arasında glutatyon peroksidaz aktivitesi bakımından ANOVA Duncan testi sonuçlarına (df=39, F=78112.2, P<0.001) göre farklılık olduğu bulunmuştur. En düşük süperoksit dismutaz aktivitesi *C. monogyna* bitkisiyle beslenen larvalarda, en yüksek *C. maxima* bitkisiyle beslenen larvalarda bulunmuştur. Enfekte edilen gruplar arasında süperoksit dismutaz aktivitesi bakımından ANOVA Duncan testi sonuçlarına (df=39, F=1081.7, P<0.001) göre farklılık olduğu bulunmuştur. ANOVA Duncan testi sonuçlarına (df=39, F=1081.7, P<0.001) Toplam hemosit sayısı en yüksek *E. rhamnoides* bitkisiyle beslenen larvalarda, en düşük *C. monogyna* bitkisiyle beslenen larvalarda ortaya çıkmıştır. Toplam hemosit sayısı bakımından enfekte edilen gruplar arasında ANOVA Duncan testi sonuçlarına (df=39, F=117.2, P<0.001) göre farklılık olduğu bulunmuştur ve bu farklılık enfekte gruplarda artan hemosit sayısı şeklindedir.

Katalaz aktivitesi karşılaştırıldığında *E. rhamnoides*, *C. maxima* ve *C. monogyna* ile beslenen kontrol ve enfekte edilen larvaların aktivitelerinde farklılık olduğu, *Q. cerris*'te ise kontrol ve enfekte edilen larvalar arasında farklılık olmadığı bulunmuştur. İki örneklem t testi sonuçları Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Glutatyon peroksidaz aktivitesi bakımından kontrol ve enfekte edilen gruplar arasında farklılık olduğu bulunmuştur. İki örneklem t testi sonuçları Çizelge 3'de gösterilmiştir.

Süperoksit dismutaz aktivitesi bakımından kontrol ve enfekte edilen gruplar arasında farklılık olduğu bulunmuştur. İki örneklem t testi sonuçları Çizelge 4'de gösterilmiştir.

Toplam hemosit sayısı kontrol ve enfekte edilen gruplar arasında farklıdır. İki örneklem t testi sonuçları Çizelge 5'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Beslendikleri bitki türlerine göre enfekte edilen ve kontrol grubu larvalarındaki katalaz aktivitelerinin t testi sonuçları

Larvaların beslendiği bitkiler	Gruplar	Ortalama±Standart hata (Iu/mgprotein/ml x 10 ³)	t	P
<i>Elaeagnus rhamnoides</i>	Enfekte edilen	234.8±1.5	-18.3	<0.001
	Kontrol	422.6±10.8		
<i>Quercus cerris</i>	Enfekte edilen	406.3±1.5	1.5	0.145
	Kontrol	403±1.5		
<i>Corylus maxima</i>	Enfekte edilen	267.9±1.1	-42.3	<0.001
	Kontrol	200±1.1		
<i>Crataegus monogyna</i>	Enfekte edilen	306.1±1.5	-7.6	<0.001
	Kontrol	290±1.4		

Çizelge 3. Beslendikleri bitki türlerine göre enfekte edilen ve kontrol grubu larvalarındaki glutatyon peroksidaz aktivitelerinin t testi sonuçları

Larvaların beslendiği bitkiler	Gruplar	Ortalama±Standart hata (Iu/mgprotein/ml x 10 ³)	t	P
<i>Elaeagnus rhamnoides</i>	Enfekte edilen	2363.5±1.8	-124.3	<0.001
	Kontrol	2054.3±1.8		
<i>Quercus cerris</i>	Enfekte edilen	3404±2	-112.5	<0.001
	Kontrol	3080±2.1		
<i>Corylus maxima</i>	Enfekte edilen	3104.9±2.9	-99.1	<0.001
	Kontrol	2705.6±2.8		
<i>Crataegus monogyna</i>	Enfekte edilen	3760±1.6	-147.4	<0.001
	Kontrol	3434±1.5		

Çizelge 4. Beslendikleri bitki türlerine göre enfekte edilen ve kontrol grubu larvalarındaki süperoksit dismutaz aktivitelerinin t testi sonuçları

Larvaların beslendiği bitkiler	Gruplar	Ortalama±Standart hata (Iu/mgprotein/ml x 10 ³)	t	P
<i>Elaeagnus rhamnoides</i>	Enfekte edilen	244±0.8	-36.4	<0.001
	Kontrol	201.9±0.8		
<i>Quercus cerris</i>	Enfekte edilen	263.1±0.7	-42.4	<0.001
	Kontrol	215.1±0.8		
<i>Corylus maxima</i>	Enfekte edilen	281.1±0.9	-19.2	<0.001
	Kontrol	248.1±1.5		
<i>Crataegus monogyna</i>	Enfekte edilen	305.1±1.5	-81	<0.001
	Kontrol	166.1±0.9		

Çizelge 5. Beslendikleri bitki türlerine göre enfekte edilen ve kontrol grubu larvalarındaki hemosit miktarları t testi sonuçları

Larvaların beslendiği bitkiler	Gruplar	Ortalama±Standart hata (5 µl/n)	t	P
<i>Elaeagnus rhamnoides</i>	Enfekte edilen	180±0.5	-13.2	<0.001
	Kontrol	169.5±0.6		
<i>Quercus cerris</i>	Enfekte edilen	172.3±0.6	-93.7	<0.001
	Kontrol	90.7±0.6		
<i>Corylus maxima</i>	Enfekte edilen	170.1±0.5	-81.6	<0.001
	Kontrol	113.7±0.4		
<i>Crataegus monogyna</i>	Enfekte edilen	165.2±0.6	-123.1	<0.001
	Kontrol	72±0.5		

4. Tartışma

Sonuçlarımız, bir bakteri türü ile enfekte edilmiş böcek larvalarının beslendiği bitki yapraklarındaki metal içeriğinin hayatta kalmaya olan etkisini göstermektedir. Yanar ve ark., (2017) *B. thuringiensis* ile enfekte edilen *Lymantria dispar* larvalarında en yüksek hayatta kalma oranının *E. rhamnoides* ile beslenen larvalardan, en yüksek ölüm oranının ise *C. monogyna* ile beslenen larvalardan elde edildiğini bulmuştur. Bu bulgular bizim sonuçlarımızla enfeksiyon sonrası hayatta kalma oranları bakımından örtüşmektedir. Ağır metaller böceklerin büyümesine, beslenmesine, üremesine ve hayatta kalma başarısına olumsuz etki edebilmektedir (Butler ve ark., 2009). Diğer bitkilere göre *C. monogyna* bitkisinde çinkonun yüksek olması bu bitki ile beslenen larvalardaki yüksek ölüm oranının sebebi olabilir.

Bitki mineralli beslenmenin patojenlere karşı savunmada rol oynayabileceği kabul edilmiştir (Boyd ve ark., 1994). Çeşitli böcek türlerinin laboratuvar şartlarında *B. thuringiensis* toksinlerine karşı direnç mekanizmaları geliştirdiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (McGaughey ve Beeman, 1988; Gelernter, 1997). Larvalar tarafından alınan *B. thuringiensis* sporlarının rolü bakterinin yoğunluğuna, tipine, Cry toksinlerinin konsantrasyonuna, farklı kombinasyonlarına ve türüne bağlı olarak büyük oranda değişebilmektedir (Hansen ve Salamitou, 2000).

Konak larvaların enfeksiyona karşı koyma ve savunma yeteneği, konakların beslenme durumuna bağlıdır (Chandra, 1996; Lochmiller ve Deerenberg 2000; Coop ve Kyriazakis 2001). En fazla bakır miktarına sahip *Q. cerris* bitkisinde beslenen enfekte larvaların hayatta kalma oranları oldukça düşüktür. Cheruiyot ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, artan miktarlarda nikel, çinko ve bakır kullanan tercihsiz beslenme deneylerinde *Spodoptera exigua*'nın larval ölüm oranında artış meydana geldiği bulunmuştur. *Pieris rapae* larvaları ile yapılan bir çalışmada, yüksek miktarda nikel içeren *Thlaspi montanum* ile beslenen larvalarının tümünün öldüğü bulunmuştur (Boyd ve Martens, 1994). Nikel miktarı en düşük bitki olan *C. monogyna* ile beslenen larvalarda hayatta kalma oranının en düşük seviyede olduğu bulunmuştur.

Tucker ve ark. (2004), *Bombyx mori*'de kromun hemolenf katalaz aktivitesini arttırdığını, bunun kromun etkisiyle larvaların oksijen tüketiminde meydana gelen değişmelerden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Katalaz enzim aktivitesi enfeksiyonlu gruplar içerisinde en yüksek 2. krom miktarına sahip olan *Q. cerris* bitkisi ile beslenen larvalarda en yüksek iken, *E. rhamnoides* ile beslenen larvalarda en düşüktür. Bu durum farklı metallerin enfeksiyonla beraber katalaz aktivitesinde farklı sonuçlar ortaya çıkarabileceği şeklinde yorumlanabilir. Bakır ve nikelin *Epirrita autumnata*'nın bağışıklık fonksiyonlarına direkt etkisi olduğu gösterilmiştir (van Ooik ve ark., 2007). Sonuçlarımıza göre en yüksek bakır içeren *Q. cerris* bitkisi ile beslenen

larvalarda katalaz enziminin diğer bitkilerle beslenen larvalara göre yüksek olduğu bulunmuştur.

Omurgasız bağışıklık fonksiyonu üzerine kimyasalların etkisi alınan kimyasalların izlediği yola, biyoaktivasyon yöntemlerine, biyotransformasyonlarına ve immunotoksik bileşiklerin atılışına ve diğer sublethal toksik etkilerin immunotoksik dozla ilişkisi gibi bazı özelliklere bağlıdır (Galloway ve Depledge, 2001). *Galleria mellonella*'da bakteriyel enfeksiyon sonucu süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon S-transferazlar (GST) ve malondialdehid (MDA) düzeyinin enfeksiyonun ilk günü arttığı, buna karşın katalaz aktivitesinin bundan etkilenmediği belirtilmiştir (Dubovskiy ve ark., 2011). Ahmad ve Pardini (1990), böceklerin memelilerle karşılaştırıldığında daha yüksek oranda katalaz aktivitesine sahip olduklarını ve bu nedenle oksidatif stres oluşturan dış etkenlerin bu aktiviteyi nadiren değiştirdiğini, böceklerde katalaz aktivitesinin dış etkenlerden çok iç etkenlere ve besinsel faktörlere bağlı olarak değişebileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada en yüksek çinko miktarına sahip olan *C. monogyna* ile beslenen larvalarda glutatyon peroksidaz aktivitesi en yüksektir. En düşük glutatyon peroksidaz aktivitesi ise yüksek nikel ve düşük çinko miktarına sahip olan *E. rhamnoides* ile beslenen larvalarda olduğu bulunmuştur.

Metallerin oksidatif stres ve lipit peroksidasyonuna neden olduğu bilinir (Felton ve Summers, 1995; Chrasica ve ark., 1996). *G. mellonella* larvalarında düşük dozdaki malation konsantrasyonunun (0.01, 0.1 ve 1 ppm) süperoksit dismutaz aktivitesini kontrole göre önemli ölçüde arttırdığı ve ergin ömür uzunluğu ve fertilité ile süperoksit dismutaz aktivitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Büyükgüzel, 2006). Bu çalışmada en yüksek çinko içeren *C. monogyna* ile beslenen enfekte edilmiş larvalarda süperoksit dismutaz aktivitesinin en yüksek değerinde olduğu bulunmuştur. Bolter ve Chefurka (1990), fosfin insektisitine maruz kalan *Sitophilus granarius* larvalarında süperoksit dismutaz aktivitesinin arttığını; bununla birlikte, katalaz ve peroksidaz aktivitesinin azaldığını rapor etmişlerdir.

Yüksek nikel ve bakır miktarına sahip *E. rhamnoides* ile beslenen larvalarda hemosit sayısının en yüksek olduğu bulunmuştur. En düşük hemosit sayısı ise nikel ve bakır miktarının en az olduğu *C. monogyna* bitkisi ile beslenen larvalarda bulunmuştur.

5. Sonuç

Sonuç olarak, *B. thuringiensis kurstaki*'nin *M. neustria* larvaları üzerindeki olumsuz etkisi açıkça ortaya konmuştur. Böceklerin ise bakteriye karşı savunmasız olmadığı görülmektedir. Bu çalışmada, bakteriye karşı savunmada bitkilerin metal içeriklerinin etkisi vurgulansa da bu ilişkinin oldukça karmaşık olduğu görülmektedir. Bitkilerdeki metal içeriklerinin tek başına etkisinden çok sinerjik bir etkiyi düşünmek belki de daha doğru olacaktır. Bundan sonraki araştırmalarda bu konuya odaklanan çalışmalar bu durumu daha açık

şekilde ortaya koyacaktır. Ayrıca, sonraki çalışmalarda özellikle bağışıklık sisteminde görevli enzimlerin besindeki moleküller tarafından nasıl etkilendiği ile ilgili çalışmalar yapmak bu kompleks canlıların mekanizmalarını daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir. Bu kadar olumsuz etkenlere rağmen böceklerin hala hayatta kalabilmeleri onların ne kadar güçlü ve kompleks canlılar olduğunu göstermektedir.

Kaynaklar

- Ahmad, S., Pardini, R.S., 1990. Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radical Biology and Medicine*, 8: 401-403.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen T. M., 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 7915-7922.
- Bodenheimer, F. S., 1958. Türkiye’de Ziraate ve Ağaçlara Zararlı Olan Böcekler ve Bunlarla Savaş Hakkında bir Etüt. (Çeviren: N. Kenter), Bayur Matbaası, Ankara, 320 s.
- Bolter, C. J., Chefurka, W., 1990. The effect of phosphine treatment on superoxide dismutase, Catalase, and peroxidase in the granary weevil, *Sitophilus granarius*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 36 (1): 52-60.
- Boyd, R. S., 2010. Heavy metal pollutants and chemical ecology: Exploring new frontiers. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 46-58.
- Boyd, R. S., Martens, S. N., 1994. Nickel hyperaccumulated by *Thlaspi montanum* var. *montanum* is acutely toxic to an insect herbivore, *Oikos*, 70: 21-25.
- Boyd, R. S., Shaw, J. J., Martens S. N., 1994. Nickel hyperaccumulation defends *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae) against pathogens. *American Journal of Botany*, 81(3): 294-300.
- Butler, D. C., Trumble, J. T., 2008. Effects of pollutants on bottom-up and top-down processes in insect-plant interactions. *Environmental Pollution*, 156: 1-10.
- Butler, C.D., Beckage, N. E., Trumble J. T. 2009. Effects of terrestrial pollutants on insect parasitoids. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 1111-1119. doi.org/10.1897/08-440.1
- Büyükgüzel, K., 2006. Malathion-induced oxidatif stress in a parasitoid wasp: Effect on adult emergence, longevity and oxidative and antioxidative response of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Economic Entomology*, 99(4): 1225-1234.
- Chandra, R. K., 1996. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93(25): 14304-14307..
- Cheruiyot, D.J., Boyd, R. S., Moar, W. J., 2013. Exploring lower limits of plant elemental defense by cobalt, copper, nickel and zinc. *Journal of Chemical Ecology*, 39 (5): 666-674.
- Chrascina, M., Kafel, A., Migula, P., 1996. Patterns of detoxifying enzymes in larval stage of *Smerinthus ocellatus* L. exposed to cadmium, tocopherol or quercetin. *Studia Societatis Scientiorum Torunensis*, 4: 31-37.
- Coop, R. L., Kyriazakis, I., 2001. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends in Parasitology*, 17(7): 325-330.
- Çanakçıoğlu, H., Mol, T., 1998. Orman Entomolojisi. İstanbul Üniv. Orman Fak. Yayın. 451 pp.
- Deaton, C.M., Marlin, D.J., 2003. Exercise-Associated Oxidative Stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2 (3): 278-291.
- Demirbağ, Z., Nalçacıoğlu R., Katı H., Demir, İ., Sezen, K., Ertürk, Ö., 2008. Entomopatogenler ve Biyolojik Mücadele, Sayfa 143, Esen Ofset matbaacılık, Trabzon.
- Dubovskiy, I. M., Grizanova, E.V., Ershova, N.S., Rantala, M. J., Glupov, V. V., 2011. The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Chemosphere*, 85 (1): 92-96.
- Duthie, G. G., Wahle, K.W.J., James, W. P. T., 1989. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutrition Research Reviews*, 2 (1): 51-62.
- Felton, G.W., Summers C.B., 1995. Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29 (2): 187-197.
- Flohé, L., Ötting, F., 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology*, 105: 93-104.
- Florea, A.M., Büsselberg, D., 2006. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *Biometals*, 19 (4): 419-427.
- Freeman, B. A., Crapo, J. D., 1980. Free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation*, 47 (4): 26-412.
- Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrate: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology*, 10 (1): 5-23.
- Garewal, H. S., 1997. Antioxidants and disease prevention. Florida: CRC Press LLC, 3-19.
- Gelernter, W.D., 1997. Resistance to microbial insecticides: The scale of the problem and how to manage it. In "Microbial Insecticides: Novelty or Necessity?" (H. F. Evans, chair), Proc. Br. Crop Prot. Council Symp., 68: 201-212.
- Gill, S. S., Cowles E. A., Pietranonio P. V., 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*, 37, 615-634. https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.003151.
- Hansen, B.M., Salamitou S., 2000. Virulence of *Bacillus thuringiensis*, In: Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application, Kluwer Academic Publishers, London.
- Harvey, W.R., Cioffi M., Wolfersberger M. G., 1986. Transport physiology of lepidopteran midgut in relation to the action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Proc. IV Int. Colloq. Invertebr. Pathol.*, pp. 11-14.
- Heliövaara, K., Väisänen R., Kemppi E., 1989. Change of pupal size of *Panolis flammea* (Lepidoptera; Noctuidae) and *Bupalus piniarius* (Geometridae) in response to concentration of industrial pollutants in their food plant. *Oecologia*, 79 (2): 179-183. doi: 10.1007/BF00388475.
- Hofte, H., Whiteley, H. R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*, *Microbiol. Rev.*, 53, 242-255.
- İren, Z., 1977. Önemli Meyve Zararlıları, Yayılışları ve Mücadele Metotları. Ankara Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enst. Mesleki Eserler Serisi. No: 36.
- Jones, J.C., 1962. Current concepts concerning insect hemocytes. *American Zoologist*, 2: 209-246.
- Kansu, A., 1955. Orta Anadolu Meyve Ağaçlarında Zarar Veren Bazı Makrolepidoptera Türlerinin Evsafi ve Kısa Biyolojileri Hakkında Araştırmalar. İstiklal matbaası, Ankara
- Knowles, B.H., 1994. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal δ -Endotoxins. *Advances in Insect*

- Physiology, 24, 275-308. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2806\(08\)60085-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2806(08)60085-5).
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., Vail, P., 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control*, 21 (3): 230-248.
- Lawrence, R.A., Burk, R. F., 1976. Glutathione peroksidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71(4): 952-958.
- Lochmiller, R., Deerenberg, C., 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*, 88: 87-98. doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.880110.x.
- Lüch, H., 1963. In methods of enzymatic analysis 2nd edition Edn. Bergmeyer H.U., 885-888; Verlag Chemie New York, Weinheim and Academic Press.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erithro cuprein (Hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244: 6049-6055.
- McGaughey, W.H., Beeman, R.W., 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 81(1): 28-33. doi.org/10.1093/jee/81.1.28
- Probst, A., Bur, T., Crouau, Y., Bianco, A., Gandois, L., 2012. Toxicity of Pb and of Pb/Cd combination on the springtail *Folsomia candida* in natural soils: Reproduction, growth and bioaccumulation as indicators. *Science of the Total Environment*, 414: 187-197. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.10.029.
- Sekendiz, O. A., 1974. Türkiye Hayvansal Kavak Zararlıları Üzerine Araştırmalar. Karadeniz Teknik Üniv. Yay. No: 62, Orman Fak. Yay. No: 3, 194 s.
- Sharma, R. K., Agrawal, M., 2005. Biological effects of heavy metals: An overview. *Journal of Environmental Biology*, 26 (2 suppl): 301-313.
- Stone, D., Jepson, P., Laskowski, R., 2002. Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient of pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 132 (1): 105-112.
- Sun, H. X., Zhou, Q., Tang, W. C., Shu, Y. H., Zhang, G.R., 2008. Effects of dietary nickel on detoxification enzyme activities in the midgut of *Spodoptera litura* Fabricius larvae. *Chinese Science Bulletin*, 53 (21): 3324-3330.
- Tucker, F. B., Wang, K. X., Fang, J., Lu, S. L., 2004. Effect of chromium on hemolymph catalase activity and cocoon quality of two mulberry silkworm (*Bombix mori* L.) Races. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73 (3): 443-447.
- Tuna, S., 2007. Orta Anadolu süne, *Eurygaster maura* (Heteroptera: Scutellaridae) populasyonlarındaki esteraz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin elektroforetik analizi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- van Ooik, T., Pausio, S., Rantala, M. J., 2008. Direct effects of heavy metal pollution on the immune function of a geometrid moth, *Epirrita autumnata*. *Chemosphere*, 71(10): 1840-1844.
- van Ooik, T., Rantala, M. J., Saloniemi I., 2007. Diet-mediated effects of heavy metal pollution on growth and immune response in the geometrid moth *Epirrita autumnata*. *Environmental Pollution*, 145(1): 348-354. [doi:10.1016/j.envpol.2006.03.008](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.03.008).
- Yanar, O., Gömeç, S., Topkara, E. F., Solmaz, G., Demir, İ., 2017. The effect of plant quality on survival of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae infected by *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. kurstaki. *Applied Ecology and Environmental Research*, 15 (3): 837-847. doi.org/10.15666/aeer/1503_837847.