ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Benay TUNÇSOY

PYRIPROXYFEN VE *Bacillus thuringiensis* 'in *Galleria mellonella* L.' nin OKSİDATİF STRES DÜZEYİ, ENZİMATİK ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ VE HEMOSİT SAYILARINA ETKİLERİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2017

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PYRIPROXYFEN VE *Bacillus thuringiensis*'in *Galleria mellonella* L.'nin OKSİDATİF STRES DÜZEYİ, ENZİMATİK ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ VE HEMOSİT SAYILARINA ETKİLERİ

Benay TUNÇSOY

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez / /2017 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

…….	……..	…….
Yrd. Doç. Dr. Pınar ÖZALP	Prof. Dr. İskender EMRE	Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE
……..….	……..	
Prof. Dr. Bedii CİCİK	Prof. Dr. Ramazan BİLGİN	
ÜYE	ÜYE	

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof.Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) (Proje No: FEF2011D27) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (Proje No: 114Z023) tarafından desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

PYRIPROXYFEN VE *Bacillus thuringiensis'*in *Galleria mellonella* L.'nin OKSİDATİF STRES DÜZEYİ, ENZİMATİK ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ VE HEMOSİT SAYILARINA ETKİLERİ

Benay TUNÇSOY

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Pınar ÖZALP
Yıl: 2017, Sayfa: 165
Jüri : Yrd. Doç. Dr. Pınar ÖZALP
: Prof. Dr. İskender EMRE
: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL
: Prof. Dr. Bedii CİCİK
: Prof. Dr. Ramazan BİLGİN

Galleria mellonella L., pyriproxyfen ve *Bacillus thuringiensis*' nin LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışım halinde 24,48 ve 72 saatlik etkileri sonucunda, 5. evre larvaların hemolenf, orta barsak ve yağ dokusunda malondialdehid (MDA) miktarı, katalaz (CAT), superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-s-transferaz (GST), asetilkolinesteraz (AChE), sitokrom P450 (Cyt P450) aktiviteleri ile, total ve diferansiyel hemosit sayıları üzerine etkileri incelenmiştir. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis'*in etkisinde, larvaların hemolenf, orta barsak ve yağ dokusunda antioksidan ve detoksifikasyon enzim aktiviteleri ile MDA seviyesinde uygulama süresine ve doku farklılıklarına bağlı olarak değişimler belirlenmiştir. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in uygulanması sonucunda total hemosit sayısında, uygulamadan 24 saat sonra azalma, 48 ve 72 saat sonra ise artış meydana gelmiştir. Diferansiyel hemosit sayısı üzerine etkilerinde ise, prohemosit, plazmatosit, granülosit, sferülosit ve önositoid sayılarında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulamasına ve uygulama zamanına bağlı olarak değişiklikler meydana geldiği belirlenmiştir. Bu çalışma ile, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulamaları sonucu, *G. mellonella* larvalarında biyokimyasal ve fizyolojik tepkilere yol açtığı ortaya konmuştur. Ayrıca, larvanın hemosit sayılarında da meydana gelen değişimler sonucunda bu insektisitlerin immun savunma üzerinde de etkili olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan Savunma, *Bacillus thuringiensis*, Detoksifikasyon, *Galleria mellonella*, İmmun savunma, Pyriproxyfen

ABSTRACT

PhD. THESIS

EFFECTS OF PYRIPROXYFEN AND *Bacillus thuringiensis* ON OXIDATIVE STRESS LEVEL, ENZYMATIC ANTIOXIDANT DEFENCE SYSTEM AND HEMOCYTE NUMBERS OF *Galleria mellonella* L.

Benay TUNÇSOY

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUE OF NATURAL APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Pınar ÖZALP
Year: 2017, Page: 165
Jury : Asst. Prof. Dr. Pınar ÖZALP
: Prof. Dr. İskender EMRE
: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL
: Prof. Dr. Bedii CİCİK
: Prof. Dr. Ramazan BİLGİN

Effects of LD_{50} values of pyriproxyfen and *Bacillus thuringiensis* applied singly and in mixture on malondialdehyde (MDA) levels, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-s-transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE), cytochrome P450 (Cyt P450) enzyme activities in hemolymph, midgut and fat body and total and differential hemocyte counts of fifth instar larvae of *Galleria mellonella* at 24, 48 and 72 hours were investigated. Effects of these insecticides on antioxidant and detoxification enzyme activities were changed depends on exposure time and differences of tissues. Exposure to pyriproxyfen and *B. thuringiensis* decreased total hemocyte counts at 24 hours whereas increased at 48 and 72 hours. Differential hemocyte counts which are prohemocytes, plasmotocytes, granulocytes, spherulocytes, eunocytoids were changed depends on exposure time and exposed to pyriproxyfen and *B. thuringiensis*. The results of present study revealed that pyriproxyfen and *B. thuringiensis* can result reactions of biochemical and physiological of *G. mellonella*. Also, it was determined that pyriproxyfen and *B. thuringiensis* effected immune defense system of larvae by the alterations in hemocyte numbers.

Keywords: Antioxidant Defense, *Bacillus thuringiensis*, Detoxification, *Galleria mellonella*, Immune Defense, Pyriproxyfen

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Tarımsal alanlarda en önemli zararı oluşturan Lepidoptera ordosuna ait türlerle mücadelede, kimyasal insektisitler yerine son yıllarda sıklıkla biyolojik ve hedef türe özgü insektisitlerin kullanımında artış gözlenmektedir. Böcek türleri üzerinde etkin ve çevreye duyarlı bu insektisitlerin kullanımının geliştirilebilmesi ve yarar sağlayabilmesi için zararlı türleri üzerinde fizyolojik ve immünolojik etkilerinin bilinmesi gerekmektedir.

G. mellonella L.' nin 5. evre larvalarına, pyriproxyfen ve *B.thuringiensis'* in tek başlarına ve birlikte kullanımı sonucunda hemolenf, orta barsak ve yağ dokusundaki antioksidan savunma sistemi, detoksifikasyon enzim aktivitesi ve MDA miktarı ile total ve diferansiyel hemosit sayıları üzerine etkilerinin incelendiği bu çalışmada, *B. thuringiensis* biyopreparatına karşı gelişen dirence çözüm yolunun bulunması, ayrıca bu zararlı tür ile mücadelede daha kısa sürede etki eden güvenilir metotların kullanımının tespiti amaçlanmıştır.

Bu amaç kapsamında, i) entegre mücadelede sıklıkla kullanılan pyriproxyfen ve *B. thuringiensis'* in *G. mellonella* larvalarında etkili LD_{50} değerlerinin tespiti, ii) belirlenen LD_{50} değerlerinin tek başlarına ve karışımlarının, böceklerde insektisitlere karşı gelişen direncin tespitinde kullanılan detoksifikasyon enzimlerinden GST, sitokrom P450 ve asetilkolinesteraz enzimlerine ve iii) böcekler insektisitlere maruz bırakıldığında vücutta oluşan serbest radikallerin yok edilmesinde görevli antioksidan savunma enzimlerinden SOD, CAT ve GPx üzerine ve MDA miktarına etkileri ile larvanın hemolenfinde immun savunmada görevli hemositler üzerine etkileri tespit edilmiştir.

Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis'* in *G. mellonella* larvaları için 72 saatlik etki süresinde LD_{50} değerleri sırasıyla 2385 μg ml^{-1} ve 359 μg ml^{-1} olarak belirlenmiştir. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis'* nin LD_{50} değerlerinin, SOD aktivitesinde ise, hemolenfte tüm uygulama gruplarında (pyirproxyfen, *B. thuringienisis* ve pyr+Bt), orta barsakta *B. thuringiensis* (Bt) uygulaması yapılan

grupta, yağ dokuda sadece karışım uygulaması (pyr+Bt) yapılan grupta artış miktarları önemli bulunmuştur.

Larvaların hemolenfindeki CAT aktivitesinde, uygulamadan 48 ve 72 saat sonra kontrol grubuna göre tüm uygulama gruplarında önemli bir artış gözlenmiştir. Orta barsakta, 48 saatlik etki süresinde kontrole göre artış gözlenirken, 72. saatte azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Larvaların yağ dokusundaki CAT aktivitesinde ise, 48. saatte kontrole göre insektisitlerin tek başına uygulanması sonucu artış gözlenirken, karışım uygulaması yapılan grupta azalma tespit edilmiştir. 72 saatlik etki süresinde ise, kontrole göre tüm uygulama gruplarında artış meydana gelmiştir.

GPx aktivitesinde, uygulamadan 72 saat sonra karışım uygulaması yapılan grupta artış meydana gelirken, orta barsakta aynı etki süresinde ***B. thuringiensis*** ve karışım uygulaması yapılan gruplarda azalma belirlenmiştir.

MDA seviyesinde, uygulamadan 72 saat sonra hemolenfte tüm uygulama gruplarında, orta barsakta ***B. thuringiensis*** ve karışım uygulaması yapılan gruplarda artış gözlenmiştir. Larvaların yağ dokusunda ise, uygulamadan 72 saat sonra tüm uygulama gruplarında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir.

G. mellonella larvalarında asetilkolinesteraz inhibisyonunun, sadece hemolenfte 24 ve 72. saatlerde ***B. thuringiensis*** ve orta barsakta 48. saatte pyriproxyfen uygulaması yapılan gruplarda meydana geldiği tespit edilmiştir. Yağ dokuda ise, 48. saatte pyriproxyfen ve karışım ile 72. saatte pyriproxyfen uygulaması yapılan gruplarda meydana geldiği belirlenmiştir.

GST aktivitesinde, uygulamadan 72 saat sonra hemolenfte pyriproxyfen ve ***B. thuringiensis*** uygulaması sonucunda artış meydana gelirken, karışım uygulamalarında azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Orta barsakta, 24 saatlik etki süresinde ***B. thuringiensis*** uygulaması yapılan grupta, 48 saatlik etki süresinde ise tüm uygulama gruplarında GST aktivitesinde önemli bir artış meydana gelmiştir. Yağ dokuda ise, 24 saatlik etki süresinde ***B. thuringiensis*** uygulaması

yapılan grupta, 72 saatlik etki süresinde tüm uygulama gruplarında azalma meydana gelmiştir.

Sitokrom P450 aktivitesinde ise, larvaların hemolenfinde uygulamadan 24 saat sonra pyriproxyfen uygulaması sonucunda artış, ***B. thuringiensis*** ve karışım uygulaması sonucunda ise azalma meydana gelmiştir. İnsektisitlerin 48 saatlik etki sürelerinde, pyriproxyfen uygulaması sonucunda sitokrom P450 aktivitesinde artış meydana gelirken, ***B. thuringiensis*** uygulaması sonucunda azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Uygulamadan 72 saat sonra, hemolenfte pyriproxyfen uygulaması sonucunda artış meydana gelirken, ***B. thuringiensis*** ve karışım uygulamalarında azalma tespit edilmiştir. Larvaların orta barsağında, tüm uygulama gruplarında sitokrom P450 aktivitelerinde artış meydana gelmiştir.

Pyriproxyfen ve ***B. thuringiensis'*** in tek başına ve karışım halindeki uygulamalarında total hemosit sayısında uygulamadan 24 saat sonra azalma, 48 ve 72 saat sonra ise artış meydana gelmiştir. Diferansiyel hemosit sayısı üzerine etkilerinde ise, prohemosit, plazmatosit, granülosit, sferülosit ve önositoid sayılarında pyriproxyfen ve ***B. thuringiensis*** uygulamasına ve uygulama zamanına bağlı olarak artış ve azalmalar meydana geldiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, doku farklılıklarından dolayı enzim aktiviteleri üzerinde etkileri farklı olsa da genel olarak karışımın etkisinde antioksidan ve detoksifikasyon enzimleri ile MDA seviyesinde artış meydana geldiği görülmüştür. Pyriproxyfen ve ***B. thuringiensis*** uygulamasının hemosit sayıları üzerinde etkilerinde ise, meydana gelen artış ve azalmaların hemolenfte toksisiteye bağlı olarak oluşan melanizasyon, enkapsülasyon ve fagositoz gibi savunma mekanizmalarının neden olduğu fikrini ortaya koymaktadır. Ayrıca, böceklerdeki endokrin hormonların da hemosit popülasyonlarını ve bu hücrelerin farklılaşmasını

düzenlemesinin, juvenil hormon analoğu pyriproxyfenin larvaların hemosit sayıları üzerinde etkili olmasının nedenini açıkladığı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın, *G. mellonella* ile mücadelede daha kısa sürede ve güvenilir sonuçların elde edilmesine, *B. thuringiensis* biyopreparatına karşı çıkabilecek olası direnç gelişimi ve çözüm yollarının belirlenmesi konusunda zirai mücadeleye ve moleküler düzeydeki çalışmalara yararlı olacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Her zaman benden desteğini, deney çalışmalarım sırasında yardımlarını ve tecrübesini esirgemeyen değerli hocam Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar ÖZALP' e teşekkür ederim. Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İskender EMRE, Prof. Dr. Ramazan BİLGİN, Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Bedii CİCİK ve Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL ve Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Mehmet SULANÇ hocalarıma teşekkür ederim. Ayrıca *G. mellonella* larvalarının hemosit tiplerinin tespitinde yardımlarını esirgemeyen Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Olga SAK' a teşekkür ederim.

Laboratuvar arkadaşlarım Süheyla İNKAYA ve Zehra BOLAT' a teşekkür ederim. Yüksek lisans ve doktora öğrenimim boyunca desteğini ve yardımlarını benden esirgemeyen eşim Mustafa TUNÇSOY ve ailesine çok teşekkür ederim. Benden tüm hayatım boyunca maddi manevi desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan annem Sezen SEZER, babam Akın SEZER ve kardeşim Bengü SEZER' e sonsuz teşekkürler.

Tezimin TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) tarafından desteklenen 114Z023 nolu "Pyriproxyfenin, *Galleria mellonella* L. Larvalarının Antioksidan Savunma Sistemi Ve Lipid Peroksidasyon Seviyesi Üzerine *Bacillus thuringiensis* ile Sinerjistik Etkilerinin Belirlenmesi" başlıklı 3001-Başlangıç AR-GE projesi kapsamında bilgiler içermesinden ötürü TÜBİTAK' a çok teşekkür ederim. Çalışmanın yürütülmesinde verdiği destekten dolayı Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ XII
ŞEKİLLER DİZİNİ XVIII
SİMGELER VE KISALTMALAR XXII
1. GİRİŞ 1
1.1. Böceklerdeki Antioksidan Savunma Sistemleri ve Direnç Mekanizmaları ... 4
1.2. Böceklerde bağışıklık sistemi 11
1.2.1. Humoral Bağışıklık 12
1.2.2. Hücresel Bağışıklık 14
1.2.2.1. Böceklerde Hemosit Tipleri 14
1.2.2.1.(1). Prohemositler 14
1.2.2.1.(2). Plazmatositler 15
1.2.2.1.(3). Granülositler 15
1.2.2.1.(4). Önositoidler 16
1.2.2.1.(5). Sferülositler 17
1.2.2.1.(6). Adipohemositler 17
1.2.3. Hematopoez 18
1.2.4. Hücresel Bağışıklık Tepkileri 19
1.2.4.1. Fagositoz 19
1.2.4.2. Nodül Oluşumu 19
1.2.4.3. Enkapsülasyon 20
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 23
3. MATERYAL VE METOD 35

3.1. Materyal 35
3.1.1. *Galleria mellonella* 35
3.1.2. *Bacillus thuringiensis* 36
3.1.3. Pyriproxyfen 37
3.2. Metod 38
3.2.1. *G. mellonella* Larvalarının Kitle Üretimi 38
3.2.2. İnsektisitlerin LD_{50} Değerlerinin Belirlenmesi 39
3.2.3. Deney sistemlerinin enzim aktivitelerinin tayini için hazırlanması ... 39
3.2.4. Dokuların İzolasyonu 41
3.2.5. Lipid Peroksidasyon Ürünü Olan Malondialdehid (MDA) Miktarının Tayini 43
3.2.6. Dokuların Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi 46
3.2.6.1. Süperoksit dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Tayini 46
3.2.6.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Tayini 49
3.2.6.3. Glutatyon peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Tayini 50
3.2.7. Detoksifikasyon Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi 52
3.2.7.1. Asetilkolinesteraz (AChE) Enzim Aktivitesinin Tayini 52
3.2.7.2. Sitokrom P450 (Cyt P450) Enzim Aktivitesinin Tayini 54
3.2.7.3. Glutatyon-s-transferaz (GST) Enzim Aktivitesinin Tayini 57
3.2.8. Total Protein Miktarının Belirlenmesi 58
3.2.9. *G. mellonella* Larvalarının Hemosit Tiplerinin Belirlenmesi 60
3.2.9.1. Diferansiyel Hemosit Sayısı 60
3.2.9.2. Total Hemosit Sayısı 61
3.2.10. İstatistiksel Analizler 62
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 63
4.1. Bulgular 63
4.1.1. İnsektisitlerin LD_{50} Değerlerinin Belirlenmesi 63
4.1.2. MDA Miktarı 64
4.1.3. Antioksidan Enzim Aktiviteleri 69

4.1.3.1. SOD Enzim Aktivitesi 69
4.1.2.2. CAT Enzim Aktivitesi 74
4.1.2.3. GPx Enzim Aktivitesi 78
4.1.4. Detoksifikasyon Enzim Aktivitelerinin Tayini 83
4.1.4.1. AChE Enzim Aktivitesi 83
4.1.4.2. GST Enzim Aktivitesi 87
4.1.4.3. Cyt P450 monooksijenaz Enzim Aktivitesi 92
4.1.5. *G. mellonella* Larvalarının Hemosit Tiplerinin Belirlenmesi 96
4.1.5.1. Total Hemosit Sayısı 98
4.1.5.2. Diferansiyel Hemosit Sayısı 100
4.2. Tartışma 108
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 129
KAYNAKLAR 133
ÖZGEÇMİŞ 165

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Pyriproxyfen'in ekotoksikolojik özellikleri 38
Çizelge 3.2. Homojenizasyon tamponu.....42
Çizelge 3.3. Standart çözeltiler.....44
Çizelge 3.4. Standart çözeltilerin ölçülmesi 45
Çizelge 3.5. Örneklerin MDA miktarlarının ölçülmesi 46
Çizelge 3.6. Ksantin oksidaz testi.....47
Çizelge 3.7. Örneklerin SOD aktivitelerinin ölçülmesi.....48
Çizelge 3.8. Örneklerin CAT aktivitelerinin ölçülmesi.....49
Çizelge 3.9. Kümen hidroperoksit testi 45
Çizelge 3.10. Örneklerin GPx aktivitelerinin ölçülmesi.....46
Çizelge 3.11. Örneklerin AChE aktivitelerinin ölçülmesi.....54
Çizelge 3.12. Örneklerin Cyt P450 aktivitelerinin ölçülmesi.....56
Çizelge 3.13. Örneklerin GST aktivitelerinin ölçülmesi 58
Çizelge 3.14. Standart protein çözeltileri 59
Çizelge 4.1. *G. mellonella* larvaları için pyriproxyfen biyodenemelerinin toksisite sonuçları.....63
Çizelge 4.2. *G. mellonella* larvaları için *B. thuringiensis* biyodenemelerinin toksisite sonuçları.....64
Çizelge 4.3. *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak MDA miktarı üzerine etkileri (Ort±S.H). 65
Çizelge 4.4. *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak MDA miktarı üzerine etkileri (Ort±S.H). 66

Çizelge 4.5. *G. mellonella*' nın yağ dokusunda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak MDA miktarı üzerine etkileri (Ort±S.H). 67
Çizelge 4.6. *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).....69
Çizelge 4.7. *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).....71
Çizelge 4.8. *G. mellonella*' nın yağ dokuda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).....72
Çizelge 4.9. *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).....74
Çizelge 4.10. *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).....75
Çizelge 4.11. *G. mellonella*' nın yağ dokuda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).....76

Çizelge 4.12. *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).....79
Çizelge 4.13. *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).....80
Çizelge 4.14. *G. mellonella*' nın yağ dokuda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).....81
Çizelge 4.15. *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak AChE aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H). 83
Çizelge 4.16. *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak AChE aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H). 84
Çizelge 4.17. *G. mellonella*' nın yağ dokusunda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının etkisinde süreye bağlı AChE aktiviteleri (Ort±S.H).....85
Çizelge 4.18. *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak GST aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H). 88

Çizelge 4.19. *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak GST aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H). 89
Çizelge 4.20. *G. mellonella*' nın yağ dokusunda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak GST aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H). 90
Çizelge 4.21. *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak Sitokrom P450 aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).....92
Çizelge 4.22. *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak Sitokrom P450 aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).....93
Çizelge 4.23. *G. mellonella*' nın yağ dokusunda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak Sitokrom P450 aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).....94
Çizelge 4.24. *G. mellonella*' nın son evre larvalarının hemolenfinde pyriproxyfen, *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak total hemosit sayısındaki değişimler (Ort±S.H).....99
Çizelge 4.25. *G. mellonella*' nın son evre larvalarının hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak plazmatosit sayısındaki değişimler (Ort±S.H).....101

Çizelge 4.26. *G. mellonella*' nın son evre larvalarının hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak granülosit sayısındaki değişimler (Ort±S.H).....102

Çizelge 4.27. *G. mellonella*' nın son evre larvalarının hemolenfinde pyriproxyfen, *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak prohemosit sayısındaki değişimler (Ort±S.H).....104

Çizelge 4.28. *G. mellonella*' nın son evre larvalarının hemolenfinde pyriproxyfen, *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak sferülosit sayısındaki değişimler (Ort±S.H).....105

Çizelge 4.29. *G. mellonella*' nın son evre larvalarının hemolenfinde pyriproxyfen, *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak önositoid sayısındaki değişimler (Ort±S.H).....107

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. *G. mellonella* larvaları ile bulaşık bal petekleri 2

Şekil 1.2. *B. thuringiensis* ile enfeksiyon sonucunda *G. mellonella* larvasında patojenin etki şekli.....4

Şekil 1.3. İnsektisitlerin detoksifikasyonuna etkili fizyolojik mekanizmalar.....8

Şekil 1.4. Böceklerde Hücresel Bağışıklık sisteminin anatomisi.....12

Şekil 1.5. Böceklerde bağışıklık etki mekanizmaları.....21

Şekil 3.1. *G. mellonella* larvaları 36

Şekil 3.2. İnsektisit uygulaması yapılan petekler.....40

Şekil 3.3. *G. mellonella* larvasının diseksiyonu.....41

Şekil 3.4. Ultrasonik homojenizatör.....42

Şekil 3.5. Homojenatların Sephadex® G-25 jel kolonlarında süzme işlemi.....43

Şekil 3.6. MDA standart grafiği.....45

Şekil 3.7. Protein derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki 60

Şekil 3.8. Neubauer Hemositometresi.....62

Şekil 4.1. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının 24, 48 ve 72 saat süreler etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak, yağ doku dokularındaki MDA miktarındaki değişimler (nmol/mg protein).....68

Şekil 4.2. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak, yağ dokularında 24, 48 ve 72 saat sürelerindeki SOD enzim aktivitesi (U mg^{-1} protein). 73

Şekil 4.3. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak, yağ dokularında 24, 48 ve 72 saat sürelerindeki CAT enzim aktivitesi (µmol dk^{-1} mg^{-1} protein). 78

Şekil 4.4. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak, yağ doku dokularında 24, 48 ve 72 saat sürelerindeki GPx enzim aktivitesi (nmol dk^{-1} mg^{-1} protein).....82

Şekil 4.5. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak ve yağ dokuda 24, 48 ve 72 saat sürelerindeki AChE aktivitesi (U/dk/mg protein).....87

Şekil 4.6. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak ve yağ dokusunda 24, 48 ve 72 saat sürelerindeki GST aktivitesi (mmol dk^{-1}.mg^{-1} protein).....91

Şekil 4.7. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak, yağ dokuda 24, 48 ve 72 saat sürelerindeki Sitokrom P450 aktivitesi (pmol/dk/mg protein). 95

Şekil 4.8. *G. mellonella* son evre larvalarının hemolenfinde plazmatosit ve granülosit hücreleri (Ölçü Barı: 10 μm; X100).....96

Şekil 4.9. *G. mellonella* son evre larvalalarının hemolenfinde Prohemosit ve önositoid hücreler (Ölçü Barı: 10 μm; X100). 97

Şekil 4.10. *G. mellonella* son evre larvalarının hemolenfinde sferülosit hücre (Ölçü Barı: 10 μm; X100).....97

Şekil 4.11. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki total hemosit sayısı.....99

Şekil 4.12. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde plazmatosit sayısı.....101

Şekil 4.13. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde granülosit sayısı 103
Şekil 4.14. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde prohemosit sayısı 104
Şekil 4.15. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde sferülosit sayısı.....106
Şekil 4.16. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde önositoid sayısı.....107

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: santigrad derece
cm	: santimetre
dk	: dakika
g	: relatif santrifüj kuvveti
gr	: gram
M	: molarite
mg	: miligram
ml	: mililitre
mm	: milimetre
mM	: milimolar
mmol	: milimol
nm	: nanometre
nmol	: nanomol
pmol	: pikomol
rpm	: dakikadaki devir sayısı
sn	: saniye
µl	: mikrolitre
4-HNE	: 4-hidroksi-2-nonenol
AChE	: asetilkolinesteraz
ACP	: Asit fosfataz
ALP	: Alkalen fosfataz
AMPs	: antimikrobiyal peptidler
BSA	: bovin serum albumin
CAT	: katalaz
CDNB	: 1-chloro-2,4-dinitrobenzen
DNA	: deoksiribonükleik asit
DNPH	: 2,4- dinitrofenilhidrazin

DTT : ditiyotreitol

DTNB : 5,5′-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)

EDTA : etilendiamintetraasetik asit

GPx (GSH-Px) : glutatyon peroksidaz

GR : glutatyon redüktaz

GSH : indirgenmiş gulutatyon

GSSG : okside glutatyon

GST : glutatyon-S-transferaz

HDL : Yüksek yoğunluklu lipoprotein

H_2O : su

H_2O_2 : hidrojen peroksit

IPM : entegre zararlı mücadelesi (ıntegrated pest management)

JH : jüvenil hormon

KCl : potasyum klorür

KH_2PO_4 : potasyum dihidrojen fosfat

K_2HPO_4 : dipotasyum hidrojen fosfat

LDL : Düşük yoğunluklu lipoprotein

$L^{\cdot}$: lipit radikali

LOO. : lipid peroksil radikali

LOOH : lipid hidroperoksidi

MDA : malondialdehit

NADPH : Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

NPV : nükleopolihedrovirüs

PNOD : 4-Nitroanisole

NaH_2PO_4 : sodyum dihidrojen fosfat

Na_2HPO_4 : disodyum hidrojen fosfat

NaOH : sodyum hidroksit

NaCl : sodyum klorür

Na_2EDTA : Di sodyum etilen diamin tetra asetik asit

$O_2^{\cdot -}$	: superoksit radikali
$OH^{\cdot}$	: hidroksil radikali
PBS	: fosfat tamponu
PRR	: pattern tanıma reseptörleri
PO	: fenoloksidaz
RNA	: ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferaz
RSSR/RSH	: okside thiol/redükte thiol
PMSF	: fenilmetilsülfonil florür
ppm	: milyonda bir
ROT	: reaktif oksijen türevi
SOD	: süperoksit dismutaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TBA	: tiyobarbitürik asit
TCA	: triklorasetik asit

1. GİRİŞ

Arıcılık, dünyada bilinen en eski tarımsal faaliyetlerden biridir. Ülkemiz coğrafi yapısı ve flora zenginliği açısından büyük bir potansiyele sahip olmasına rağmen, dünyada bal üretiminde ön sıralarda yer alamamaktadır. Bunun en önemli nedeni, hastalık ve zararlılar hakkında gerekli bilgiye sahip olunamaması, zamanında ve doğru müdahale yapılamamasıdır (Öztürk, 2001). Bu zararlıların en önemlilerinden biri Büyük balmumu güvesi *G. mellonella*'dır.

G. mellonella, kovanlarda ve depolarda peteklere zarar verir. Hayat döngüsünü 6 haftada tamamlayan bu tür, yumurtalarını kovanlarda arıların ulaşamayacağı yerlere bırakır, daha sonra yumurtadan çıkan larvalar peteklerde tüneller açar, bal ve petekle beslenir. Erginleri ise, ölmeden önce peteklere ağ örerek zarar verir (Ali ve ark, 1973). Sağlıklı ve güçlü kolonilerde *G. mellonella*, işçi arılarının zararlıyı baskılamaları sonucu, arıcılar tarafından fark edilmezken, çeşitli nedenlerle ergin işçi arı sayısı azalmış zayıf kolonilerde önemli ekonomik kayıplara neden olduğu ve arıların kovanı terk ettiği tespit edilmiştir (Sanford, 2003).

Arı kolonilerinde 1 gr balmumu üretimi için arıların 8,5 gr bal tüketmeleri gerektiği gerçeği düşünüldüğünde, zararlının arıcılık sektörüne verdiği ekonomik kaybın önemi daha kolay anlaşılabilir (Root, 1972). Bu zararlıya karşı dünyada, arıcılar tarafından kimyasal (aluminyum fosfit, metil bromid, etilendibromid, paradiklorobenzen (Naftalin), kükürt) ve fiziksel (soğuk-sıcak) uygulamalar kullanılmaktadır (Kumova ve Korkmaz, 2002).



Şekil 1.1. *G. mellonella* larvaları ile bulaşık bal petekleri (Garvey, 2014)

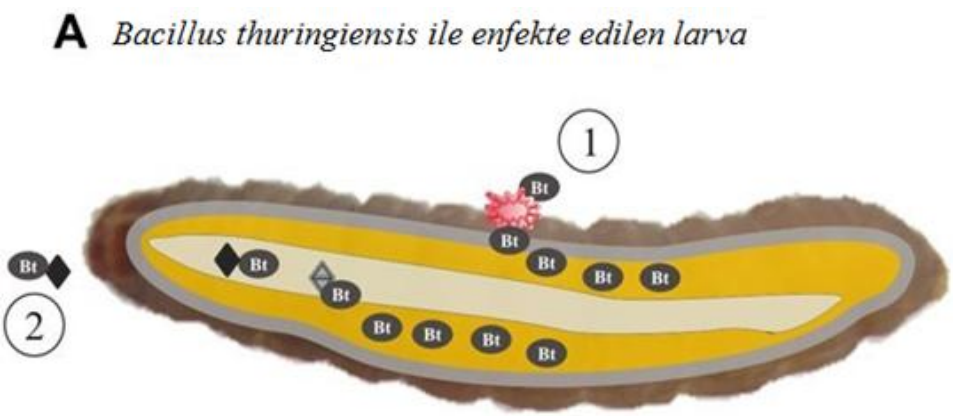
G. mellonella ile mücadelede kullanılan kimyasal insektisitlerin insan sağlığına olumsuz etkileri, peteklerde ve çevrede bulunan arazilerde yetişen ürünlerde kalıntı bırakması gibi sorunlardan dolayı, arıcıları entegre mücadeleye yöneltmiştir. Entegre mücadelede amaç, çevreye ve hedef olmayan canlılara zarar vermeden, mücadele yöntemlerinin birbiriyle uyum içerisinde kullanılarak uygulanmasıdır.

Zararlı böcek türleriyle mücadelede, bitkisel kökenli insektisitler, hormonlar ve analoglarının kullanılmasının yanı sıra, predatör ve parazit böcekler, entomopatojenler ve bazı mikroorganizmalar da kullanılmaktadır. Bu mücadele yöntemlerinden en önemlileri, böcek büyüme düzenleyicilerinin ve mikrobiyal insektisitlerin kullanılmasıdır.

Böcek büyüme düzenleyicileri, zararlı böceklerde gelişimi düzenleyen ve zararlılarla entegre mücadelede önemli rol oynayan bileşikler olup, juvenil hormon analoglarını ve kitin sentez inhibitörlerini kapsamaktadır. Çalışmada kullandığımız juvenil hormon analoğu olan pyriproxyfen, fizyolojik süreçlerde juvenil hormon gibi davranarak embriyogenez, metamorfoz ve ergin oluşumunu engellemektedir

(Ishaaya ve Horowitz, 1992). Arthropodalara karşı mücadelede kullanılan pyriproxyfen, piridin kökenli bir insektisit olup, ilk olarak 1996 yılında Amerika'da pamuk tarlalarında beyaz sineklerle mücadelede kullanılmıştır.

Zararlılarla mücadele kapsamında kullanılan bir diğer yöntem, patojenler ile yapılan mücadeledir. Patojenler, böcek hastalık etmenleri yani "Entomopatojen Mikroorganizmalar" olarak adlandırılmakta ve bakteriler, funguslar, virüsler, protozoa ve nematodlar olarak gruplandırılmaktadır. Biyolojik mücadelede en çok, bakteri ve virüsler ön plana çıkmaktadır. Bu mücadelede kullanılan mikrobiyal insektisitlerin en önemlisi, ***B. thuringiensis*** etkili biyopreparatlardır. Fakültatif, anaerob ve Gr (+) bir bakteri olan ***B. thuringiensis***, çoğunlukla Lepidoptera ve Diptera larvalarına karşı kullanılmaktadır (Martinez ve ark, 2004). ***B. thuringiensis*** kurstaki ırkı, özellikle Lepidoptera zararlılarında etkilidir. Bakteri, sporulasyonu anında böcekler tarafından yenildiğinde toksik maddelere dönüşen, protein yapıda kristaller oluşturmaktadır. Bu kristaller, içerdikleri endotoksinler ile böceklerin mide çeperini oluşturan hücreleri tahrip ederek, sindirimi engellemektedir. Bu toksinlerin her biri, farklı böcek gruplarına özelleşmiş olup, yakın akraba canlılara bile etki göstermemektedir. Bu, günümüzde gelişen tarımsal savaşta son derece önemli bir özelliktir. Bunun yanında doğadan elde edilmiş olan bu bakterinin, insanlara bir etkisinin olmaması da önemli bir avantajdır.



Şekil 1.2. *B. thuringiensis* ile enfeksiyon sonucunda *G. mellonella* larvasında patojenin etki şekli (A) *B. thuringiensis* sporları ve parasporal kristalleri içeren toksinler larva tarafından sindirilir. Barsakta kristaller çözünür ve parçalanarak aktive edilen toksinler, barsağın iç membranına bağlanır. Barsağın, delinmesinden sonra, bakteri hücreleri üreyeceği yer olan hemolenfe giriş sağlamış olur. Ayrıca bakteriler hemosöle kütikül enfeksiyonu yoluyla da giriş sağlayabilir. (1) Kutikuladan enfeksiyon yoluyla (2) Oral yolla enfeksiyon (Wojda, 2017)

1.1. Böceklerdeki Antioksidan Savunma Sistemleri ve Direnç Mekanizmaları

Endojen ve ekzojen kaynaklı etmenler reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna neden olarak hücresel hasara yol açmaktadır. Organizmada serbest radikal ve reaktif oksijen türevleri oluşumunun ana kaynakları ksenobiyotikler ve ksenobiyotiklerin biyoaktivasyonu sonucu oluşan ürünlerdir. Birçok maddenin serbest radikal oluşturarak oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir. Serbest radikaller, vücutta sürekli olarak oluşturulan ve antioksidan savunma sistemi tarafından ortadan kaldırılan moleküllerdir. Bu dengenin bozulması, serbest radikallerin artmasına ve hücre hasarı oluşturmalarına yol açar. Bu duruma oksidatif stres denilmektedir (Cormick ve ark. 1999). Hedef organizmalarda, normal metabolizma faaliyetlerinin dışında vücuda dışarıdan alınan kimyasallar (pestisitler, ağır metaller vb.), enfeksiyon etkeni mikroorganizmalar (bakteri, parazit, virüs vb.), radyasyon ve çevresel stres (su kirliliği, mevsimsel farklılıklar vb.) faktörleri vücutta serbest oksijen radikallerinin artmasına, dolayısıyla oksidatif

strese neden olmaktadır. Bunun sonucunda, hücrede DNA, protein, lipid, karbonhidrat ve enzimler zarar görebilir (Sies, 1985; 1991; 1997; Halliwell ve Gutteridge**,** 1999; Sorg, 2004). Serbest oksijen türevlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonu, protein, enzim ve DNA oksidasyonu ve glutatyon deplesyonu, böcek dokularında oksidatif düzeyde zarara neden olur (Ahmad, 1995). Böceklerde, reaktif oksijen türevlerinin fazla üretilmesi, mideye alınan besinlerin absorbsiyonuna zarar vermekte ve orta barsak hücrelerinde de oksidatif zarara neden olabilmektedir (Bi ve Felton, 1995).

Antioksidanlar, oksijeni ve geçiş metal iyonlarını uzaklaştırarak, reaktif oksijen türlerini baskılayarak veya temizleyerek, başlamış olan zincir reaksiyonunu kırarak etkili olurlar (Halliwell, 1997). Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve non-enzimatik olarak sınıflandırılmaktadır. Katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon-s-trasferaz (GST) gibi antioksidan enzimlerle birlikte, askorbik asit (Vitamin C), A, E vitamini, indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da reaktif oksijen türevlerinin toksik etkisini yok etmektedir (Kale ve ark, 1999). Diğer yandan, lipid peroksidasyonu da oksidatif zararın ortaya konmasında önemli faktörlerden biridir ve ksenobiyotiklerin toksisitesinde önemli rol oynamaktadır (Anane ve Creppy, 2001).

CAT, SOD'a benzer bir dismütasyon reaksiyon mekanizmasıyla, H_2O_2' i O_2 ve H_2O' ya parçalayarak biyolojik sistemler için zararlı olan H_2O_2' e karşı koruma sağlar (Aebi, 1984; Lardinnois, 1995).

İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan SOD enzimi, $O_2^{\cdot -}$ (superoksit radikali) radikalini katalitik olarak uzaklaştıran ve lipid peroksidasyonu inhibe eden bir metalloenzimdir. Bu enzim, $O_2^{\cdot -}$ radikalinin, H_2O_2 (hidrojen peroksit) ve O_2' ye dönüşümünü katalize eder (McCord ve Fridovich,1969).

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Normal metabolizma esnasında hücreler tarafından yüksek oranda $O_2^{\cdot -}$ radikali üretilmesine rağmen intraselüler düzeyi SOD sayesinde düşük tutulur. Yukarıdaki denklemde görüldüğü gibi bu reaksiyon sonucunda membranları geçemeyen $O_2^{\cdot -}$ radikali, membranları kolayca geçebilen H_2O_2'e dönüşmektedir. H_2O_2 ise geçiş metal iyonlarının varlığında Fenton ve Haber Weiss reaksiyonu ile son derece aktif olan $OH^{\cdot}$ (hidroksit) radikaline dönüşmektedir (Gomes, 2012). Bu nedenle SOD aktivitesindeki artışın oluşturabileceği aşırı H_2O_2 birikmesinin ancak CAT ve GSH-Px enzimlerinin artan aktiviteleri ile kontrol altında tutulabileceği ileri sürülmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Özden, 2006).

GPx, omurgalılarda oksidatif strese karşı en etkili antioksidan olup H_2O_2 ve lipid peroksitlerin indirgenmesini (redüksiyon) katalizleyen, dört alt birimden oluşan (tetramer) ve 4 selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir (Manduzio ve ark, 2005). GPx aktivitesindeki azalma, H_2O_2 düzeylerinin yükselmesine ve hücre hasarına yol açmaktadır (Schaeffer ve Stainer, 1978, Ursini ve ark, 1982). GPx, substrat olarak GSH'u kullanarak H_2O_2'in H_2O'ya katalizini sağlamaktadır (Ahmad ve ark, 1989). Bu reaksiyon sonucunda oluşan okside GSH'ın tekrar GSH'a indirgenmesinde de GPx enzimi görev almaktadır (Nordberg ve Arner, 2001; Çaylak, 2011; Dere ve ark, 2015). Lepidoptera takımına ait türlerde selenyuma bağımlı GPx enziminin aktivitesi oldukça düşüktür.

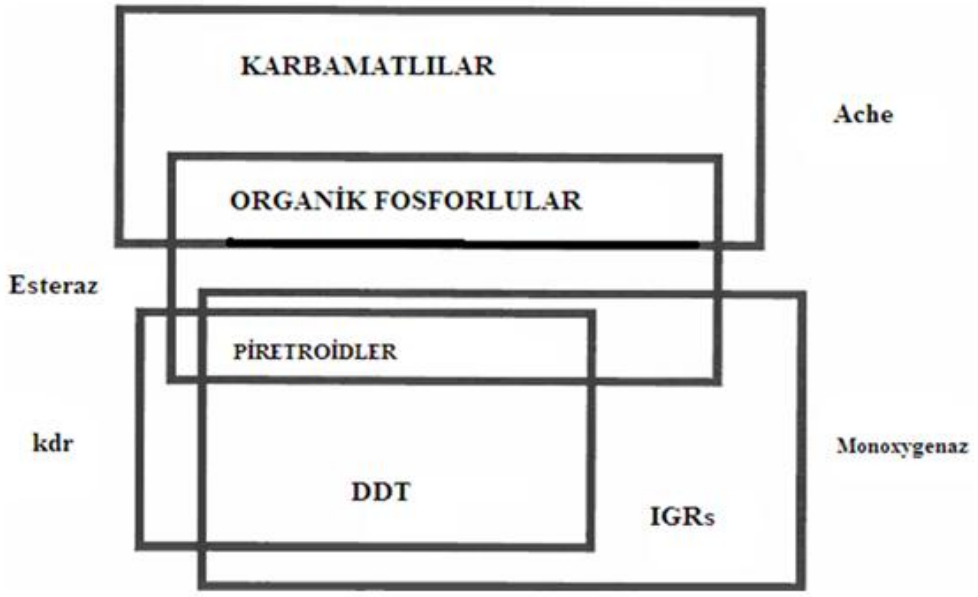
Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından indüklenmektedir ve bu reaksiyonlar sonucu açığa çıkan ürünler, radikal hasarlarının incelenmesinde kullanılan etkin parametrelerdir (Esterbauer ve ark, 1991). Lipid peroksidasyonu, zarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından lipid peroksitler, alkoller, aldehidler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur (Felton ve Summers, 1995). Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difuze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva

eden yağ asitlerinin (Linoleik, linolenik ve arasidonik asitler) peroksidasyonunda tiyobarbitürik asit ile ölçülebilen malondialdehid (MDA)'in yanında 4-hidroksi-2 nonenol (4-HNE) meydana gelir (Bokov ve ark, 2004). MDA, yağ asidi oksidasyonunun kantitatif bir indikatörüdür ve lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi uyum gösterir. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olan bir aldehid olup oksidatif stresin derecesi ile orantılı olarak seviyesi artmaktadır (Suwalsky ve ark, 2001). Oluşan MDA, hücre zarlarındaki iyon alışverişine etki ederek zardaki bileşiklerin çapraz bağlanması, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişmesi gibi olumsuz sonuçlara neden olur (Durmuş, 2007).

Zararlılarla mücadele kapsamında kullanılan insektisitlerin, gereksiz ve fazla uygulanması, hedef olmayan canlıların yok edilmesine ve zararlı türlerin de direnç kazanmasına yol açmaktadır. İnsektisit uygulaması fazla yapılan tarımsal alanlarda, ekonomik yönden zarar oluşmasının yanı sıra, insan sağlığı açısından da olumsuz etkilenmeler olmaktadır. Böceklerde direnç, normal bir populasyonda bireylerin çoğunun öldürücü dozda canlı kalma yeteneğini geliştirmesi olarak tanımlanmaktadır (Constant ve Roush, 1990).

İnsektisitlerin yaygın ve bilinçsiz kullanımı sonucunda, zararlılarda insektisitlere karşı oluşan dayanıklılığın dört önemli mekanizması vardır. i) Fiziksel dayanıklılık mekanizması; böceğin vücudunun dış kısmındaki bazı değişikliklerle toksik maddenin alımı yavaşlatılır veya azaltılır. Örneğin, kütikular yapıdaki bir değişiklikle, topikal olarak uygulanan insektisitlerin penetrasyon oranı azalabilir. ii) Davranışsal dayanıklılık; böceğin davranışsal değişiklikleri, ilacın toksik dozuna temas etmesini önlemektedir. iii) Metabolik dayanıklılık; böceğin normal enzimatik metabolizması, insektisit detoksifikasyonunu arttırmak veya insektisitin aktivasyonunu önlemek için değiştirilir. iv) Değiştirilmiş hedef bölge ise; toksik maddelere karşı duyarlılığı azaltmak için etki yeri değiştirilir (Hassall, 1990; Callaghan, 1991).

Böceklerde, insektisit direncinin artmasıyla detoksifikasyon enzimleri arasında bir ilişki vardır. Detoksifikasyon enzimleri genellikle yabancı bileşenlere karşı enzimatik savunma olarak gösterilmektedir ve normal fizyolojik fonksiyonlarının devam ettirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Li ve Liu, 2007). Detoksifikasyon, böcek metabolizması içerisine giren pestisit, bakteri ve virüs gibi yabancı maddelerin hedef bölgeye ulaşmadan parçalanması esasına dayanmaktadır. Yaşayan organizmalarda ksenobiyotiklerin vücuttan atılmasından sorumlu bu detoksifikasyon enzimleri; sitokrom P450, hidrolazlar (esterazlar), glutation-S-transferazlar (GST) dir.



Şekil 1.3. İnsektisitlerin detoksifikasyonuna etkili fizyolojik mekanizmalar (Yorulmaz ve Ay, 2010)

Hidrolaz enzimlerinin insektisitler üzerindeki aktivitesi dirençli böcek populasyonlarında daha yüksektir. Hidrolazlar içerisindeki en önemli enzim grupları, esterazlardır. Esteraz enzimleri böceklerde feromon ve hormon metabolizması, sindirim sistemi ve sinir iletimi, üreme davranışı ve insektisitlere direnç gibi birçok önemli mekanizmada rol oynamaktadır. Böceklerde insektisitlere

karşı direnç gelişiminde özellikle asetilkolinesterazlar ve karboksilesterazlar görev almaktadır. Asetilkolinesteraz (AChE) lipofilik etkiye sahip asetilkolini hidrolizleyen bir enzimdir. Asetilkolin, sinir ucundan diğer bir sinir hücresine, sinir impuls taşıma görevi yapar. Ayrıca sinir ve kas hücreleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasını da sağlayan biyolojik önemi büyük olan bir esterdir (Alon ve ark, 2008).

Glutatyon S-transferaz (GST) enzimi, vücuda alınan yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunda önemli role sahip olan bir enzimdir. Böceklerde bu enzim, insektisit detoksifikasyonun yanı sıra hücresel membranların oksidatif yıkımlara karşı korunmasını da sağlamaktadır (Yu, 2008). Bu enzim, toksik metabolitlerin indirgenmiş glutatyonla konjugasyonunu katalize eder. Ayrıca, hücre, doku, organ sistemlerinin bütünlüğünün ve diğer antioksidan moleküllerin korunmasında, bunun yanı sıra ribonükleotidlerin indirgenmesinde görevli önemli bir antioksidan moleküldür (Casalino ve ark, 2004).

Omurgalılarda olduğu gibi böceklerde de P450 ailesi vücuda alınan yabancı maddelerin biyolojik olarak transfer edilmesinde görev almaktadır (Yorulmaz ve Ay, 2010). Böceklerde bulunan P450 enziminin büyüme, gelişme, beslenme, pestisitlere karşı direnç ve tolerans gibi fonksiyonel görevleri bulunmaktadır (Pottelberge ve Amermaet, 2008). Ayrıca P450, 20-hidroksiekdizon ve juvenil hormon gibi bazı böcek hormonlarının ve feromonlarının sentezi için de gerekmektedir (Reed ve ark, 1994). Bu nedenle P450 enzim engelleyicileri, hormon sentezini dolaylı olarak etkiledikleri için, holometabol böceklerin morfolojilerinde, gelişme ve yaşam sürelerinde değişikliklere yol açarlar (Soderlund, 1997).

İnsektisit direncine karşı kullanılan metotlar arasında, uygulama aralıklarının, dozlarının arttırılması ya da bazı durumlarda yeni ürünlerin alternatif olarak uygulanması sayılabilir. Fakat yeni ürünlerin kullanılabilirliği, çevresel ve toksikolojik güvenliğin artan standartlarından dolayı sınırlandırılmıştır (Ware,

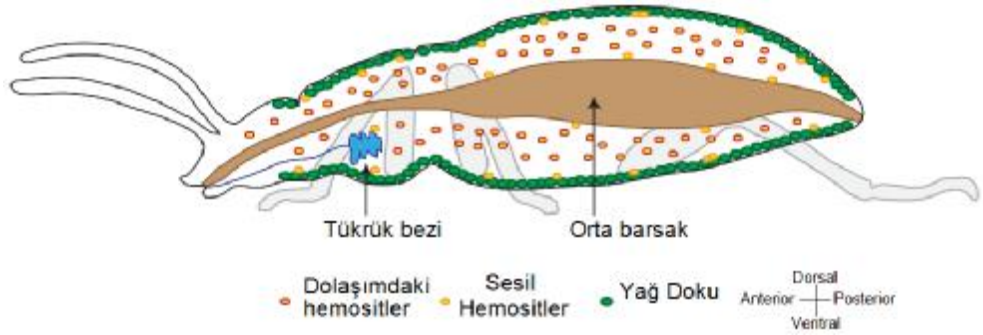
2000). Direnç gelişiminin önlenmesi için, yeni ürünlerin kullanımının kısıtlanmasından dolayı, bu durum insektisitlerin karışım halinde kullanılmasıyla giderilmektedir. Karışımda kullanılan farklı etki mekanizmalı insektisitler birbirlerinin etkisini arttırmakta ve sonuç olarak bu da maliyetin azalmasına neden olmaktadır (Martinez ve ark, 2004; Attique ve ark, 2006). Bu insektisitlerin, düşük dozlardaki kombinasyonlarının kullanılması ekolojik, biyolojik ve ekonomik yönden farklı yararlar sağlamaktadır.

Çalışmada da kullanılan *B. thuringiensis* etki mekanizmalı insektisitlerin bilinçsizce tüketimi, zararlılarda direnç gelişmesine neden olmaktadır. *B. thuringiensis*' in protoksinleri, aktif toksinlere dönüşmek üzere parçalanarak ya da toksinlerin mide epitelyum zarı üzerindeki reseptörlere bağlanarak etkili olurlar. Bu iki faktörden herhangi birinde var olan değişiklikten dolayı, *B. thuringiensis*'e karşı direnç oluşmaktadır. *B. thuringensis* ticari preparatına karşı oluşan ve tespit edilen ilk direnç, *Plodia interpunctella*' da tespit edilmiş ve son yıllarda da birçok zararlı tür üzerinde de gelişmekte olduğu belirlenmiştir (Huang ve ark, 1999; Liu ve ark, 1999; Frutos ve ark, 1999). Bu nedenle, *B. thuringiensis* biyopreparatlarının, hem öldürücü etkisinin arttırılması ve dayanıklılık sorununu gidermek amacıyla, hem de direnç gelişimini önlemek için, bazı sinerjistik maddeler ile karışım halinde uygulanmaktadır (Gümüş ve Turanlı, 2012).

Çalışmada *B. thuringiensis* biyopreparatı ile karışım halinde uyguladığımız juvenil hormon analoglarından pyriproxyfenin, böceklerde immun sistemi baskılayıcı özelliği, *B. thuringiensis*' in patojen etkisini arttırmaktadır (Kwon ve Kim, 2007). Ayrıca bu insektisitin, *B. thuringiensis* haricinde diğer kontrol ajanlarından, permethrin ve spinosad ile karışım halinde uygulandığında da yüksek sinerjik etki meydana getirdiği bildirilmiştir (Lee ve ark, 2005; Darriet ve Corbel, 2006). Bu nedenle son yıllarda, entegre mücadele kapsamında yeni insektistlerin uygulanması yerine, farklı etki mekanizmalı insektisitlerin karışımlarının kullanılması ekonomik ve ekolojik açıdan yarar sağlamaktadır.

1.2. Böceklerde Bağışıklık Sistemi

Böcekler farklı tip hemositleri ve birçok fizyolojik fonksiyonlarda görevli mezodermal hücreleri kapsayan açık dolaşım sistemine sahiptir (Sharma ve ark, 2003). Böceklerde bağışıklık sistemi humoral ve hücresel savunma olmak üzere üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Humoral savunma, antimikrobiyal peptidleri (AMPs), kompleman benzeri proteinleri ve fenoloksidaz (PO) yolu gibi kompleks protealitik kaskadlar tarafından üretilen ürünleri içeren çözünür efektör molekülleri ifade eder (Blandin ve Levashina, 2004; Cornelis ve Saderhall, 2004; Imler ve Bulet, 2005; Theopold ve ark, 2004; Beckage, 2008). Bunun aksine hücresel savunma, doğrudan hemositler aracılığıyla fagositoz, enkapsülasyon ve pıhtılaşma gibi olayları kapsamaktadır (Gillespie ve ark, 1997; Irving ve ark, 2005; Lackie, 1988; Strand ve Pech, 1995; Beckage, 2008). Böceklerde patojenlerin yok edilmesi fagositoz, melanizasyon, enkapsülasyon, nodül oluşumu, liziz, RNA interferaz (RNAi) aracılığıyla virüs yok etme, otofaji ve apoptosiz gibi efektör mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalar, birbirinden bağımsız olaylar değildir. Örneğin, (1) hemosölde melanize olmuş patojenler fagosite edilir (Hillyer ve ark. 2003a; b) (2) litik ve melanize olmuş bileşenler aynı patojenin yüzeyinde bulunabilir (Hillyer ve Christensen, 2005) (3) lizi edilmiş patojenler aynı zamanda melanize edilir (Osta ve ark, 2004a; Volz ve ark, 2006) (4) enkapsülasyon ve nodül oluşumu birçok durumda hemositlerin kümeleşmesini ve melanizasyonu kapsamaktadır (Pech ve Strand, 1995; Ratcliffe ve Gagen, 1977).



Şekil 1.4**.** Böceklerde Hücresel Bağışıklık sisteminin anatomisi (Hillyer, 2016)

1.2.1. Humoral Bağışıklık

Bakteriler, mantarlar gibi patojenik mikroorganizmalar, böceklerdeki fizikokimyasal bariyerleri aştığında sitotoksik peptit ve proteinlerle karşılaşırlar (Gillespie ve ark, 1997; Hoffman ve ark, 1994; Garcia-Lara ve ark, 2005). Humoral savunma sürecinde melanizasyon, hemolenfin pıhtılaşması ve antimikrobiyal peptitlerin sentezi olmak üzere üç tip reaksiyon gerçekleşmektedir (Vilmos ve Kurucz, 1998).

Melanizasyon, böceklerin kütikül sertleşmesi, yara iyileşmesi ve bağışıklık için kullandığı enzimatik bir işlemdir (Cerenius ve ark, 2008; Christensen ve ark, 2005; Nappi ve Christensen, 2005) ve tirozinin melanin öncülerine dönüştürülmesi olayını, patojenleri çevreleyen ve ayıran melanin tabakasını oluşturmak için proteinlerin çapraz bağlanmasını içeren bir dizi reaksiyonu kapsamaktadır. Bu olay, patojeni çevreleyen koyu renkli protein yapıda kapsül olarak meydana gelmektedir ve patojenin ölümü muhtemelen ya oksidatif hasar yoluyla ya da yabancı madde besin açısından zengin hemolenften izole edildikçe açlık yoluyla meydana gelir (Cerenius ve ark, 2008; Christensen ve ark, 2005; Nappi ve Christensen, 2005). Melanizasyon süreci, patern tanıma reseptörlerini (PRR), serin proteazları, serin proteaz inhibitörlerini ve melanin üretimini yönlendiren enzimlerin eş güdümlü etkileşimini kapsamaktadır. Bu olay, zimojen profenoloksidazın aktif formu olan fenoloksidazdan ayrılmayan profenoloksidaz

aktive edici enzimlerin aktivasyonuyla sonuçlanan bir serin proteaz kaskadını başlatır (An ve ark, 2009; 2011). Melanizasyonun meydana gelmesini sağlayan birçok enzim ve PRR'ler, profenoloksidazın ana üreticileri olan önositoidler tarafından üretilmektedir (Ashida ve ark, 1988; Hillyer ve ark, 2003a). Melanizasyona yola açan enzimatik olaylar reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olduğundan bu reaksiyonlar sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Serpinler olarak da bilinen serin proteaz inhibitörleri ve bazı C tipi lektinler gibi diğer faktörler fenoloksidaz kaskadının aktivasyonunu inhibe eder (An ve ark, 2011; Osta ve ark, 2004b).

Humoral bağışıklık, hastalık oluşturan mikroorganizmaların saldırıları sonucunda böcek vücudunda sekropin (cecropins), attasin (attacins), dipterisin (diptericins) ve difensinler (defensins) gibi antibakteriyal proteinlerin biyosentezlenmesi ile olmaktadır. Bu antibakteriyel peptitler ve proteinler omurgalıların ürettiği antibodilerin aksine çok sayıda bakteri türüne karşı etkilidir.

Patojen bakterilerin vücut boşluğuna girip yayılmasını engellemek için omurgasızlarda hemolenfin pıhtılaşma mekanizması bulunur (Theopold ve ark, 2002). Böceklerde hemolenfin pıhtılaşmasında proteinlerin polimerizasyonu, hemositlerden salgılanan Ca^{+2} bağımlı transglutaminaz tarafından katalizlenir (Bohn ve Barwing, 1984). Bu mekanizmada ilk olarak hemositlerin degranülasyonu ile hücre dışı agregatların oluşması sağlanır. Bu agregatlar yara bölgesini kaplayarak primer veya yumuşak pıhtı denen yapıyı oluşturur. İkinci olarak profenoloksidazın aktivasyon basamakları ve transglutaminaz ardışık olarak pıhtıda çapraz bağlar oluşmasını sağlar ve pıhtı kalınlaşır. Üçüncü olarak plazmatositler bu bölgeye çekilerek pıhtının etrafını sararlar ve kabuklaşarak vücut boşluğundan ayırırlar. Son olarak yara bölgesinde epidermisin rejenerasyonu gerçekleşir ve kabuğun yerini alır (Theopold ve ark, 2004).

1.2.2. Hücresel Bağışıklık

1.2.2.1. Böceklerde Hemosit Tipleri

Böcek hemolenfi genellikle renksiz, bazı pigmentlerden dolayı çok az yeşil veya sarı renkli bir sıvıdır. Böcek türüne göre vücut ağırlığının yaklaşık %5-40'ını hemolenf oluşturmaktadır. Omurgalılarda olduğu gibi böcek kanı da plazma ve hemositlerden oluşmaktadır. Hemositler, böceklerde farklı fizyolojik fonksiyonlarda görevlidirler. Besinleri farklı dokulara iletirler ve depo ederler. Ayrıca fagositoz, enkapsülasyon, koagulasyon, nodul oluşumunun yanı sıra besin materyallerinin ve hormonların iletimi, metabolitlerin ve biyolojik aktif materyallerin detoksifikasyonunda da rol alırlar (Patton, 1983). Hemositlerin bağışıklıkta tüm türlerde benzer görevleri olsa da farklı hemosit tiplerinin adlandırılması tür ve taksonlar arasında az çok farklılık göstermektedir. Lepidoptera ordosuna ait türlerde hemositlerin sınıflandırılması altı farklı tipten oluşmaktadır; prohemositler, granulositler, plazmotositler, adipohemositler, sferülositler ve önositoidler. (Lavine ve Strand, 2002).

1.2.2.1.(1). Prohemositler

Hemolenfteki en küçük hücreler olduğu bilinmektedir. Yuvarlak veya oval, düzgün şekilli, 4-10 µm genişliğinde ve 4-14 µm uzunluğunda hücrelerdir (Gupta, 1985; Brehelin ve Zachary, 1986; Chapman, 1998; Giulianini ve ark, 2003). Çekirdekleri sitoplazmayı tamamen doldurur. Hücre organellerinden ribozom ve mitokondri içermektedir fakat endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı gibi diğer organeller genellikle az sayıdadır (Rowley ve Ratcliffle, 1981; Levin, 2007). Temel fonksiyonlarının bölünmek olması, ayrıca sentriol ve mikrotübül içermeleri sebeplerinden dolayı aktif hemosit olarak nitelendirilmekte ve diğer hemosit tiplerinin öncüsü olarak kabul edilmektedir (Rowley ve Ratcliffe, 1981; Gupta, 1985; Cociancich ve ark, 1994; Ribeiro ve Brehelin, 2006; Çelik, 2014). Dolaşımdaki toplam hemosit sayısına göre oranları %5' dir.

1.2.2.1.(2).Plazmatositler

Plazmatositler, küresel veya oval şekilli olup boyları 3 µm'den 40 µm'ye kadar ulaşabilen polimorfik hücrelerdir (Rowley ve Ratcliffe, 1981; Brehelin ve Zachary, 1986; Chapman, 1998; Silva ve ark, 2002). Böcek türüne bağlı olarak dolaşımdaki toplam hemosit sayısına oranları %30-60 arasında değişmektedir (Cociancich ve ark, 1994). Plazmatositler transmisyon elektron mikroskobu ile incelendiklerinde birkaç yalancı ayak, pinositotik veziküller, vakuoller ve poliribozomlar gözlenebilir, ayrıca az gelişmiş bir golgi aygıtına da sahiptirler. Birçok Lepidoptera türünde plazmatositler granül içermezken, *G. mellonella*' da granül içerebilmektedir (Ribeiro ve Brehelin, 2006; Ribeiro ve ark, 1996; Schmit ve Ratcliffe, 1977). Plazmatositler, pseudopodlar ile yayılabilme özelliğine sahip olmalarının yanı sıra karakteristik olarak da ince ve uzun fibroblast benzeri bir yapıya sahiptir (Pech ve Strand, 1995), ayrıca patojenleri, ölü hücreleri ve hemosöl içerisine girmiş diğer maddeleri fagosite etme özelliği vardır (Beckage, 2008). Bu hemositler, fagosite edilemeyecek büyüklükteki yabancı cisimlerin, bakteri topluluklarının ya da nekrotik melanize olmuş materyallerin etrafında kapsüller ve nodüller oluşturmaktadır (Lavine ve Strand, 2002; Pech ve Strand 1995; Çelik, 2014).

1.2.2.1.(3).Granülositler

Granülositler, küresel veya oval şekilde ve 4-45 µm arasında çapları değişebilen hemositlerdir. Morfolojik olarak sitoplazmalarında bulunan granüller ile tespit edilmektedirler. Az sayıda mitokondrileri, ribozom ve lizozom organelleri (Gupta, 1985; Chapman, 1998), gelişmiş granüllü endoplazmik retikulumları, pinositik vezikülleri, ince ve uzun yalancı ayakları vardır (Ribeiro ve Brehelin, 2006). Histokimyasal analizler sonucunda granüllerin glikoprotein ve mukopolisakkarit yapısında olduğu belirtilmiştir. Lepidoptera ordosuna ait türlerde plazmatositlerle birlikte dolaşımda en fazla görülen hemosit tipidir. Granülosit

hücreleri, yabancı yüzeylere yapışma ve yayılma özelliğinden dolayı aynı zamanda profesyonel fagositler olarak da işlev görmektedir (Beckage, 2008). Bu hemositler, kapsül veya nodül oluşumunda yabancı cisimlerle ilk temasa geçen ve granüler içeriklerini dışarı veren hücrelerdir. Birçok araştırmacı, granüler hemosit içeriğinin ekzositozunun plazmatositleri o bölgeye çekmede etkili olduğunu (Ribeiro ve Brehelin, 2006) ya da kapsül veya nodül oluşumunda plazmatositlere yardımcı olabileceğini düşünmektedir (Pech ve Strand, 1995; Çelik, 2014).

1.2.2.1.(4).Önositoidler

Önositoidler çapları 54 µm'yi bulan yuvarlak veya oval şekilli oldukça büyük hemositlerdir (Rowley ve Ratcliffe, 1981; Levin, 2007). Lepidoptera ordosuna ait türlerde diğer hemosit tipleri ile kıyaslandıklarında en büyük hemositler olduğu tespit edilmiştir (Gupta, 1985). Önositoid hücreleri toplam hemosit sayısının %1-2 sini oluşturmaktadır (Rowley ve Ratcliffe, 1981). Çekirdekleri merkezi olmamakla birlikte transmisyon elektron mikroskobuyla yapılan çalışmalarda sitoplazmalarında çok sayıda serbest ribozom ve az gelişmiş organellere rastlanılmıştır (Ribeiro ve Brehelin, 2006). Bazı önositoidler çubuk, iğne veya kristal şeklinde sitoplazmik inklüzyonlar içerebilmektedir. Lepidoptera ordosuna ait türlerde bağışıklık sisteminde ve yara iyileşmesinde önemli rol oynayan melanizasyondan sorumlu fenoloksidaz enzimi önositoidlerde mevcuttur (Ribeiro ve ark, 1996; Kanost ve ark, 2004). *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae)' de fenoloksidazın önositoidler içinde sentezlendiği ve bu hücrelerin parçalanmaları sırasında plazmaya salındığı tespit edilmiştir (Ashida ve ark, 1988). Plazmatositler ve granülositler gibi yabancı yüzeylere yapışma özelliği yoktur. Lepidoptera türleri arasında *G. mellonella* türünün daha dayanıklı önositoidlere sahip oldukları tespit edilmiştir (Rowley ve Ratcliffe, 1981; Çelik, 2014).

1.2.2.1.(5). Sferülositler

Sferülositler, yuvarlak veya oval ve 5-25 µm çapında değişken şekilli hücrelerdir (Gupta, 1985; 1991; Butt ve Shields, 1996; Chapman, 1998). Bu hemositlerin karakteristik özellikleri sitoplazmik boşluğunda membrana bağlı sferüllere sahip olmasıdır. Sferüllerin sayısı farklılık göstermekte ve çapları 1-5 µm arasında değişmektedir. Bu sferüller bazı granüle materyaller çevreliyor gibi görünmektedir. Sferüllerin histokimyasal analizleri bu hücrelerin mukopolisakkaritlerden ve glukomukoproteinlerden oluştuğunu göstermektedir (Gupta 1985; 1991). Ayrıca sitoplazmalarında ribozom, golgi cisimciği, lizozom, mitokondri ve granüllü endoplazmik retikulum içermektedir. Bu hemositlerin fonksiyonlarıyla (ipek üretimi, melanizasyon, fagositoz, pıhtılaşma ve hücre adhezyonun düzenlenmesi) ilgili birçok yorum yapılsa da henüz netlik kazanmış herhangi bir bilgi bulunmamaktadır (Gupta 1985; 1991; Brehelin ve Zachary, 1986; Chapman, 1998).

1.2.2.1.(6).Adipohemositler

Adipohemositler genellikle küre şeklinde veya ovaldir (Gupta, 1985; 1991), fakat *Anastrepha obiqual*' da polimorfik olduğu gözlenmiştir (Silva ve ark, 2002). Bu hemositlerin boyutları 7-45 µm aralığında değişiklik göstermektedir ve sitoplazmaları içerisinde yağ damlacıkları ile karakterize olmuştur. Sitoplazma çoğunlukla lipid olmayan granüllerden ve iyi gelişmiş mitokondri, golgi cisimciği, granüllü endoplazmik retikulum ve poliribozomlardan oluşmaktadır. Nukleus küçüktür ve hücrenin herhangi bir yerinde bulunabilmektedir. Hemolenfteki adipohemositlerin sayısı genellikle az miktardadır ve toplam hemosit populasyonunun %1-4' ünü oluşturmaktadır (Gupta, 1991), buna karşın adipohemositlerin *Lymantria dispar* pupasında %39 seviyelerinde bulunduğu ve *Aedes aegyptii* dişi erginlerinde ise en çok bulunan hemosit tipi olduğu da yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Hillyer ve Christense, 2002). Adipohemositlerin

glikojen ve lipid formunda enerjiyi depo ettiği bilinmektedir (Hillyer ve Christensen, 2002).

1.2.3. Hematopoez

Hemositler böcek gelişimi sırasında iki aşamada meydana gelmektedir. Hemositlerin ilk popülasyonu embriyogenez sırasında baş veya dorsal mezodermden üretilirken, ikincisi larva ve nimf evrelerinde mezodermal olarak türetilmiş hematopoietik organlardan üretilir. Böceklerde hematopoiezis ile ilgili yapılan çalışmaların birçoğu larval evre sırasında hemosit popülasyonunun gelişimi hem dolaşımda olan hücrelerin proliferasyonuna hem de hematopoietik organlardan hemositlerin salınımına da bağlı olan Lepidoptera ordosu ile ilgilidir (Akai ve Sato, 1971; Arnold ve Hinks, 1976; Hinks ve Arnold, 1977; Gardiner ve Strand, 1999; 2000; Nardi, 2004; Yamashita ve Iwabuchi, 2001). Gardiner ve Strand (2000)' ın yaptıkları bir çalışmada *Spodoptera frugiperda* ve *Pseudoplusia includens* larvalarında ve diğer lepidopterlerde hematopoietik organlar mezo ve metatoraks bölgesinde tek loblu bir yapıdadır. *S. frugiperda*' da hematopoietik organlardaki hemositlerin sayısı larval gelişim sırasında metamorfoz başlamadan önce maximum 300.000 hücreye kadar artış göstermektedir (Gardiner ve Strand, 2000). Bu hemositler öncelikle iç medüller bölgede bulunan prohemosit ve dış kortekste yer alan plazmatositlerden meydana gelmektedir. *Manduca sexta* ve *B. mori* larvaları ile yapılan çalışmalarda da hematopoietik organların çoğunlukla prohemosit ve plazmatositlerden meydana geldiği bildirilmiştir (Ling ve ark, 2005; Nakahara ve ark, 2003; 2006; Nardi ve ark, 2003). Bu sonuçlar birlikte ele alındığında Lepidoptera ordosuna ait türlerde hematopoietik organlar plazmatositlerin önemli kaynakları olduğu özellikle larval gelişimin geç döneminde granülositler, sferül hücreler ve önositoidlerin dolaşımdaki hemositlerin proliferasyonu ile meydana geldiğini ortaya koymaktadır (Levin, 2007).

1.2.4. Hücresel Bağışıklık Tepkileri

Hemositler, fagositoz, nodül oluşumu, enkapsülasyon gibi bağışıklık tepkilerinde rol oynarlar.

1.2.4.1. Fagositoz

Fagositoz hem omurgalı hem de omurgasız hayvanlar tarafından bakteri, fungus gibi yabancı mikroorganizmaların yok edilmesi için oluşturulan hücresel bağışıklık tepkilerinden biridir. Plazmatositler ve granülositler fagositozdan sorumlu başlıca hemositlerdir (Lavine ve Strand 2002, Gupta 1985). Fagositoz, yabancı madde fagositin plazma membranında bulunan peptidoglikan, lipopolisakkarit ve 1.3-glukanlar gibi yüzey moleküllerinin tanınması veya örnek tanıma proteinleri (opsoninler) adı verilen ve fagosite edilecek partikülü hücresel saldırı için işaretleyen proteinler tarafından fark edilip bağlandığı zaman başlar. (Lavine ve Strand 2002). Yabancı organizma daha sonra membran ile sınırlandırılmış fagozom içerisinde özümsenir ve fagozom lizozom ile birleşir. Daha sonra içeri alınan yabancı partiküller hidrolitik enzimler tarafından sindirilir. Fagositoz çok hızlı gelişen bir olaydır. Örneğin *A. aegypti* ve *M. sexta* türlerinde bazı hemositler binlerce bakteriyi saniyeler içerisinde fagosite edebilmektedir (Dean ve ark. 2004; Hillyer ve ark. 2005). Omurgalılarda olduğu gibi böcek bağışıklığında da fagositoz, diğer bağışıklık bileşenlerini aktive etmektedir (Hillyer, 2016).

1.2.4.2. Nodül Oluşumu

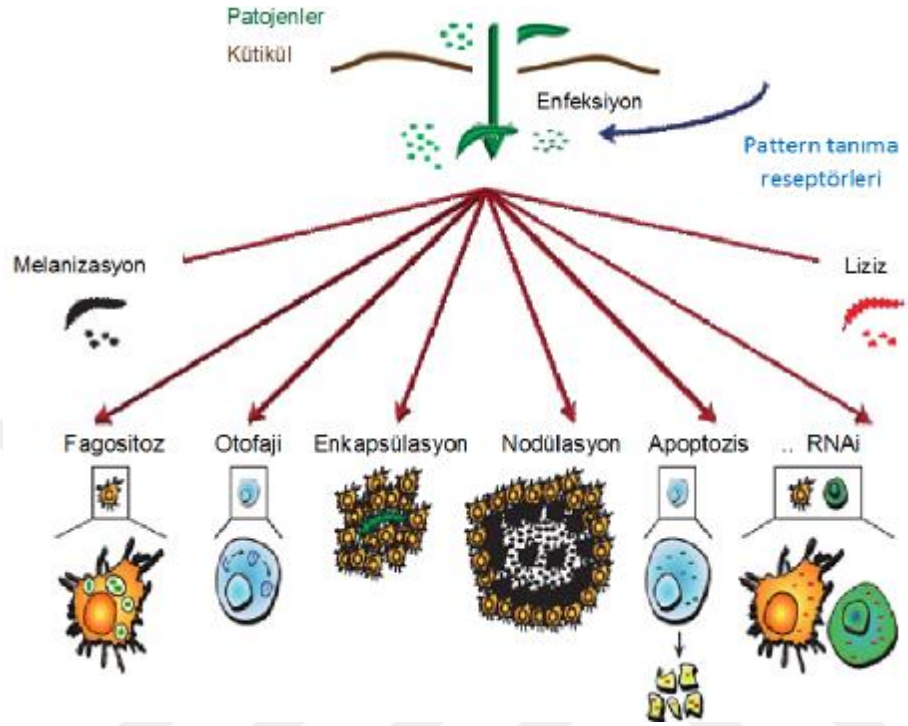
Böceklerde nodüller yüksek konsantrasyonlarda cansız maddelere karşı olabildiği gibi bakteri, fungal sporlar, maya hücreleri ve protozoanlara karşı da oluşabilmektedir. Çeşitli böceklerle yapılan çalışmalarda nodül oluşumunun ilk aşamasının hemosit ve mikroorganizma kümeleri oluşumu olduğu tespit edilmiştir (Ratcliffe ve Gagen, 1977). Nodülasyon, hemositlerin bakterilerin etrafını sararak

bir araya toplanıp mikroagregatlar oluşturmasını içermektedir ve bunu genellikle melanizasyon takip eder (Ratcliffe ve Gagen, 1977; Satyavathi ve ark, 2014). Bu immun tepkide, granülositler birbirlerine bağlanır ve bakteri kümelerinin etrafını saracak şekilde katmanlar oluşturur. Granülositler, bakterileri kaplayacak şekilde bakterilerin tutunmasını sağlayan yapışkan bir yapıya sahip olan içeriğini hemolenfe bırakırlar. Plazmatositler, daha sonra nodülün yüzeyine kümeleşir ve nodül sıkılaştıkça yakalanmış bakterilerin etrafında melanin birikimi olur (Hillyer, 2016).

Nodül oluşumunda rol alan temel hemositler granülositler ve plazmatositlerdir. Ancak bazı araştırmacılar melanizasyonda rol oynayan profenoloksidaz içermesi nedeniyle önositoidlerin de nodül oluşumunda rol aldıklarını savunmaktadırlar (Chapman, 1998, Götz ve Boman, 1985).

1.2.4.3. Enkapsülasyon

Enkapsülasyon fagosite edilemeyen patojenlere karşı kullanılan hücresel bir bağışıklık tepkisidir. Lepidopterlerde enkapsülasyon granülositler, patojeni saran hücre katmanı şekline dönüştüğünde başlatılır. Granülosit katmanı daha sonra birçok plazmatosit katmanı tarafından sarmalanır ve bunu ek granülositlerin bağlanması takip eder. Patojen ve böceğe bağlı olarak kapsül melanize olabilir (Hillyer, 2016).



Şekil 1.5. Böceklerde bağışıklık etki mekanizmaları (Hillyer, 2016).

Memeliler, doğal ve edinilmiş bağışıklık sistemine sahipken, böceklerde spesifik antijenlerin tanınması ve onlara karşı antikor oluşturulmasına yönelik özellikler bulunmamaktadır. Böceklerde kan ve lenfatik sıvı ayrımı yoktur. Herhangi bir patojen etki ile karşılaştığında humoral bağışıklık yanıtlarının yanı sıra, hemositlerin de morfolojik ve yapısal değişiklikleri sonucunda hücresel bağışıklık yanıtlarının da aktive olduğu bilinmektedir (Hoffmann, 1995; Krautz ve ark. 2014; Sezer ve Özalp, 2015a). Memelilerde olduğu gibi böceklerde de enfeksiyon hastalığının gelişim süreci içinde patojenin adezyonu, ardından konak hücreye girişi, toksin üretimi, konak savunma sistemi hücrelerinden kaçış basamakları paralellik göstermektedir (Scully ve Bidochka, 2006). Bunun yanı sıra memeli epidermis ve böcek kütikülü temel protein komponentleri açısından benzerlik gösterse de mikroorganizmalar gibi dış etkenlere karşı humoral yanıtın oluşmasında büyük önem taşıyan böcek kütikülünün yapısında bulunan kitin

epidermal tabakada bulunmamaktadır. Bu nedenle kütikülün fiziksel koruma görevinin yanı sıra kütikül hasarı ile humoral immün yanıt oluşmakta ve antimikrobiyal peptid, ısı şok proteinlerinin sentezi, fenoloksidaz ve Ca^{+2} bağımlı transglutaminaz etkisi ile hemolenfin pıhtılaşması ve melanizasyon meydana gelmektedir. Ayrıca patojenlerin toksinlerine karşı memelilerde olduğu gibi böceklerde de orta barsaktaki mikrovilluslerin yüzeyinde mikrobiyal toksinler için glukokonjugant reseptörler bulunmaktadır. Memeliler ile böcekler arasında immun yanıt olarak bir diğer benzerlik ise konak hücreye yabancı madde girdiğinde hemositlerin fagosite etme özelliği göstermeleridir. Memelilerde makrofajlar tarafından gerçekleşen bu olay, böceklerde granülosit ve plazmatositler aracılığıyla yapılmaktadır (Kavanagh ve Reeves, 2004).

Günümüzde, zararlı türler ile mücadelede sıklıkla kullanılan juvenil hormon analoğu insektisitlerin ve ***B. thuringiensis*** etkili biyopesititstler ile ilgili birçok çalışma yapılmakta ve özellikle Lepidoptera ordosuna ait türlerle yapılan biyokimyasal çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Fakat bu insektisit türlerinin karışım uygulamalarının zararlı türlerde antioksidan savunma sistemleri, MDA miktarı ve detoksifikasyon enzim aktiviteleri ile kan hücreleri üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu amaç kapsamında, ***B. thuringiensis*** biyopreparatının ve pyriproxyfenin ***G. mellonella*** 5. evre larvalarında antioksidan savunma sistemleri, MDA miktarı ve detoksifikasyon enzim aktiviteleri ile kan hücreleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Günümüzde, zararlı türler ile mücadelede sıklıkla kullanılan juvenil hormon analoğu insektisitler ve *B. thuringiensis* etken maddeli biyopestisitler ile ilgili birçok çalışma yapılmakta, özellikle Lepidoptera ordosuna ait türlerle yapılan biyokimyasal çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Fakat bu insektisit türlerinin karışım halindeki uygulamalarının zararlı türlerde antioksidan savunma sistemleri, detoksifikasyon enzimleri, MDA miktarı ve kan hücreleri üzerine etkileri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

B. thuringiensis' in böceklerdeki etki mekanizması, sporulasyon anında böcekler tarafından yenildiğinde toksik maddelere dönüşerek, protein yapıda kristaller oluşturmakta, bu kristaller de içerdikleri endotoksinler ile böceklerin mide çeperindeki hücreleri tahrip ederek, sindirimi engellemesiyle meydana gelmektedir.

Burges ve Bailey (1968), *G. mellonella'* da *B. thuringiensis*' in ticari formunun etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, soğuk bal peteklerine arılara zarar vermeden, *B. thuringiensis* biyoinsektisiti uygulamış ve uygulama yapılan peteklerin, *G. mellonella*' ya karşı dayanıklılığın iki sezon boyunca devam ettiğini ve *G. mellonella* saldırısı olmadan peteklerin kullanılabildiğini bildirmişlerdir.

Boşgelmez ve ark. (1983) yaptıkları çalışmada, *B. thuringiensis*' in farklı ticari preparatlarından (Dipel, Tribactur, Bactospein) izole edilen endotoksinlerin, *G. mellonella* populasyonuna laboratuvar koşulları altında etkisi araştırılmış ve sonuç olarak, yüksek dozlarda uygulama yapılan gruplarda larva populasyonunda daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca genç larvaların düşük dozlarda uygulanan *B. thuringiensis* endotoksinlerinden daha çok etkilendiği de belirlenmiştir.

Khvoschevskay ve ark. (2004), *G. mellonella* 7. evre larvalarının *B. thuringiensis* spp. galleria ile enfekte edildikten sonra hemolenf, yağ doku, barsak

ve hemosit hücrelerinde SOD aktivitesi incelenmiş ve dokular birbirleriyle kıyaslandığında en az aktivitenin hemolenfte, en fazla aktivitenin ise hemosit hücrelerinde meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Dubovskiy ve ark. (2008) *G. mellonella* ile yaptıkları çalışmada, 6. evre larvaları *B. thuringiensis* ssp. galleria ile enfekte edilmiş ve orta barsakta SOD, CAT, GST, RSSR/RSH oranı ve MDA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Sonuç olarak, *B. thuringiensis* enfeksiyonu bu enzim aktivitelerinde uygulamanın ilk gününden itibaren artış meydana getirmiştir.

Biyolojik kontrol ve organik tarımda kullanılan biyoinsektisitler ve böcek büyüme düzenleyicileri dışında zararlılarla mücadele çalışmalarında farklı etki mekanizmalı birçok kimyasal da kullanılmaktadır.

Hyrsl ve ark. (2007), *G. mellonella* ile yaptıkları bir çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki borik asit ile beslenen birinci evre larvalar son evreye geldiklerinde ve pupa evresinde, hemolenf ve yağ dokularındaki SOD, CAT, GST ve GPx aktiviteleri ile MDA miktarı üzerine etkileri incelenmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, larva hemolenfinde, larva ve pupa yağ dokusunda MDA miktarının arttığı, pupa hemolenfinde ise azaldığı tespit edilmiştir. Borik asitin 156 ve 620 ppm konsantrasyonlarını içeren besin ile beslenen larvalarda SOD aktivitesi artmış, fakat 1250 ve 2500 ppm konsantrasyonlarını içeren besin ile beslenen gruplarda ise larva hemolenfinde azalmış, yağ dokuda artmıştır. Buna karşılık CAT aktiviteleri ise bu dokularda azalmıştır. Yüksek borik asit konsantrasyonlarını içeren gruplarda ise GST aktiviteleri azalmış, GPx aktivitelerinde ise artış gözlenmiştir.

Ay ve Yorulmaz (2009), 20 kez selekte edilmiş bifenthrin dirençli *Tetranychus urticae* Kock populasyonunda sitokrom P450 aktivitesinin arttığını gözlemlemiştir.

Büyükgüzel (2009), *G. mellonella* larvaları ile yaptığı çalışmada malathionun MDA ve GSH miktarları ile SOD ve AChE aktiviteleri üzerine

etkilerini araştırmış, sonuç olarak malathionun 1 ppm konsantrasyonunu içeren besin ile beslenen grupta MDA miktarının arttığı, AChE aktivitesinin ise azaldığı belirlenmiştir. Düşük malathion konsantrasyonlarının SOD aktivitesini arttırdığı, yüksek konsantrasyonların ise azalttığı tespit edilmiştir.

Abd El-Aziz (2010) *Schistocerca gregaria* nimfleri ile yaptığı çalışmada abamectin uygulaması sonucunda AChE aktivitesinde artış meydana geldiğini tespit etmiştir.

Aslantürk ve ark. (2011), *Lymantria dispar* larvarının orta barsağında SOD, CAT ve GPx aktiviteleri ile MDA miktarı üzerine methidathionun etkilerini araştırdıkları çalışmada, $LD_{50/48h}$ değerinin MDA miktarı ile SOD, CAT ve GPx aktivitelerini arttığını tespit etmişlerdir.

Oxya chinensis 5. evre nimfleri ile yapılan bir çalışmada phoxim uygulanması sonucunda oluşan oksidatif stres nedeniyle SOD, CAT, GST, GPx ve GR aktivitelerinde değişim meydana geldiği fakat MDA miktarında istatistiki açıdan değişim meydana gelmediği tespit edilmiştir (Wu ve ark. 2011).

Muthusamy ve ark. (2011) *Spodoptera litura* larvaları ile yaptıkları çalışmada temephos, dichlorvos ve lambda-cyhalothrine maruz bırakıldığında esteraz ve AChE enzimlerinin bu insektistlerin detoksifikasyonunda önemli rol oynadıklarını bildirmişlerdir.

Altuntaş (2015) *G. mellonella* larvaları ile yaptığı bir çalışmada bitki büyüme düzenleyicisi giberillik asitin SOD, CAT ve GST aktiviteleri üzerine etkilerini incelemiştir. Düşük dozlarda SOD ve GST aktivitelerinde belirgin bir artış tespit edilmiştir. Son evre larvaların hemolenfinde CAT aktivitesinde bütün dozlarda artış gözlenmiştir.

Dere ve ark. (2015), azadirachtinin *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki total protein ve MDA miktarı ile CAT, SOD ve GST aktiviteleri üzerine etkilerini araştırmış, sonuç olarak total protein miktarının uygulamadan 24 saat sonra artış meydana geldiğini, 72 saat sonra ise düşük konsantrasyonlarda

arttığını, yüksek konsantrasyonlarda ise azaldığını tespit etmişlerdir. MDA miktarının ve CAT aktivitesinin 24 saat sonra azaldığını, 72 saat sonra ise düşük konsantrasyonlarda azaldığını, yüksek konsantrasyonlarda ise arttığını, SOD aktivitesinin 24 ve 72 saat sonra azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca, GST aktivitesinin ise 24 saat sonra arttığı, 72 saat sonra 1 ve 1.5 µg/larva dozlarında artış, 0.5, 2 ve 3 µg/larva dozlarında ise azalma meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Erdem ve Büyükgüzel (2015), *G. mellonella* larvalarında bitki allelokimyasalı ksantotoksinin etkisi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, son evre larvalarda MDA ve protein karbonil miktarlarının arttığı, GST aktivitesinin ise azaldığını belirlemişlerdir.

Sitophilus zeamais populasyonu ile yapılan çalışmada malathion uygulaması sonucunda sitokrom P450 enziminin direnç gelişiminde önemli rol oynadığını tespit etmiştir (Konuş, 2015a). Buna ek olarak, *Tuta absoluta* ile yapılan çalışmada ise, sitokrom P450 enziminin oksidatif streste etkili bir enzim olmadığını tespit ettiğini bildirmiştir (Konuş, 2015b).

Abd El-Aziz (2015) *Spodoptera littoralis* larvaları ile yaptığı çalışmada abamectinin LC_{50} dozunun uygulanması sonucunda GST ve α-esteraz aktivitelerinin azaldığı, β-esteraz aktivitesinin arttığı ve AChE aktivitesinde ise herhangi bir değişim olmadığını tespit etmiştir.

İşçi ve Ay (2017), *Cydia pomonella* L. İle yaptıkları çalışmada thiaclopride ve chlorpyrifosinin LD_{50} değerlerine karşı *C. pomonella* popülasyonunun direnç gösterdikleri ve enzim analizleri sonucunda P450 ve esteraz enzimlerinin bu insektisitlere karşı dirençte önemli rol oynadıklarını bildirmişlerdir.

Juvenil hormon analoğu pyriproxyfenin ve bazı böcek büyüme düzenleyicisi insektisitlerin etkileri ile ilgili farklı türlerle yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır.

Ma ve ark. (2010) *Bemisia tabaci* ile yaptıkları çalışmada pyriproxyfene karşı gelişen direncin tespitinde P450 ve GST enzimlerinin etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Zibaee ve ark. (2011), *Eurygaster integriceps* erginlerine uygulanan pyriproxyfenin yağ doku ve hemolenf dokularındaki genel esteraz ve GST enzim aktivitelerindeki değişimin yüksek konsantrasyonlarda artış meydana getirdiği tespit edilmiştir.

Fahmy (2012) *S. littoralis* (Biosd.) ile yaptığı çalışmada, böcek büyüme düzenleyicisi olan applaud ve pyriproxyfenin uygulandıktan sonra oluşan lipid peroksidasyon nedeniyle biriken malondialdehit miktarından dolayı CAT, redükte glutatyon (GSH) ve GST enzim aktivitelerinde artış meydana geldiği tespit edilmiştir.

Mirhaghparast ve Zibaee (2013) *Chilo suppressalis* ile yaptıkları çalışmada, hexaflumuron ve pyriproxyfen uygulanması sonucunda fenoloksidaz aktivitesinde inhibisyon meydana geldiğini ve bunun sonucunda bağışıklık sisteminin entomopatojen ajanlarına karşı etkisiz hale getirdiğini tespit etmişlerdir.

Tarhan ve ark. (2013) *G. mellonella* ile yaptıkları çalışmada 20-hidroksiekdizon ve juvenil hormonun, GSH Px, GST ve GR aktiviteleri üzerine etkilerine bakmış ve gelişime bağlı olarak GST ve GSH-Px aktivitelerinde azalma tespit ederken, GR aktivitelerinde artış olduğu belirlenmiştir.

Bakr ve ark. (2013), *S. littoralis* larvalarında böcek büyüme düzenleyicilerinden tebuferozide ve lufenuron etkisiyle α ve β esteraz aktivitelerinde azalma meydana geldiğini belirlemişlerdir.

B. thuringiensis etki mekanizmalı biyopreparatlara karşı böceklerde direnç gelişimi ve farklı etki mekanizmalı insektisitlerle karışım halinde uygulanması ile ilgili yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır. Ayrıca diğer insektisit türlerinin de karışım halinde uygulanmalarının zararlı böcek türleri üzerine fizyolojik etkileri ile ilgili yapılmış çalışmalar da mevcuttur.

Ferré ve ark. (1991) *Plutella xylostella* ile yaptıkları çalışmada, *B. thuringiensis* biyopestisitine laboratuvar ve arazi koşullarında maruz bırakıldığında orta barsak epitel hücrelerinde *B. thuringiensis* kristal proteinlerinin toksik ve

bağlayıcı etkilerine bakılmış ve sonuç olarak, Cry1A kristal proteinine karşı direnç geliştirdiğini tespit etmişlerdir.

Whalon ve ark. (1994) ***B. thuringiensis***, neem ekstraktları ve böcek büyüme düzenleyicileri ile birlikte karışım halinde uygulanmış ve ***B. thuringiensis***' in bu insektisitlere karşı antogonistik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Singh ve ark. (2007), ***Helicoverpa armigera*** Hübn. (Lepidoptera: Noctuidae) üzerinde Neem ve ***B. thuringiensis*** etki maddeli bir preparatın birlikte uygulanması durumunda sadece toksisitesinin artmadığı, aynı zamanda etkinin ortaya çıkma süresinin de kısaldığını bildirmişlerdir.

Rizwan-ul-Haq ve ark. (2009), ***S. exigua*** ile yaptıkları çalışmada ***B. thuringiensis*** ile harmalin ve ricininin subletal dozları karışım halinde uygulanmış ve larvalarda mortalite ile SOD ve CAT aktivitlerinde artış meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Zawisza-Raszka ve Dolezych (2008), ***Spodoptera exigua*** larvaları ile yaptıkları çalışmada nikel ve diazinonun tek başına ve karışım halindeki uygulamalarının barsak, vücut duvarı ve yağ dokuda GST, CAT, AChE aktviteleri üzerine etkilerine bakılmıştır. Sonuç olarak, nikelin diazinonuna karşı hassasiyeti arttırdığını ve dokular arasında en düşük CAT ve GST aktivitelerinin yağ dokuda belirlendiğini bildirmişlerdir.

War ve ark. (2011) ***Spodoptera litura*** larvaları üzerinde endosulfan ve neem yağının sinerjistik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, esteraz ve GST akivitesi üzerine etkilerine bakılmış ve süreye bağlı olarak enzim aktivitelerinde artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

Gümüş ve Turanlı (2012)' ün ***Lobesia botrana*** ile yaptığı çalışmaya göre juvenil hormon analoğu olarak etki gösteren azadirachtin ve ***B. thuringiensis*** etki maddeli biyopestisitlerin tek başlarına ve karışım halinde uygulandıklarında, uygulamadan üç gün sonra azadirachtin ve ***B. thuringiensis*** aizawai etki maddeli insektisitlerin daha çok etkili olduğu tespit edilmiştir.

Bitsadze ve ark. (2013), *Beauveria bassiana* ve böcek büyüme düzenleyicilerinden diflubenzuron ve novaluronun birlikte kullanımının *Locusta migratoria* üzerine etkileri ile yaptıkları çalışmada, *B. bassiana* uygulamasından 48 saat sonra novaluron uygulandığında insektisitler arasında aditif etki belirlenirken, novaluron uygulaması sonucunda antogonistik etki tespit edilmiştir.

Böcek büyüme düzenleyicileri, entomopatojen organizmalar ve farklı etki mekanizmalı kimyasal insektisitlerin böceklerde bağışıklık sistemi ve kan hücreleri üzerine etkileri ile ilgili yapılan birçok çalışma bulunmaktadır.

Abd El-Aziz ve Awad (2010), *Agrotis ipsilon* larvalarında böcek büyüme düzenleyicisi dimilin ve *B. thuringiensis*' in uygulanması sonucunda total hemosit sayısında azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Prohemosit sayısında azalma olurken, sferülosit, plazmatosit ve granülosit sayılarının uygulamadan 12 ve 24 saat sonra her iki insektisit türünün uygulanması sonucunda artış meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Dubovskiy ve ark. (2013), *G. mellonella* ve *Leptinotorsa decemlineata* larvalarında organofosforlu insektisit olan primifos-metil etkisinde sublethal dozlarının fenoloksidaz aktivitesini ve enkapsülasyonu arttırdığını ve hemosit sayısında da artış meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Oliveira ve ark. (2013), *Alabama argillacea* larvalarında *B. thuringiensis* Berliner uygulaması sonucunda total hemosit ve prohemosit sayılarının azaldığını, plazmatosit, granülosit, önositoid ve sferülosit sayılarında ise artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

Grizanova ve ark. (2014), *G. mellonella* larvalarının *B. thuringiensis* ile oral yolla enfeksiyon sonucunda savunma sistemi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada, subletal dozdaki *B. thuringiensis*' in total hemosit sayısında azalmaya neden olduğu, ayrıca düşük dozlarda fenoloksidaz ve lizozim aktivitelerini arttırdığını tespit etmişlerdir. Uygulamadan 48 ve 72 saat sonra ise, hemositlerin fagositik aktivitesini ve enkapsülasyon oranını arttırdığını bildirmişlerdir.

Ghasemi ve ark. (2014), *Ephestia kuehniella* ile yapılan çalışmada pyriproxyfen uygulaması sonucunda total hemosit ve plazmatosit sayılarının azaldığı fakat granülosit sayısının arttığını, metoxyfenozide uygulaması sonucunda ise, total hemosit ve plazmatosit sayısının arttığını, buna karşın granülosit sayısının ise azaldığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, total hemosit ve plazmatosit sayılarının böceklerde bağışıklık sisteminde önemli rol oynadığını ve pyriproxyfenin immün sistemi baskılayıcı etkisinin entegre mücadele çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Wu ve Yi (2015)' nin *G. mellonella* larvaları ile yaptıkları bir çalışmada ağır metal uygulaması sonucunda düşük dozlardaki Cr ve Pb total hemosit sayısı fagositik aktivite ve enkapsülasyonu artış meydana getirdiğini ve hemolenfteki SOD, CAT ve fenoloksidaz (POD) aktivitelerini arttırdığını bildirmişlerdir.

Manogem ve ark. (2016), kitin sentez inhibitörü flufenoxuronun *Spodoptera mauritia* larvalarının hemositleri üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmada total hemosit sayısının konsantrasyon artışına bağlı olarak uygulamadan 24 ve 48 saat sonra azalma meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Tüm hemosit tiplerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Huang ve ark. (2016), *Mythimma separata* larvalarında sublethal dozdaki hexaflumonon etkisinde granülosit sayısının azaldığı, plazmatosit arttığını, sferülosit, önositoid ve prohemosit sayılarında ise az etki görüldüğünü bildirmişlerdir. Hexaflumuronun yüksek konsantrasyonlara maruz kalan larvalarda ise total hemosit sayısında azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Er ve Keskin (2016), *G. mellonella* larvalarında bitki büyüme düzenleyicisi absisik asitin hemosit sayısını azalttığını ve farklı zaman aralıklarında konsantrasyon artışına bağlı olarak granülosit ve plazmatosit sayılarında değişiklikler meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Farklı etki mekanizmalı insektisitler karışım halinde uygulandığında böceklerde insektisitlere karşı direncin oluşması karışım içerisindeki her insektisite

karşı direncin ayrı ayrı gelişmesinin zor olmasından dolayı mümkün olmayabilmektedir.

Kwon ve Kim (2007), *Plutella xylostella* 4. evre larvalarında pyriproxyfenin *B. thuringiensis* subsp. kurstaki ile birlikte kullanımı sonucunda, pyriproxyfenin bakteriyel patojeniziteyi arttırdığını ve immun sistemi baskıladığını tespit etmişlerdir.

Shaurub ve ark. (2014), multikapsid nukleopolihedrovirus (SpliMNPV) ve azadirachtinin tek başına ve karışım uygulamalarının *S. littoralis* larvalarında total hemosit sayısı ve hemosit hücrelerinde yapısal değişiklikler üzerine etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak, virüsün tek başına ve azadirachtin ile karışım halinde uygulanmasıyla total hemosit sayısında kontrole göre azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, granülositler ve plazmatositlerde en çok rastlanan semptomların viral enfeksiyon sonucunda virogenik stromanın varlığı, kromatinin periferik dağılması ve nukleusun kaybolması olduğunu tespit etmişlerdir. Azadirachtin uygulaması sonucunda en çok rastlanan semptomlar arasında ise apoptosizden dolayı lifli metaryalle dolu granüllü endoplazmik retikulum varlığı ve mitokondride düzensizlik (kıvrımlı, vakuollü ve kabarık), granülositlerin sitoplazması otofajik lizozomlar ile vakuolleşme ve plazmatositlerde ise hücre membranında kopmalar ve çekirdekte zarf şeklinde katlanmalar meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Mirhaghparast ve ark. (2015a), *Chilo suppressalis* Walker larvaları ile yapılan bir çalışmada pyriproxyfen ve *B. bassiana*' nın tek başına ve birlikte kullanımı sonucunda düşük konsantrasyonlarda (uygulamanın 1-3 saatlik periyotlarında) total hemosit sayısında artış meydana gelirken, 6-24 saatlik periyotlarda ise azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir. Pyriproxyfen ve *B. bassianna*' nın birlikte kullanımı sonucunda ise, uygulamanın 6-12 saatlik periyotlarında total hemosit sayısı, plazmatosit ve granülosit sayılarında artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak pyriproxyfenin *C. suppressalis*' in

hücresel bağışıklık sisteminde entomopatojenlere karşı müdahale edici bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kryukov ve ark. (2015), *G. mellonella* larvalarında entomopatojen organizmalardan *Cardyceps militoris* Link ve *B. bassiana*' nın birlikte kullanımı sonucunda total hemosit sayısının ve enkapsülasyon oranının azaldığını, hemolenfteki fenoloksidaz aktivitesinin ise arttığını bildirmişlerdir.

Mirhaghparast ve ark. (2015b), *C. suppressalis* Walker larvaları ile yapılan çalışmada, hexaflumunonun tek başına ve *B. bassiana* ile karşım halinde uygulanması sonucunda total hemosit, plazmatosit ve granülosit sayılarında ve fenoloksidaz aktivitesinde artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca hexaflumuronun, *C. suppressalis* larvalarında intermediyer metabolizmayı etkileyerek aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz, γ-glutamil transferaz ve aldolaz miktarlarında artış meydana getirdiğini, laktat dehidrojenaz aktivitesinde değişikliklere neden olduğunu ve farklı uygulama zamanlarında ACP, ALP, HDL, LDL miktarlarında artış meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. Buna karşın, glikojen ve protein miktarında kontrole göre azalma görüldüğünü, esteraz ve GST aktivitelerinde ise kontrole göre artış meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Tomilova ve ark. (2016), avermectin ve *Metarhizium robertsii*' nin sinerjistik etkilerinin *Leptinotorsa decemlineata* larvalarında plazmatosit ve granülosit sayılarında artış meydana geldiğini ve avermectinin bağışıklık sistemini baskıladığını bildirmişlerdir. Ayrıca hemolenf ve yağ dokuda fenoloksidaz ve GST aktivitelerinde artış meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Yaroslavtseva ve ark. (2017), *L. decemlineata* larvalarında entomofaj fungus *M. robertisii* ve *B. thuringiensis* ssp. morrisoni bakterisinin tek başına ve karışım halindeki uygulamaları sonucunda total hemosit sayısının ve enkapsülasyonun azaldığını, integümentteki fenoloksidaz aktivitesinin bakteriyosit, mikosiz ve karışım halindeki etkilerinde artış meydana geldiğini, buna karşın hemolenfteki fenoloksidaz aktivitesinde *B. thuringiensis* etkisinde artış olduğunu, karışım

uygulaması sonucunda ise azalma olduğunu bildirmişlerdir. ***M. robertsii*** ile ***B. thuringiensis***' in tek başına uygulanması sonucunda esteraz ve GST aktivitelerinde artış meydana gelirken, karışım uygulanması sonucunda detoksifikasyon enzimlerinde inhibisyon meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalar göz önünde tutulduğunda, ***G. mellonella*** larvalarına, ***B. thuringiensis*** ve pyriproxyfenin tek başına ve karışımlarının antioksidan ve detoksifikasyon enzimleri ile kan hücreleri üzerine etkileri ve bu iki insektisitin ***G. mellonella***' nın beşinci evre larvalarında etkili olan, LD_{50} değerinin belirlenmesi ile ilgili yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. İnsektisitlerin sublethal dozlarının kullanımı zararlılarla entegre mücadelede çevreye dost bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, ***G. mellonella*** ile mücadelede sıklıkla kullanılan, ***B. thuringiensis*** etki maddeli biyopreparatlara karşı direnç gelişimi ile ilgili araştırmalara ait çalışmalar da sınırlı sayıdadır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. *Galleria mellonella*

Büyük balmumu güvesi *G. mellonella* (L.) Lepidoptera ordosu, Pyralidae familyasına ait, zararlı bir türdür. Bu türün larvaları arıcılık yapılan bölgelerde, arı kovanlarında, peteklerde ve depolanmış bal mumunda büyük zararlar vermekte ve verimin düşmesine neden olmaktadır. Bu tür ile mücadelede, çeşitli kimyasal maddeler kullanılmakta ve kalıntı bırakma problemlerinden dolayı, insan sağlığını ve çevreyi olumsuz etkilemektedir.

Son yıllarda bu tür, özellikle mikrobiyal patojenlerin insan sağlığına etkilerinin belirlenmesinde model organizma olarak kullanılmaktadır. Tıp alanındaki deneysel çalışmalarda model organizma olarak sıklıkla kullanılan farenin yetiştirilmesinin zor ve pahalı olması, ayrıca etik ve legal sorunlara yol açması model organizma olarak omurgasızların kullanılmasına olanak sağlamıştır. *G. mellonella* gibi türler, üretimi basit ve pahalı olmadığından iyi bir model organizmadır. Ayrıca *G. mellonella* larvalarının ticari yönden üretime uygun olması, oda sıcaklığında üretiminin kolay ve kısa sürede yapılabilmesi, bu türü diğer omurgasız canlılardan da ayırt etmektedir. Bunun yanı sıra, *G. mellonella'* nın memelilerle benzer doğal bağışıklık sistemine sahip olması da onun uygun bir model organizma olabilmesini sağlamaktadır.

G. mellonella' nın yaşam döngüsü, yumurta, larva, pup ve ergin olmak üzere dört evreden oluşmaktadır. Larval süre 7 evreden oluşmaktadır ve ortalama 24 gün sürmektedir. Deneyde kulanılan 5. evre larvaların ortalama uzunlukları 12 mm, genişlik 1.29 mm' dir (Singh, 2010).



Şekil 3.1**.** *G. mellonella* larvaları

Pup evresinde, ortalama uzunluk 16,10 mm, genişlik ise 3,50 mm' dir. Son evredeki larvalar kovanların içerisinde pupayı kaplayan beyaz kozalar örer. Ergin evrede yapısında sindirim kanalı olmadığı için beslenmeden kesilir yumurtalarını bıraktıktan sonra ölürler.

3.1.2. *Bacillus thuringiensis*

Mikrobiyal mücadelede özellikle spor oluşturan Bacillus grubu bakteriler önemli bir yer tutar ve bu bakteriler Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera takımlarına ait çeşitli böcekleri hedef alırlar Biyolojik mücadelede kullanılan bakteriler arasında *B. thuringiensis* son yıllarda çok ilgi çeken bir etmen haline gelmiştir ve günümüzde kullanılan mikroorganizmaların %90'nını *B. thuringiensis* oluşturmaktadır (Chattopadhyay ve ark, 2004).

B. thuringiensis, δ-endotoksin olarak isimlendirilen protein yapısında ve biyolojik olarak kolayca parçalanabilen ve böylece böceğin orta barsağında kısa bir yarılanma ömrü olan insektisidal toksinler üretirler. Kimyasal insektisitler ile kıyaslandığında *B. thuringiensis* ürünleri, diğer ilaçlara göre etki şekli farklı olduğundan hedef organizmada daha az bir dirence neden olur. Kimyasal insektisitler gibi ortamda birikip toksik etki oluşturmazlar. İnsanlar üzerinde

herhangi bir patojenite göstermezler. Ayrıca, arılara, kuşlara ve faydalı böceklere de zararsızdır. Bu nedenle biyolojik mücadelede, kimyasal insektisitler ile karşılaştırıldığında çevresel dengeyi bozmayan alternatif bir mücadele yöntemidir (Chattopadhyay ve ark, 2004).

B. thuringiensis biyopreparatları zararlı böceklerde barsak çeperini parçalayarak etki göstermektedir. *B. thuringiensis*' de bulunan kristal (*cry*) genleri insektisidal kristal protein (ICP)' leri kodlamaktadır. ICP'ler bağırsakta çözünerek protoksine dönüşürler. Daha sonra bağırsak enzimleri tarafından protoksinler parçalanarak aktif toksinler elde edilir. Aktif toksinler bağırsak epitel hücrelerinin reseptörlerine tutunarak böceğin bağırsak duvarını felce uğratır ve burayı tahrip ederek gözenekler oluşturur. Böylece, bağırsakta bulunan besin artıkları böcek vücuduna ve kana karışır. Zehirlenen böcek, toksin aktivitesi sebebiyle hemen ölebildiği gibi, 2-3 gün içerisinde kan zehirlenmesi sonucunda da ölebilir (Demirbağ ve ark, 2008). Bu nedenle deney süresinin yapılan ön denemeler sonucunda 72 saat olarak belirlenmesi uygun görülmüştür.

3.1.3. Pyriproxyfen

Böcek büyüme düzenleyicilerinden olan pyriproxyfen, zararlı böceklerde gelişimi düzenleyen ve zararlılarla entegre mücadelede önemli rol oynayan bir insektisit türü olup, juvenil hormon analoğu olarak etki göstermektedir. Juvenil hormon analogları fizyolojik süreçlerde juvenil hormon gibi davranarak embriyogenez, metamorfoz ve ergin oluşumunu engellemektedir (Ishaaya ve Horowitz, 1992).

Kimyasal adı 4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) propyl ether ve kimyasal formülü $C_{20}H_{19}NO_3$'dür. Etkili madde beyaz renkli ve granül halindedir. Kullanılan pestisitin ticari ismi, Admiral 10 EC'dir.

Çizelge 3.1. Pyriproxyfen'in ekotoksikolojik özellikleri (Öncüer ve Durmuşoğlu, 2008)

Akut oral LD_{50} (mg/kg)	5000
Dermal LD_{50} (mg/kg)	2000
Zehirlilik sınıfı	III
Kuşlar LD_{50} (mg/kg)	863
Balıklar LC_{50} (mg/l)	0,27
Arılar LD_{50} (µg/arı)	100

3.2. Metod

3.2.1. *G. mellonella* Larvalarının Kitle Üretimi

Deneyde kullanılan larvalar, Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarında üretimi yapılan *G. mellonella* stok kültürlerinden elde edilmiştir. Stok kültürün devamı için içeriği Bronksill (1961) tarafından belirlenen kepek, petek, bal, gliserin ve saf sudan oluşan besin karışımı, 5 litrelik cam kavanozlara konularak içerisine 5 dişi ve 5 erkek *G. mellonella* erginleri bırakılmıştır. Besin içerisindeki kepek konulmadan önce, kontaminasyonu önlemek amacıyla 150°C' de FN 400 Nüve marka sterilizatörde steril edilmiştir. Kavanozların kapaklarına dişilerin yumurta bırakmalarını sağlamak amacıyla bırakılan kâğıtlar günaşırı değiştirilerek içerisinde petek bulunan farklı kavanozlara aktarılmıştır. Kavanozların ağzı hava sirkülasyonunu engellemeyecek ince bir tül ile kapatılmıştır. Hazırlanan kavanozlar, 30±1 °C sıcaklık, %65±5 bağıl neme sahip ve günlük 12:12 (K:A) fotoperiyot uygulanan böcek kültür odasında inkübasyona bırakılmıştır. Populasyon yoğunluğuna bağlı olarak kavanozlara zaman zaman petek ilavesi yapılmıştır. Bu yöntem ile elde edilen 5. evre larvaların seçimi Singh (2010)' in yapmış olduğu çalışmadaki boy ve ağırlık verilerine göre belirlenmiştir.

3.2.2. İnsektisitlerin LD_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Deneyde kullanılan insektisitler Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından onaylı ticari preparatlardır. Çalışmada juvenil hormon analoğu pyriproxyfen (Admiral %10 EC, Sumitomo Chemical Co, Japan) ve *B. thuringiensis* var. kurstaki (Delfin WG, Certis, 32000 IU/mg) adlı insektisitler kullanılmıştır.

İnsektisit uygulaması yapılacak 5. evre *G. mellonella* larvaları besin ortamından alınarak kontrol grubu ve uygulama grubu olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Larvaların beslenmesi için peteklere pyriproxyfenin 1500, 1750, 2000, 2400, 2800, 3000 ve 3500 µg/ml ve *B. thuringiensis*' in 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 ve 10000 µg/ml konsantrasyonları saf suda çözülerek püskürtme metoduyla peteklere uygulanmıştır. Uygulama yapılan konsantrasyonlar ticari preparatların belirlenen dozları baz alınarak ön denemeler sonucunda belirlenmiştir.

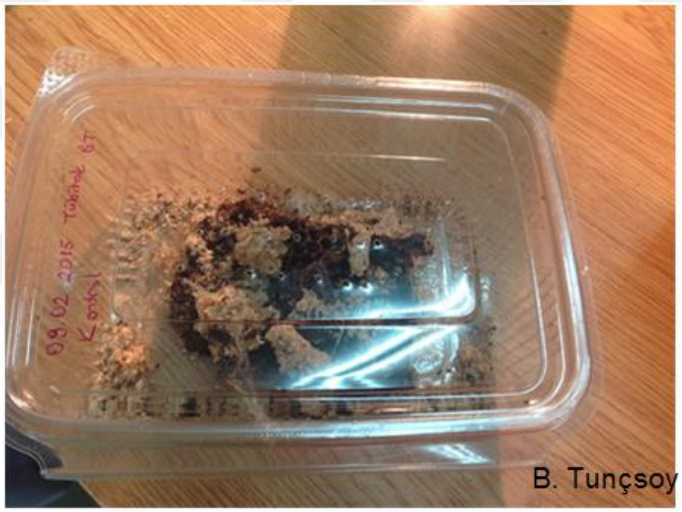
Petekler, uygulama yapıldıktan sonra, 10x14x4 cm boyutlarında plastik deney kaplarına konulmuştur. Deney kapları içerisinde, nem ve küf oluşumunun engellenmesi amacıyla peteklerin üzerine bir miktar kepek ilavesi yapılmıştır. İnsektisit uygulamasından sonra, her bir kapta 15 larva olacak şekilde kontrol ve uygulama grupları oluşturulmuş ve deneyler değişik zamanlarda 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Uygulama yapılan gruplardaki total ölü larvalar, insektisit uygulaması yapıldıktan 72 saat sonra sayılmıştır. Daha sonra probit analiz yöntemiyle pyriproxyfenin ve *B. thuringiensis*' in *G. mellonella* 5. evre larvaları için LD_{50} değerleri SPSS 21.00 istatistik veri programında Probit Analizi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Deney Sistemlerinin Enzim Aktivitelerinin Tayini İçin Hazırlanması

Beşinci evredeki *G. mellonella* larvaları kültür ortamından alınarak onarlı gruplar halinde hassas terazide tartılmıştır. Seçilen bireylerden oluşan kontrol ve

uygulama gruplarının homojen olmalarına özen gösterilmiştir. Deneyde kontrol ve uygulama gruplarından oluşan 4 grup oluşturulmuştur:

1) Kontrol
2) Pyriproxyfen (Admiral 10EC) (LD_{50}: 2385 µg/ml)
3) *B. thuringiensis* var. Kurstaki (Delfin) (LD_{50}: 359 µg/ml)
4) *B. thuringiensis* var. Kurstaki (Delfin) ve pyriproxyfen (Admiral 10EC) karışımı (1:1; Pyr:Bt)



Şekil 3.2**.** İnsektisit uygulaması yapılan petekler

Uygulamadan sonra petekler kurutma kâğıtlarının üzerinde oda sıcaklığında, kuruyana kadar bekletilmiştir. Kontaminasyonu önlemek amacıyla *B. thuringiensis* ve karışım uygulaması yapılan petekler ise, 25 °C' de etüvde bekletilmiştir. Daha sonra 10x14x4 cm boyutlarındaki plastik kaplara konulan peteklerin üzerine nem ve küf oluşumunu engellemek amacıyla bir miktar kepek ilavesi yapılmıştır. Önceden tartılan larvalar her kapta 40 adet olacak şekilde konulmuştur. Deney kaplarının üst kısımları hava sirkülasyonunu sağlamak amacıyla eşit miktarda

delinmiştir. Kontrol ve uygulama grupları, 72 saatlik deney süresi tamamlanana kadar her gün ölüm olup olmadığının tespiti için kontrol edilmiştir.

3.2.4. Dokuların İzolasyonu

Uygulamadan 24, 48 ve 72 saat sonra kontrol ve uygulama gruplarından 10' ar adet larva diseksiyon için seçilmiştir. Larvalar buz üzerinde 2-3 dakika bekletildikten sonra, %95 etil alkol ile dezenfekte edilmiştir. Ön bacaklarının dip kısmından steril bir enjektör ile delinerek akıtılan hemolenf, her birey için 10 µl olacak şekilde mikrokapiller tüp ile çekilmiş, içerisinde N-phenylthiourea (Sigma Aldrich) (PTU) ve homojenizasyon tamponu (20 mM; pH 7.6) bulunan ependorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonra larvalar sırt kısmı strafora gelecek şekilde sabitlenerek birinci çift torasik bacaklarının önünden orta eksen boyunca uzunlamasına mikro makas (Bahadır, düz makas, 16 cm) ile kesilmiştir. İlk önce yağ doku (fat body) bir pens yardımıyla izole edilmiş, daha sonra ön, orta ve son barsak olmak üzere üç bölümden oluşan sindirim kanalından orta barsak ayrılmıştır. İzole edilen yağ doku ve orta barsak, içerisinde homojenizasyon tamponu (20 mM; pH 7.6) bulunan ependorf tüplere aktarılmıştır.

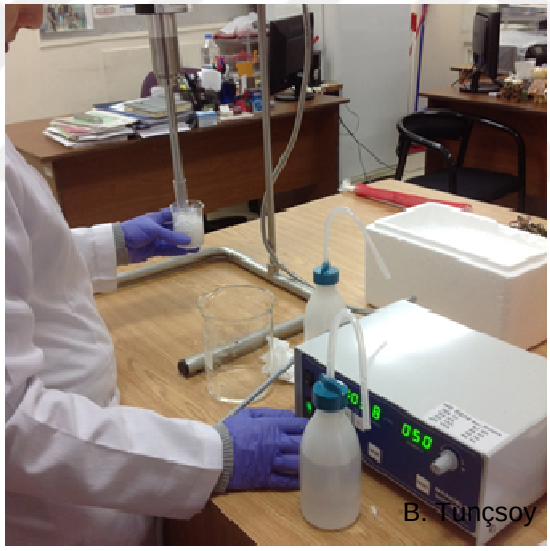


Şekil 3.3**.** ***G. mellonella*** larvasının diseksiyonu

Çizelge 3.2. Homojenizasyon tamponu

Tris (hidroksimetil) aminometan	2,4228 g
EDTA	0,2923 g
Sakkaroz	171,2 g
KCl	11,2 g
Dithiotreitol (DTT)	0,1543 g

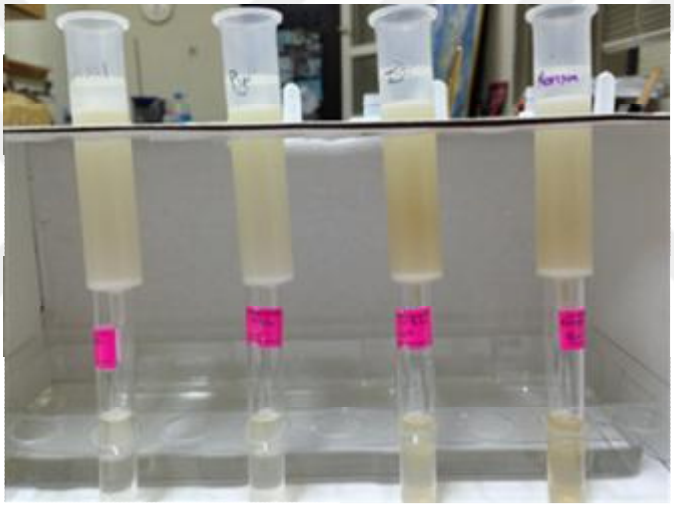
Hemolenf örnekleri, +4°C'de, 10000 g devirde, 10 dk. santrifüj edilmiştir. Barsak örnekleri 500 g' de 15 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda alınan süpernatant başka bir tüpe aktarılarak, 12000 g' de +4 °C'de 45 dk. (10.249 rpm) tekrar santrifüj edilmiştir.



Şekil 3.4. Ultrasonik homojenizatör

Yağ doku örnekleri ise, +4 °C'de ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) (10 sn., 30 W) homojenize edilmiştir. Doku homojenatlarının santrifüj edilmesi sonucunda elde edilen süpernatantlardan 100 µl eppendorflara Bradford tayini için ayrılmıştır. Daha sonra süzme işlemine

geçilmiştir. Süzme işleminde düşük molekül ağırlıklı proteinleri uzaklaştırmak için Sephadex® G-25 jel kolonları kullanılmıştır (Gonzalez-Reya ve ark, 2014). Homojenizasyon tamponu ile kolonlar 5 defa temizlenmiş, temizlenen kolonlara 2500 µl örnek koyularak tamamen süzülmesi beklenmiştir. Süzülme işleminden sonra, 3500 µl tampon eklenmiş ve süzülen örnekler enzim aktivitesi için eppendorf tüplere ayrılmıştır. Tüplere ayrılan örnekler, -80 °C'de enzim aktivitelerinin tayini işlemlerine kadar Revco Ultima II marka derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.5**.** Homojenatların Sephadex® G-25 jel kolonlarında süzme işlemi

3.2.5. Lipid Peroksidasyon Ürünü olan Malondialdehid (MDA) Miktarının Tayini

Antioksidan sistemin detoksifikasyonda yetersiz kaldığı durumlarda, özellikle membran lipidlerinin bozulmasıyla sonuçlanan lipid peroksidasyonunda sekonder bir ürün olan malondialdehidin (MDA) aerobik koşullarda, pH 3.5'te tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95ºC'de inkübasyonu sonucunda oluşturduğu renkli kompleksin spektrofotometrede 535 nm. dalga boyunda ölçülmesi ile lipidlere ait

peroksidasyon belirlenmektedir (Bar-Or ve ark, 2001). MDA miktarı, 1,56 x 10^5 M^{-1} cm^{-1} sayısı kullanılarak nmol/mg protein olarak hesaplandı.

Çözeltiler

a. Tiyobarbitürik asit (TBA) (%0,8) (pH 3.5)

TBA 0,8 g

100 ml' ye kadar ultra saf su ilave edilir.

b. Trikloraasetik asit (TCA) (%20)

TCA 20 g

100 ml' ye kadar ultra saf su ilave edilir.

Çizelge 3.3**.** Standart çözeltiler

Konsantrasyon (µg/L)	**0**	**10**	**20**	**30**	**40**	**60**	**80**	**100**
Stok standart (400nmol/mL)	0	0,25	0,50	0,75	1,00	1,50	2,00	2,50
Ultra saf su (ml)	10	9,75	9,50	9,25	9,00	8,50	8,00	7,50

c. 1,1,3,3 tetrametoksipropan (Yoğunluk 0.99 g/mL)

1,1,3,3 tetrametoksipropan 6,6 µL

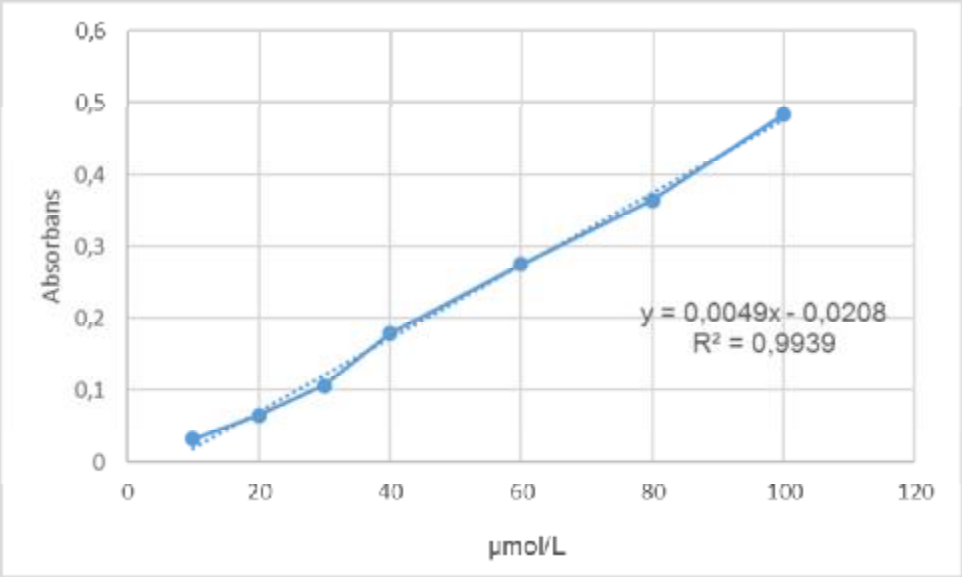
100 ml' ye kadar ultra saf su ilave edilir.

Standart grafiğin hazırlanması

Stok standarttan 6.6 µL alınıp 100 ml'ye ultra saf su ile tamamlanır (400 nmol/mL'lik günlük standart olur). 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 nmol/mL'lik çalışma standartları hazırlanır.

Çizelge 3.4. Standart çözeltilerin ölçülmesi

Konsantrasyon (µg/L)	**0**	**10**	**20**	**30**	**40**	**60**	**80**	**100**
Standart	500	500	500	500	500	500	500	500
%20 TCA	250	250	250	250	250	250	250	250
Karışım 15000 g' de +4 ºC' de 15 dk. Santrifüj edilir.								
%0,8 TBA	400	400	400	400	400	400	400	400
Standart (Supernatant)	600	600	600	600	600	600	600	600



Şekil 3.6. MDA standart grafiği

Örneklerin hazırlanması

Çizelge 3.5**.** Örneklerin MDA miktarlarının ölçülmesi

Solüsyon	**Hacim (µl)**	**Kör (µl)**
%20 TCA	250	250
Örnek	500	-
Ultra saf su	-	500
Karışım 15000 g' de +4 ºC' de 15 dk. santrifüj edilir.		
Santrifüj sonunda elde edilen supernatant	600	600
%0,8 TBA	400	400
Karışım 100 ºC' de 60 dk. inkübe edilir.		

Örnekler, 535 nm. absorbansta spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.2.6. Dokuların Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.6.1. Süperoksit dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD: EC: 1.15.1.1) aktivitesi ksantinoksidaz/ hipoksantin sistemi tarafından sitokrom c' nin azalmasının ölçülmesiyle tespit edilmektedir.1 ünite SOD, sitokrom c azalışının %50' sinin inhibe edilmesiyle biriken enzim miktarı ile tanımlanmaktadır (McCord ve Fridovich, 1969). SOD aktivitesi, total protein konsantrasyonunun U mg^{-1} olarak tanımlanmasıyla elde edilir.

a. Çözeltiler:

Fosfat tamponu;

Solüsyon A: KH_2PO_4 6,8 g

EDTA 0,0292 g

1L ultra saf su

Solüsyon B; K_2HPO_4 8,7 g

EDTA 0,0292 g

1L ultra saf su

100 ml Sol A+ 850 ml Sol B; pH 7.8

Hipoksantin;

Hipoksantin 20,4 g

Ultra saf su 100 ml

Tamamen çözünene kadar 50 °C' de ısıtılır.

Sitokrom c oksidaz;

Sitokrom c 37,5 g

Fosfat tamponu 20 ml

Ksantin oksidaz (56 um/ml):

Ksantin 50 µl (38,5 U/ml)

Fosfat tamponu 2 ml

b. Ksantin oksidaz testi:

Çizelge 3.6**.** Ksantin oksidaz testi

Solüsyon	**Hacim (µl)**
Fosfat tamponu	2700
Hipoksantin	100
Sitokrom c oksidaz	100
Ksantin oksidaz	100
Toplam	3000

Örnekler okunmadan önce ksantin oksidaz testi yapılmıştır. Ölçümler, 550 nm absorbansta bir dakika boyunca üçer kez tekrar edilmiştir.

c. Örneklerin ölçülmesi:

Çizelge 3.7. Örneklerin SOD aktivitelerinin ölçülmesi

Solüsyon	**Hacim (µl)**	**Kör (µl)**
Fosfat tamponu	2650	2800
Hipoksantin	100	100
Sitokrom c oksidaz	100	100
Örnek	50	-
Ksantin oksidaz	100	-
Toplam	3000	3000

Örnekler 550 nm absorbansda 1 dakika boyunca kinetik olarak spektrofotometrede ölçülmüştür.

d. Hesaplama:

Ksantin inhibisyonu;

% I= 100x $\left|1 - \frac{\Delta OD örnek}{\Delta OD\ ksantin}\right|$

SOD aktivitesi;

Aktivite (U mg^{-1})=$(\frac{\%I}{50} x\ \frac{3}{Vörnek(ml)} x\ 1.4)/TP(\frac{mg}{ml}))$

50– Ekstinksiyon katsayısı

3– Reaksiyon küvetlerinin toplam hacmi

1.4– Örneklerin saflaştırılmasında kullanılan Sephadex kolonlarının seyreltme faktörü

TP– Total protein konsantrasyonu

3.2.6.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Tayini

Katalaz (CAT: EC: 1.11.1.6) aktivitesi bir dakika boyunca 240 nm absorbansta H_2O_2' in parçalanmasıyla açığa çıkan azalan absorbansın ölçülmesidir. Sabit sayı (ε_{240}= 40 $M^{-1}cm^{-1}$) kullanılarak birim zaman başına absorbanstaki değişimler katalaz aktivitesinin ölçümü olarak alınmıştır. Enzim aktivitesi nmol min^{-1} mg^{-1} protein birimiyle verilmiştir (Greenwald, 1985).

a. Çözeltiler:

Fosfat tamponu;

Solüsyon A: KH_2PO_4 10.9 g

1L ultra saf su

Solüsyon B; K_2HPO_4 13.92 g

1L ultra saf su

50 ml Sol A+ 250 ml Sol B; pH 7.8

1L ultra saf su ile tamamlanır. pH 7.5 olarak HCl ile ayarlanır.

%30 H_2O_2:

Ayrı bir mezürde %30' luk H_2O_2 1,7 ml konulur onun üzerine hazırlanan fosfat tamponu ile 100 ml' ye tamamlanır. Hazırlanan bu çözelti ayrı bir şişeye konur.

b. Örneklerin ölçülmesi

Çizelge 3.8**.** Örneklerin CAT aktivitelerinin ölçülmesi

Solüsyon	**Hacim (µl)**	**Kör (µl)**
Fosfat tamponu	1900	3000
H_2O_2	1000	-
Örnek	100	-
Toplam	3000	3000

Örneklerin, 240 nm absorbansta 10 saniye aralıklarla 1 dakika boyunca kinetik olarak ölçümleri spektrofotometrede yapılmıştır.

c. Hesaplama

$$Aktivite\ (nmol\ \mathrm{dk}^{-1}mg^{-1}) = ((\frac{|DOD\ örnek|}{40} \times \frac{3}{V_{örnek\,(ml)}} \times 1.4) / TP(mg/ml)) * 1000$$

40 – Ekstinksiyon katsayısı

3 – Reaksiyon küvetlerindeki topla hacim

1.4 – Örneklerin saflaştırılmasında kullanılan Sephadex kolonlarının seyreltme faktörü

TP – Total protein konsantrasyonu

3.2.6.3. Glutatyon peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Tayini

Total glutatyon peroksidaz (GPx: EC: 1.11.1.9) NADPH' ın 340 nm' de oksidasyonunu takiben glutatyon reduktaz, redükte glutatyon ve substrat olarak kümen hidroperoksit varlığında ölçülür (Lawrence ve Burk, 1976). GPx aktivitesi, total protein konsantrasyonun nmol dk^{-1} mg^{-1} cinsinden ifade edilir.

a. Çözeltiler:

Fosfat tamponu;

Solüsyon A: KH_2PO_4 13.6 g

1L ultra saf su

Solüsyon B; K_2HPO_4 17.4 g

1L ultra saf su

50 ml Sol A+ 250 ml Sol B; pH 7.8

GSH (redükte glutatyon);

GSH 0,123 g

Fosfat tamponu 10 ml

Kümen hidroperoksit

Kümen (%80) 0,563 ml

Etanol 20 ml

100 ml' ye kadar ultra saf su ilave edilir.

GR (glutatyon reduktaz)

GR 38,4 µl (38,5 U/ml)

Fosfat tamponu 1,78 ml

NADPH

NADPH 4 mg

Fosfat tamponu 2 ml

b. Kümen hidroperoksit testi

Çizelge 3.9**.** Kümen hidroperoksit testi

Solüsyon	**Hacim (µl)**
Fosfat tamponu (100mM)	450
GSH (40 mM)	50
GR (20 U/ml)	50
NADPH (2,4 mM)	50
Tris tamponu*	300
Kümen hidroperoksit	100
Toplam	1000

*Örneğin homojenizasyonunda kullanılan Tris HCl tamponu

c. Örneklerin ölçülmesi

Çizelge 3.10**.** Örneklerin GPx aktivitelerinin ölçülmesi

Solüsyon	**Hacim (µl)**	**Kör (µl)**
Fosfat tamponu (100mM)	450	1000
GSH (40 mM)	50	-
GR (20 U/ml)	50	-
NADPH (2,4 mM)	50	-
Örnek	300	-
Kümen hidroperoksit	100	-
Toplam	1000	1000

Örnekler, 340 nm absorbansda 1 dakika boyunca spektrofotometrede ölçülmüştür.

d. Hesaplama

Aktivite (nmol dk^{-1} mg^{-1})=$\left(\frac{|\Delta OD_{örnek}-\Delta OD_{kümen}|}{6,2} x \frac{1}{v_{örnek}(ml)} 1,4\right) / TP\left(\frac{mg}{ml}\right) x 1000$

6,2– Ekstinksiyon katsayısı

1– Reaksiyon küvetlerinin total hacmi

1.4– Sephadex kolonunun seyreltme faktörü

TP– Total protein konsantrasyonu

3.2.7. Detoksifikasyon Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.7.1. Asetilkolinesteraz (AChE) Enzim Aktivitesinin Tayini

Asetilkolinesteraz (AChE: EC: 3.1.1.7), asetiltiyokolinin tiyokolin ile asetata parçalanması reaksiyonunu katalizleyen bir enzimdir. AChE aktivitesi, tiyokolin ile DTNB arasındaki reaksiyonun sonucunda oluşan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asitin

verdiği sarı rengin yoğunluğunun, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmesi ile belirlenmiştir (Ellman ve ark., 1961).

Çözeltiler:

a. Tris HCl (100 mM; pH: 8.0);

Tris (hidroksimetil)-aminometan ($NH_2C(CH_2OH)_3$)	12,11 g
Ultra saf su	1000 mL

pH, HCl çözeltisi ile ayarlanmıştır. Çözelti her zaman soğukta (4 ºC) saklanır.

b. Asetilkolin solüsyonu (ATC) (10mM);

Asetilkolin ($C_7H_{16}NOS.I$)	5,784 mg
Ultra saf su	2 mL

c. 5.5'-ditiyo-bis (2 nitrobenzoat) (DTNB) (1Mm);

5.5'-ditiyo-bis (2 nitrobenzoat) (DTNB) ($C_{14}H_8N_2O_8S_2$)	1,5852 mg
Tris HCl (100 Mm, pH: 8.0)	4 mL

d. %10 Triton;

Triton X100 ($C_{34}H_{62}O_{11}$)	10 µl
Ultra saf su	10 mL

Örneklerin ölçülmesi:

Plastik test tüplerinin daraları alındıktan sonra örnekler konularak tekrar ağırlıkları alınmış ve dokuların ağırlıkları hesaplanmıştır. Üzerlerine 1:5 oranında Tris HCl (100 mM, pH: 8.0) çözeltisi eklenmiştir [doku (g): Tris HCl (mL)]. Tris HCl solüsyonun miktarının 10 katı hacminde %10 Triton µl cinsinden karışıma ilave edilmiştir. Örnekler 2 dk. homojenize edilmiştir. Toplam homojenat 12000 g' de +4 ºC' de 30 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen supernatantın

bir kısmı total protein tayini için, kalan kısmı ise AChE aktivitesinin belirlenmesi için -80 ºC' de derin dondurucuda saklanmıştır.

AChE aktivitesinin tayini:

Çizelge 3.3. Örneklerin AChE aktivitelerinin ölçülmesi

Solüsyon	**Hacim (µl)**	**Kör (µl)**
Tris HCl	2250	2250
DTNB (1 mM)	300	300
Örnek	150	150 µl Tris HCl eklenir.
Karışım 5 dk. oda sıcaklığında bekletilir.		
ATC (10 mM)	300	300

Örnekler 405 nm absorbansda 1 dakika boyunca kinetik olarak spektrofotometrede ölçülmüştür.

Hesaplama:

$$\frac{\Delta A\ (dk^{-1})}{V\text{örnek}\ (mL)} x \frac{10^3}{[protein]\left(\frac{mg}{ml}\right)} \longrightarrow \text{U/dk/mg protein}$$

A= absorbans

$V_{örnek}$= örnek hacmi (150 µl)

% inhibisyon= (1- $A_{örnek}$/ $A_{kontrol}$) x 100

3.2.7.2. Sitokrom P450 (Cyt P450) Enzim Aktivitesinin Tayini

Sitokrom P450 monooksijenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için substrat olarak PNOD (4-nitroanisol) kullanılmıştır (Rose ve ark., 1995).

Çözeltiler

a. Sodyum fosfat tamponu (0.1 M; pH: 7.8)

Sol A (0,2 M): 31,21 g NaH_2PO_4. H_2O

NaH_2PO_4. H_2O tartıldıktan sonra bir miktar %1 asetonda çözülür. Hacim 1 lt' ye tamamlanmıştır.

Sol B (0,2 M): 53,59 g Na_2HPO_4. $7H_2O$

Na_2HPO_4. $7H_2O$ tartıldıktan sonra bir miktar %1 asetonda çözülür. Hacim 1 lt' ye tamamlanmıştır.

Tampon: 8,5 mL Sol A + 91,5 mL Sol B (pH: 7,8)

Hacim pH kontrolünden sonra 200 mL' ye tamamlanmıştır.

Daha sonra bu karşımın üzerine;

EDTA	0,0744 g
Feniltioüre	0,0304 g
DTT	0,0308 g eklenerek homojenizasyon tamponu hazırlanmıştır.

b. 4-nitroanisol (2 mM)

4-nitroanisol	61 mg

1 mL %100 Etanolde çözülmüştür. Karışımdan 625 µL alınarak, 125 mL ılık sodyum fosfat tamponuna eklenmiştir.

c. NADPH (9.6 mM)

NADPH	12 mg

Tartım işleminden sonra üzerine 1500 µL sodyum fosfat tamponu eklenir.

Örneklerin ölçülmesi

30°C' de 15 dakika boyunca 15 saniye aralıklarla 405 nm' de kinetik ölçüm yapılmıştır.

Çizelge 3.4**.** Örneklerin Cyt P450 aktivitelerinin ölçülmesi

Solüsyon	**Hacim (µl)**	**Kör (µl)**
Sodyum fosfat tamponu	-	900
4-nitroanisol	1000	1000
Örnek	900	-
Karışım 30 dk. 30°C' de inkubasyona bırakılmıştır.		
NADPH	100	100
Total	2000	2000

Molar absorbans katsayısının (ε) ve Enzim aktivitesinin hesaplanması

Kinetik okuma sonucu elde edilen optik yoğunluk (mO.D.) (nmol 4-nitroanisol dk^{-1} mg^{-1} protein) olarak ifade edilmiştir (Rose ve ark. 1991; 1995). Bu dönüşümün yapılmasında ürüne dönüşen madde olarak 4-nitroanisolün ekstinksiyon katsayısı (ελ) kullanılmıştır. 4-nitroanisolün ekstinsiyon katsayısının hesaplanmasında değişen konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Bunların aynı spektrofotometrede 405 nm' de okumaları yapılmıştır. Denemelerde elde edilen absorbans değerlerinden bir regresyon eşitliği elde edilerek, eğim 4-nitroanisol ekstinsiyon katsayısı olarak kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2008; Hephızlı, 2011). Bu değer, örnekteki enzim ünitesinin (U) bulunmasında kullanılarak hesaplanmıştır (Temizkan ve Arda, 2008).

$$U=\frac{Vt \times dA/dt \times 1000 \times sulandırma faktörü}{\varepsilon\lambda \times Vs \times d}$$

Burada:

U= Örnekteki enzim ünitesi;

ελ= absorbsiyon katsayısı;

d= küvetin ışık yolu;

dA/dt= birim zamanda absorbans değişimi;

Vt= reaksiyon karışımının toplam hacmi,

Vs= örnek hacmi

Enzim aktivite ise U/mg proteinden hesaplanmıştır.

3.2.7.3. Glutatyon-S-transferaz (GST) Enzim Aktivitesinin Tayini

1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)' nin redükte glutatyon ile konjugasyonunu katalize eden toplam GST aktivitesinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. 340 nm' de absorbansdaki değişiklik kaydedilmiş ve enzim aktivitesi molar ekstinksiyon katsayısı (ε) 9.6 mM^{-1} cm^{-1} olarak kullanılarak mmol konjuge CDNB/dk/mg protein olarak hesaplanmıştır (Habig ve ark, 1974).

Çözeltiler

a. KH_2PO_4/K_2HPO_4 tamponu (0,2 M; pH: 7.9)

KH_2PO_4 68,05 g (0.2 M)

Tartım işleminden sonra 500 mL' ye tamamlanmıştır.

K_2HPO_4 34,84 g (0.2 M)

Tartım işleminden sonra 1000 mL' ye tamamlanmıştır.

Fosfat tamponu: 0.2 M K_2HPO_4 çözeltisinden 980 mL alınmış, üzerine pH 7.9 oluncaya kadar (yaklaşık 20 mL) 0.2 M KH_2PO_4 çözeltisinden ilave edilmiştir.

b. CDNB (0.2 mM, oda sıcaklığında)

Toplam 25 mL' lik çözelti için;

0,04135 g CDNB 10 mL etanolde çözülüp, vortekslenmiştir. Üzerine 15 mL ultra saf su ilave edilmiş ve oda sıcaklığında saklamıştır.

c. GSH

0,01255 g GSH 5 mL ultra saf suda çözülmüştür.

Örneklerin ölçülmesi

Çizelge 3.5**.** Örneklerin GST aktivitelerinin ölçülmesi

Solüsyon	**Hacim (µl)**
Fosfat tamponu	1850
CDNB	50
GSH	50
Örnek	50
Total	2000

Enzim aktivitesinin hesaplanması

$[(\Delta_{340}$ nm dk^{-1} /ε) X ($V_{küvet}$/ $V_{örnek}$)] / reaksiyon zamanı = mmol. dk^{-1}

Δ_{340} nm min^{-1} = absorbans

ε = CNDB konjugatının ekstinksiyon katsayısı = 9.6 mM^{-1} cm^{-1}

$V_{küvet}$ = Reaksiyona giren toplam hacim 2000 µL

$V_{örnek}$ = Örnek hacmi= 50 µL

Reaksiyon süresi = 1 dakika

$[(\Delta_{340}$ nm / 9.6) X (2000 µl / 50 µl)] / 1 dk = **A** mmol. dk^{-1}

GST aktivitesi=A/Total protein miktarı (mg/mL) = mmol konjuge CDNB dk^{-1}.mg^{-1} protein

3.2.8. Total Protein Miktarının Belirlenmesi

Bradford yöntemi, proteinlerde bulunan arjinin, triptofan, tirozin, histidin ve fenilalanin gibi aminoasit rezidülerinin, Coomassie brillant blue G-250 boyasına bağlanmasıyla mavi renkli kompleks oluşması esasına dayanır. Renklendirilmiş çözeltinin absorbansı 595 nm'de ölçülür (Bradford, 1976).

Standart grafiğin hazırlanması

Bovin serum albümin (BSA) kullanılarak 1 mg/mL' lik stok protein çözeltisi hazırlanmıştır. Stok protein çözeltisi 0, 10, 20, 30 ve 50 µg/L derişimlerinde seyreltilerek standart protein çözeltileri hazırlanmıştır. Örnek protein derişimlerinin ölçülmesinde kullanılan yöntem ile bu standartların absorbans değerleri belirlenmiş ve standart grafiğin oluşturulmasında kullanılmıştır. Çözeltiler hazırlandıktan sonra 5 saniye vortekste karıştırılmıştır.

Çizelge 3.6**.** Standart protein çözeltileri

Konsantrasyon (µg/L)	**0**	**10**	**20**	**30**	**50**
BSA (ml)	0	0,05	0,1	0,15	0,25
Ultra saf su (ml)	5	4,95	4,9	4,85	4,75

Bradford reaktifinin hazırlanması

10 ml Bradford reaktifi üzerine 40 ml ultra saf su eklenerek hazırlanmıştır.

Örneklerin hazırlanması

Dokuların homojenizsayonu sonucunda elde edilen supernatantlar ilk önce 1/100 oranında seyreltilmiş, daha sonra tekrar 1/5 oranında seyreltilmiştir.

1.seyreltme: 1/100; 990 µl ultra saf su
10 µl örnek

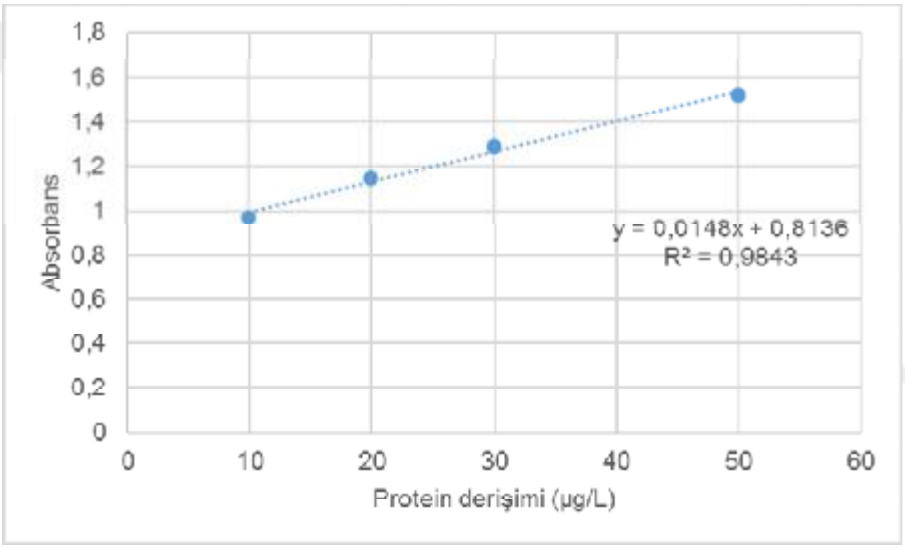
2.seyreltme: 1/5; 200 µl ultra saf su
50 µl 1/100 oranında seyreltme yapılmış örnek

Standartların ve örneklerin okunması

Hazırlanan standart çözeltilerden başka bir tüpe 250 µl eklenmiş, üzerine 750 µl Bradford reaktifi ilave edilmiştir. Çözeltiler vorteks ile çalkalandıktan sonra

15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnekler 595 nm absorbansta spektrofotometrede okunmuştur.

Örneklerin protein miktarlarının tayininde ise, seyreltilmiş supernatantlardan 250 µl alınarak üzerlerine 750 µl Bradford reaktifi ilave edilmiştir. Çözeltiler vorteks ile çalkalandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnekler 595 nm absorbansta spektrofotometrede okunmuştur. Kör olarak örnekle aynı miktarda ultra saf su kullanılmıştır.



Şekil 3.7**.** Protein derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki

3.2.9. *G. mellonella* Larvalarının Hemosit Tiplerinin Belirlenmesi

3.2.9.1. Diferansiyel Hemosit Sayısı

Hemolenf elde edebilmek için son evre larvalar -20ºC'de 3 dakika bekletilerek hareketlerinin yavaşlaması sağlandı. Larvalar %95'lik etanol ile silindikten sonra, birinci arka bacak üstünden ince uçlu diseksiyon iğnesi ile delinip mikrokapiler tüp (SIGMA) yardımıyla 5 µl hemolenf elde edildi. Hemolenf melanizasyona izin vermeden hızlı bir şekilde daha önce alkolle temizlenmiş lamlar üzerine alınarak yayıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Lamların

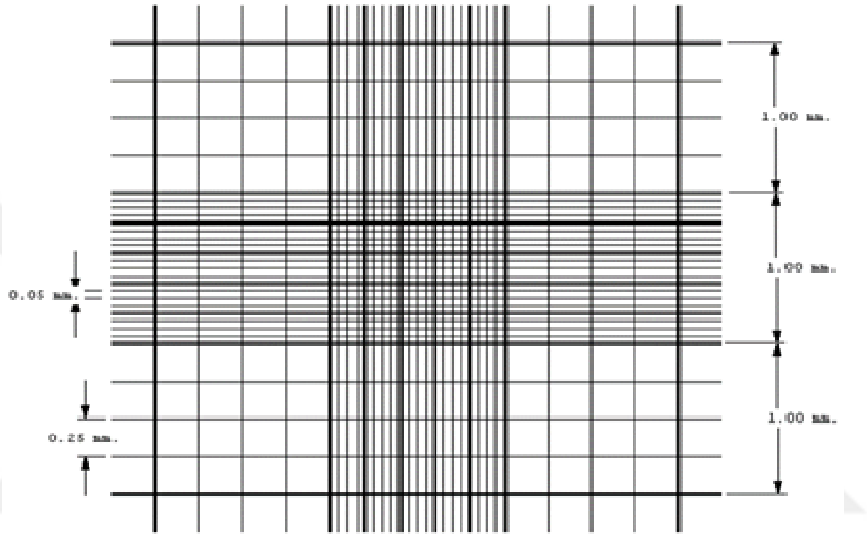
kurumasını takiben hemositlerin fiksasyonu için lamlar 5 dakika süre ile metanol: asetik asit (3:1) çözeltisi içinde bekletildi ve çözelti üzerlerinden akıtılarak kurumaya bırakıldı. Hemositlerin boyanabilmesi için taze olarak hazırlanan Giemsa boya çözeltisi kullanıldı. Boyama çözeltisinin hazırlanabilmesi için, 3 ml giemsa boya solüsyonu (MERCK Giemsa's Azure Eosine Methylene Blue Solution), içerisinde 57 ml PBS (pH 7.4) bulunan lam boyama kaplarına yavaşça damlatılarak karıştırıldı ve 10 dakika bekletildi. Tespit işleminden sonra kurutulan lamlar giemsa boya çözeltisi içine alınarak 15 dakika süresince boyanmaları sağlandı. Boyanma süresi sonunda lamlar saf su ile yıkandı, en son PBS (Fosfat buffer saline, Sigma) 'den geçirildi. Kuruma işleminden sonra ksilolden geçirilerek tekrar kurumaya bırakıldı. Daha sonra, entellan ile kapatılarak Leica DM750 marka mikroskopta hemosit tipleri belirlenerek sayım işlemi yapıldı.

3.2.9.2. Total Hemosit sayısı

Elde edilen hemolenf örneğinden 4 µl alınarak, buz üzerinde bekletilen ve içerisinde 36 µl antikoagulant (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M Na2EDTA ve 0,041 M Sitrik asit, pH = 4,5) bulunan ependorf tüplerine aktarılmıştır. 1:10 oranında seyreltme yapılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresine yüklenmiştir. Hemositler, Leica DM750 marka mikroskopta sayılarak, bir mililitre hemolenfteki hemosit sayısı belirlenmiştir. Sayılan hemositler, Jones (1962) methodu kullanılarak hesaplanmıştır.

Neubauer hemositometresi, üzerinde iki farklı sayım alanı bulunan ve bu sayım alanlarının bir çukurlukla birbirinden ayrıldığı sayma lamıdır. Her bir sayım alanında köşelerde dört tane 1 mm^2 'lik bölümler (büyük kareler) bulunur. Bunlar 16 tane orta büyüklükte kareye ayrılmıştır (1/4 x 1/4 = 1/16 mm^2). Ortada bulunan büyük kare ise 25 tane orta büyüklükte kareye ayrılmıştır. Orta büyüklükteki karelerin etrafı çift çizgi ile çevrilmiştir. Her bir orta kare de 16 küçük kareye bölünmüştür. Böylece, ortadaki alanda 25 tane orta kare, 400 tane küçük kare

vardır. Bir küçük karenin alanı 1/20 x 1/20 = 1/400 mm^2 'dir. Sayım alanı dışında kalan kenarlar, sayım alanı yüzeyinden 0,1 mm yüksektir. Sayım alanı üzerine hemositometrenin lameli konulunca, lamel ile sayım alanı yüzeyi arasında 0,1 mm'lik bir boşluk kalır. Böylece lam ve lamel arasında kalan her karenin hacmi hesaplanabilir.



Şekil 3.8**.** Neubauer Hemositometresi

Hesaplama işlemi aşağıdaki formüle göre yapılır. En büyük (1mm^2 'lik) karenin hacmi = 1 X 1 X 0,1 = 0,1 mm^3 0,1 mm^3 = 0,0001 cm^3 = 0,0001 ml'dir. Deney gruplarında hemositometre lamınındaki 1 mm^2 'lik büyük karenin tamamı sayılarak toplam hemosit sayıları belirlendi. Mililitredeki toplam hemosit sayısının hesaplanması için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

Hücre sayısı/ml = Büyük karede sayılan hücre sayısı x Sulandırma katsayısı x 10^4

3.2.10. İstatistiksel Analizler

Kontrol grubu ve insektisit uygulanmış gruplar arasındaki istatistiksel veriler SPSS 21.0 bilgisayar programında SNK testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. İnsektisitlerin LD_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

G. mellonella 5. evre larvaları için LD_{50} değerleri SPSS 21.00 istatistik veri programında Probit Analizi kullanılarak hesaplanmıştır. Beşinci evre *G. mellonella* larvaları için pyriproxyfenin 72 saatlik süre sonunda LD_{50} değeri 2385 µg/ml olarak belirlenmiştir. %95'lik güvenirlik limitleri 1845-3228 µg/ml değerleri arasında tespit edilmiştir.

B. thuringiensis' in 10.000 µg/ml konsantrasyonun uygulandığı grupta, 72 saat sonunda %100 ölüm gözlenmiştir. *G. mellonella* 5. evre larvalarına *B. thuringiensis*' in toksik etkisi ile ilgili testlerden elde edilen veriler, SPSS 21.00 istatistik veri programında Probit Analizi ile değerlendirilmiş ve LD_{50} değeri 359 µg/ml olarak belirlenmiştir. %95'lik güvenirlik limitleri 45-3460 µg/ml değerleri arasında tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. *G. mellonella* larvaları için pyriproxyfen biyodenemelerinin toksisite sonuçları

	Pyriproxyfen	
Letal Konsantrasyon	**Konsantrasyon (µg/ml)**	**%95 Güven Aralığı (µg/ml)**
LD 10.00	1044	142-1506
LD 15.00	1223	243-1665
LD 20.00	1386	371-1809
LD 30.00	1701	728-2098
LD 40.00	2026	1247-2476
LD 50.00	**2385**	**1845-3228**
LD 80.00	4104	3098-17045
LD 90.00	5450	3713-44502
LD 95.00	6888	4287-98868
LD 99.00	10688	5583-166257

Çizelge 4.2. *G. mellonella* larvaları için *B. thuringiensis* biyodenemelerinin toksisite sonuçları

	Bacillus thuringiensis	
Letal Konsantrasyon	**Konsantrasyon (µg/ml)**	**%95 Güven Aralığı (µg/ml)**
LD 10.00	14	0.002-84
LD 15.00	26	0.018-132
LD 20.00	43	0.096-197
LD 30.00	95	1.341-424
LD 40.00	189	10-1037
LD 50.00	**359**	**45-3460**
LD 80.00	2997	633-6246
LD 90.00	9090	1452-12347
LD 95.00	12719	2696-27567
LD 99.00	22667	8025-83912

4.1.2. MDA Miktarı

Hemolenfteki MDA miktarında denenen tüm gruplarda, 24 ve 48 saatlik etki sürelerinde kontrole oranla azalma gözlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.3). 24 saatlik etki süresinde kontrole oranla meydana gelen bu azalmanın pyriproxyfen, *B. thuringiensis* ve karışım uygulamalarında sırasıyla %82, %50 ve %90 oranlarında olduğu tespit edilmiştir. 48 saatlik etki süresinde, bu azalma oranları sırasıyla %67, %79 ve %74 olarak belirlenmiştir. Uygulamanın 72 saatlik etki süresinde ise, MDA miktarında kontrole göre tüm uygulama gruplarında artış meydana geldiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Karışım uygulaması yapılan gruptaki MDA miktarı, 24 saatlik etki süresinde tek başlarına pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulanan gruplara oranla azalmıştır (sırasıyla, %44 ve %80,1). 48 saatlik etki süresinde karışım uygulaması yapılan gruptaki MDA miktarı, pyriproxyfen uygulaması yapılan gruba oranla %18,2 azalmış, *B. thuringiensis* uygulaması yapılan gruba oranla %27,8 artmıştır.

Süreye bağlı olarak, tek başına pyriproxyfen uygulanan gruplarda ve karışım uygulaması yapılan gruplarda hemolenfteki MDA miktarında artış meydana gelmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak MDA miktarı üzerine etkileri (Ort±S.H).

	MDA MİKTARI (nmol/mg protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	64,763±0,999 aA	34,584±0,331 aB	10,932±0,313 aC
Pyr	11,538±0,460 bA	11,539±0,488 bA	70,238±0,668 bB
Bt	32,506±0,772 cA	7,390±0,638 cB	35,571±0,461 cC
Pyr+Bt (1:1)	6,463±0,342 dA	9,444±0,832 dB	22,815±0,609 dC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0,05$ düzeyinde istatistik ayrım vardır.

Orta barsaktaki MDA miktarında 24 saatlik etki süresinde, kontrole oranla artış meydana geldiği gözlenmiş, pyriproxyfen, *B. thuringiensis* ve karışım uygulaması yapılan gruplarda artış oranı sırasıyla %128, %48 ve %90 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). 48 saatlik etki süresinde, pyriproxyfen ve karışım uygulaması yapılan gruplarda sırasıyla %20 ve %5 oranında, 72 saatlik etki süresinde sadece pyriproxyfen uygulaması yapılan grupta kontrole oranla %17 oranında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). 48 saatlik etki süresinde, *B. thuringiensis* uygulaması yapılan gruplarda %10 oranında kontrole oranla artış gözlenmiştir. 72 saatlik etki süresinde *B. thuringiensis* ve karışım uygulaması yapılan gruplarda ise, %76 ve %18 oranında artış meydana gelmiştir ($p<0,05$).

Süreye bağlı olarak, pyriproxyfen ve karışım uygulaması yapılan gruplarda istatistiki açıdan önemli bir azalma meydana geldiği belirlenmiş, *B. thuringiensis*

uygulanan grupta MDA miktarında süreye bağlı olarak istatistiki açıdan bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4**.** *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak MDA miktarı üzerine etkileri (Ort±S.H).

	MDA MİKTARI (nmol/mg protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	21,150±1,386 aA	20,980±1,532 aA	17,612±1,001 aA
Pyr	48,225±2,179 cA	16,898±3,675 aB	14,143±0,766 bB
Bt	31,660±4,861 bA	22,816±2,357 aA	27,510±0,943 cA
Pyr+Bt (1:1)	40,980±0,825 cA	19,483±1,473 aB	20,571±0,471 dB

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

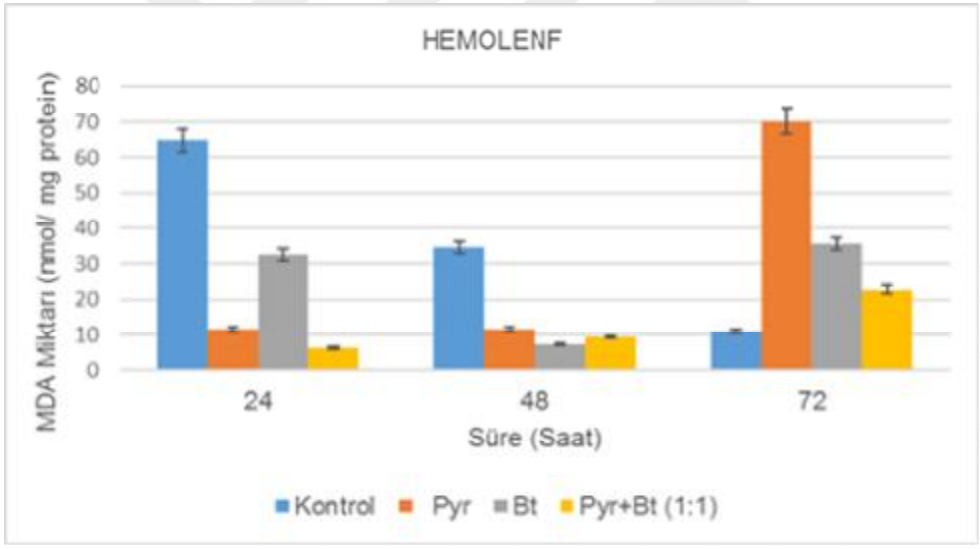
Yağ dokudaki MDA miktarında 24 saatlik etki süresinde kontrole oranla tüm uygulama gruplarında sırasıyla %203, %138 ve %54 oranlarında artış meydana geldiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). 48 saatlik etki süresinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulaması yapılan her iki grupta da %48 azalma meydana geldiği belirlenmiştir. 72 saatlik etki süresinde ise, kontrole oranla sırasıyla %36, %50 ve %27 oranlarında azalma olduğu tespit edilmiştir (p<0,05).

İnsektisitlerin ve karışımlarının süreye bağlı etkisi incelendiğinde, tüm uygulama gruplarında azalma meydana geldiği belirlenmiş ve bu azalma istatistiki açıdan önemli bulunmuştur (p<0,05) (Çizelge 4.5).

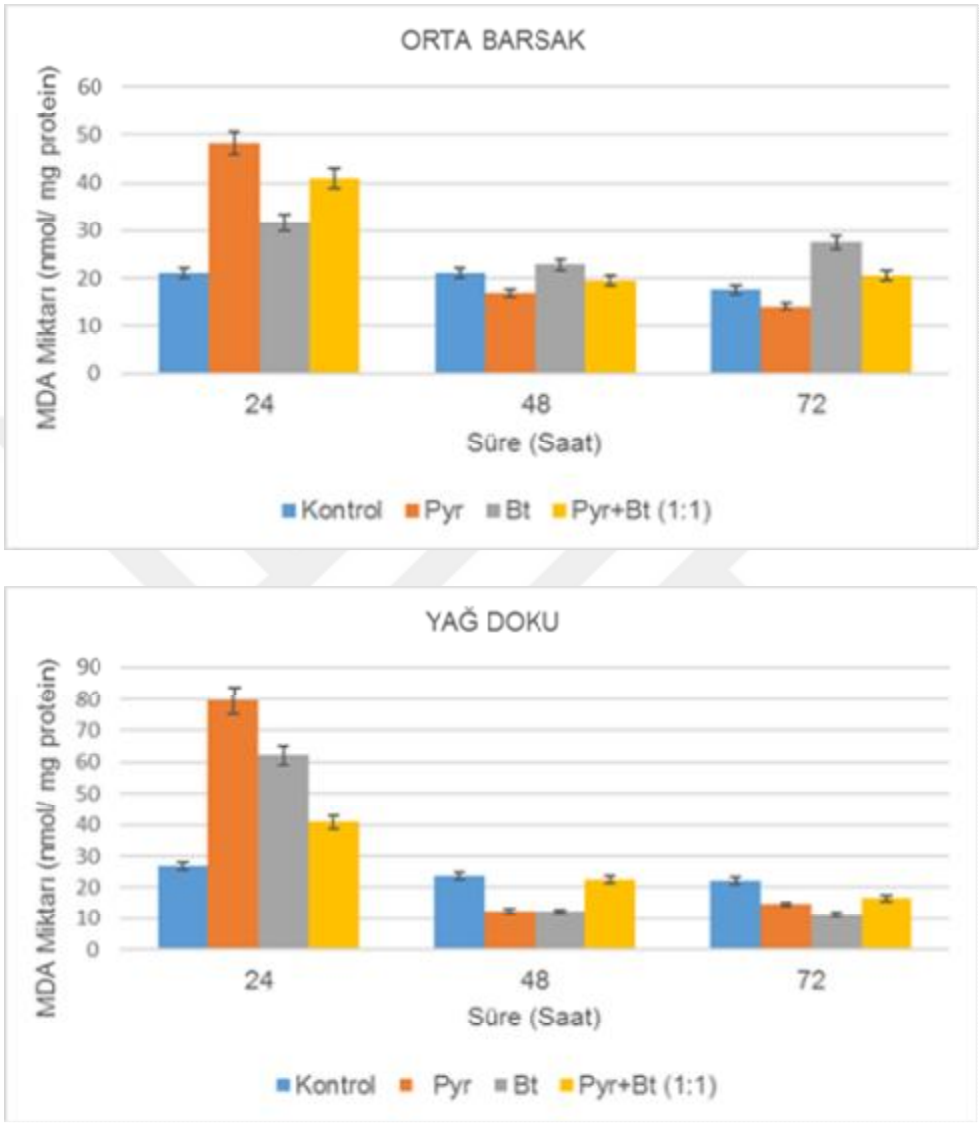
Çizelge 4.5. *G. mellonella*' nın yağ dokusunda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak MDA miktarı üzerine etkileri (Ort±S.H).

	MDA MİKTARI (nmol/mg protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	26,898±2,121 aA	23,565±2,657 aA	22,204±3,910 aA
Pyr	79,449±4,419 bA	12,340±1,556 bB	14,517±2,243 abB
Bt	62,156±5,448 cA	12,136±1,361 bB	11,286±0,530 bB
Pyr+Bt (1:1)	40,874±1,481 dA	22,612±1,650 aB	16,489±1,359 abC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.



Şekil 4.1. Devamı



Şekil 4.1. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının 24, 48 ve 72 saat süreler etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak, yağ doku dokularındaki MDA miktarındaki değişimler (nmol/mg protein)

4.1.3. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

4.1.3.1. SOD Enzim Aktivitesi

Hemolenfteki SOD aktivitesinde 24 saatlik etki süresinde pyriproxyfen uygulanan gruplarda kontrole oranla artış gözlenirken, *B. thuringiensis* ve karışım uygulamalarında azalma meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.6). 48 saatlik etki süresinde hemolenfdeki SOD aktivitesinde insektisitlerin tek başına ve karışım halindeki uygulamalarında kontrole oranla değişim gözlenmezken ($p>0.05$), 72 saatlik etki süresinde ise uygulama gruplarında kontrole göre artış meydana gelmiştir ($p<0.05$). Uygulamadan 72 saat sonra, SOD aktivitesinde karışım uygulaması yapılan grupta, insektisitlerin tek başına uygulandığı gruplara göre, sırasıyla %8,65 ve %8,69 oranlarında artış meydana geldiği gözlenmiştir.

Süreye bağlı olarak, tek başına pyriproxyfen uygulanan gruplarda hemolenfdeki SOD aktivitesi azalma gösterirken, *B. thuringiensis* uygulanan gruplarda ve karışımda herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	SOD AKTİVİTESİ (U mg^{-1} protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s_{\overline{x}}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s_{\overline{x}}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s_{\overline{x}}$ *
Kontrol	115,951±4,092 aA	99,143±2,358 aB	94,984±3,991 aB
Pyr	126,567±4,317 bA	110,581±2,249 aB	101,790±3,949 abB
Bt	101,937±0,359 cA	101,964±3,620 aA	101,748±0,074 abA
Pyr+Bt (1:1)	106,032±2,130 acA	108,271±3,877 aA	110,592±2,140 bA

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

Orta barsaktaki SOD aktivitesinde, 24 saatlik etki süresinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis'*in tek başına ve karışım halindeki uygulamalarında kontrole oranla artış gözlenirken, 48 saatlik etki süresinde *B. thuringiensis* ve karışım uygulanan gruplarda kontrole oranla azalma gözlenmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.7). 72 saatlik etki süresinde ise, tek başına *B. thuringiensis* uygulanan grupta kontrole oranla artış meydana geldiği belirlenmiştir. Karışım uygulaması yapılan gruptaki SOD aktivitesi, insektisitlerin tek başına uygulandığı gruplardaki aktivite sonuçları ile karşılaştırıldığında pyriproxyfen uygulaması yapılan gruplarda, 24 ve 72 saatlik etki sürelerinde değişim gözlenmezken ($p>0.05$), 48 saatlik etki süresinde karışıma oranla artış (%29,5) meydana gelmiştir ($p<0.05$). *B. thuringiensis* uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında ise, 24 saatlik etki süresinde azalma (%8,30), 48 ve 72 saatlik etki sürelerinde ise artış (sırasıyla, %19,7 ve %15,7) gözlenmiştir.

Süreye bağlı değişimde ise, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışım halindeki uygulamalarında orta barsaktaki SOD aktivitesi, 48 saatlik etki süresinde 24 saatlik etkiye oranla azalma gösterirken, 72 saatlik etki süresinde, 48 saatlik etki süresine göre artış gözlenmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7**.** *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H)

	SOD AKTİVİTESİ (U mg^{-1} protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	77,180±2,209 aA	81,479±0,732 aAB	85,664±2,222 aB
Pyr	90,567±2,198 bA	76,824±2422 aB	85,856±2,310 aA
Bt	81,303±0,095 abA	67,539±0,737 bB	96,714±2,314 bC
Pyr+Bt (1:1)	88,052±3,969 bA	54,184±3,754 cB	81,562±0,140 aA

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

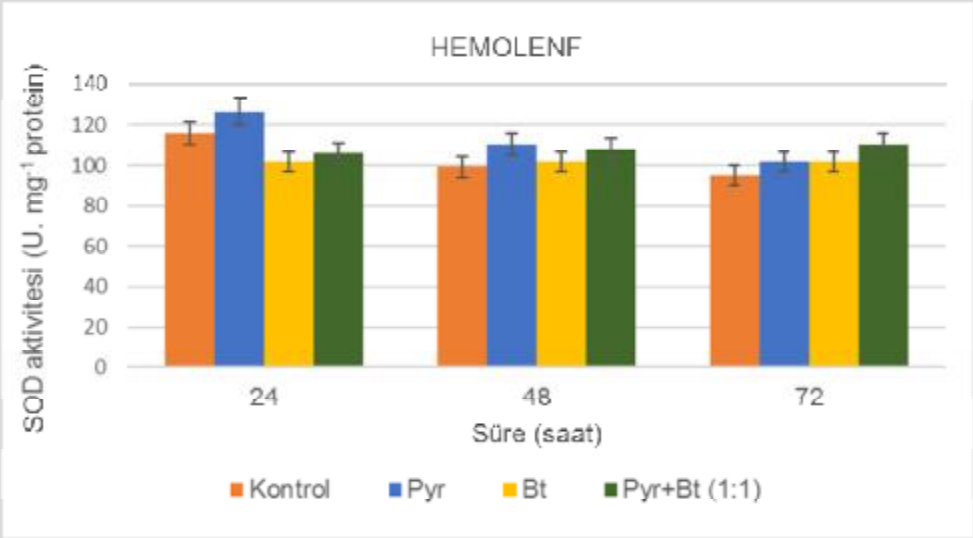
Yağ dokudaki SOD aktivitesinde 24 ve 48 saatlik etki sürelerinde kontrole oranla tüm gruplarda herhangi bir değişim gözlenmezken, 72 saatlik süresinde karışımın etkisinde kontrole oranla artış gözlenmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.8). Karışım uygulaması yapılan grupta, 72 saatlik etki süresinde pyriproxyfenin ve *B. thuringiensis'* in tek başına uygulandığı gruplardaki SOD aktivitesine göre artış (sırasıyla, %11,6 ve %11,7) meydana geldiği gözlenmiştir ($p<0.05$).

İnsektisitlerin süreye bağlı etkisinde, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına uygulandığı gruplarda yağ dokudaki SOD aktivitesinde herhangi bir değişim gözlenmezken, karışımda süreye bağlı olarak artış görülmüştür ($p<0.05$) (Çizelge 4.8).

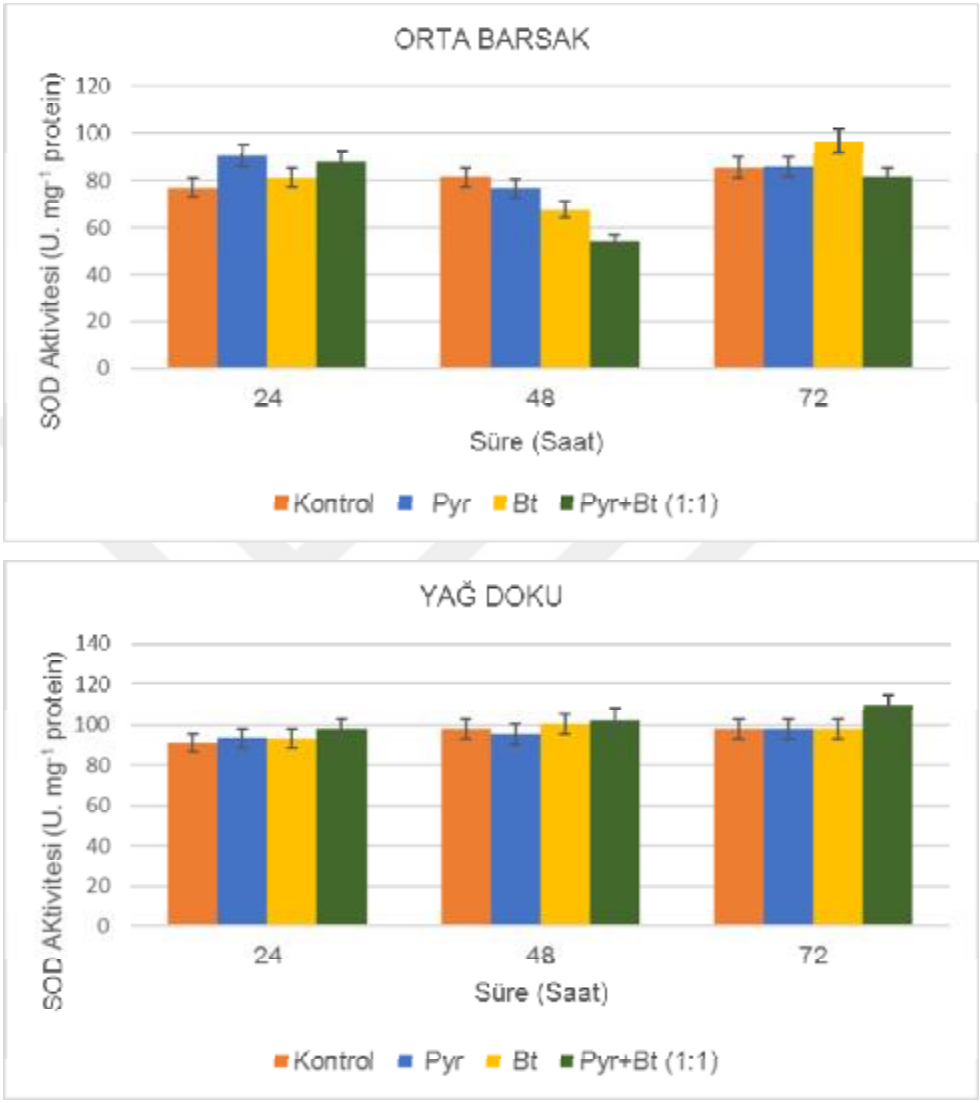
Çizelge 4.8. *G. mellonella*' nın yağ dokuda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H)

	SOD AKTİVİTESİ (U mg^{-1} protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	91,097±2,287 aA	97,891±2,289 aA	97,726±2,391 aA
Pyr	93,407±2,278 aA	95,596±3,931 aA	97,979±2,304 aA
Bt	93,255±6,018 aA	100,207±2,880 aA	97,915±2,274 aA
Pyr+Bt (1:1)	97,769±2,275 aA	102,498±0,008 aB	109,378±0,013 bC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.



Şekil 4.2. Devamı



Şekil 4.2. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak, yağ dokularında 24, 48 ve 72 saat sürelerindeki SOD enzim aktivitesi (U mg^{-1} protein).

4.1.2.2. CAT Enzim Aktivitesi

Hemolenfteki CAT aktivitesinde, 24 saatlik etki süresinde pyriproxyfen uygulanan gruplarda ve karışımda kontrole oranla azalma meydana gelirken, *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta artış olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.9). 48 ve 72 saatlik etki süresinde hemolenfdeki CAT aktivitesi, uygulanan tüm gruplarda kontrole oranla artış göstermiştir. Karışımın uygulaması yapılan gruplarda, 24 saatlik etki süresinde hemolenfdeki CAT aktivitesi tek başına pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulanan gruplara oranla azalma (%60,9 ve %80,2) gösterirken, 48 saatlik etki süresinde tek başına pyriproxyfen uygulanan gruplara oranla artış (%60,1) göstermiş, tek başına *B. thuringiensis* uygulanan gruplara oranla ise azalma (%19,5) göstermiştir ($p<0.05$). Süreye bağlı olarak, insektisitlerin tek başına uygulanması sonucunda süreye bağlı azalma görülürken, karışım uygulaması yapılan gruplarda 48 ve 72. saatlerde artış gözlenmiştir.

Çizelge 4.9. *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	CAT AKTİVİTESİ (µmol dk^{-1} mg^{-1} protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	88.328±3,732 aA	24,841±1,359 aB	35,052±2,035 aB
Pyr	75,658±2,456 bA	48,878±4,137 bB	42,160±2,850 bC
Bt	149,557±1,630 cA	99,725±3,302 cB	61,430±0,508 cC
Pyr+Bt (1:1)	29,603±3,847 dA	80,230±5,147 dB	66,958±3,984 cB

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

Orta barsaktaki CAT aktivitesi 24 ve 72 saatlik etki sürelerinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerleri ile karışımın etkisinde kontrole oranla azalma göstermiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.10). 48 saatlik etki süresinde ise tüm gruplarda

kontrole oranla artış gözlenmiştir. Uygulamadan 24 saat sonra karışımın etkisinde orta barsaktaki CAT aktivitesinde, pyriroxyfen ve *B. thuringiensis'* in tek başlarına uygulandığı gruplara oranla azalma (sırasıyla %37,7 ve %50,7) meydana gelmiştir. Uygulamadan 48 saat sonra, pyriproxyfen uygulaması yapılan gruba oranla artış (%20,6), *B. thuringiensis* uygulanan gruba oranla ise azalma (%15,6) gözlenmiştir. 72 saatlik etki süresinde ise karışım uygulaması yapılan gruplarda pyriproxyfenin ve *B. thuringiensis'* in tek başına uygulandığı gruplara oranla artış (sırasıyla, %24 ve %33,6) göstermiştir ($p<0.05$). CAT aktivitesi üzerine karışımın etkisinde, insektisitlerin tek başlarına ve karışım halindeki uygulamalarında 48 saatlik etki süresinde 24 saatlik etkiye oranla artış gözlenirken, 72 saatlik etkide ise azalma görülmüştür ($P<0.05$).

Süreye bağlı olarak, pyriproxyfen uygulaması yapılan grupta CAT aktivitesinde artış görülürken, *B. thuringiensis*' in tek başına uygulandığı gruplarda 48. saatte, karışım uygulaması yapılan grupta ise 48. ve 72. saatlerde artış meydana gelmiştir.

Çizelge 4.10**.** *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	CAT AKTİVİTESİ (µmol dk^{-1} mg^{-1} protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	492,54±18,835 aA	475,260±23,072 aB	486,734±5,473 aA
Pyr	284,40±4,963 bA	782,013±17,092 bA	363,660±19,67 bC
Bt	359,55±1,043 cA	942,865±11,631 cB	337,412±2,939 bA
Pyr+Bt (1:1)	177,19±1,802 dA	796,120±28,591 dB	450,789±2,421 cC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0,05$ düzeyinde istatistik ayrım vardır.

Yağ dokudaki CAT aktivitesi, *B. thuringiensis*' in LD_{50} değeri uygulanan grupta, kontrole oranla belirlenen tüm sürelerde artmış, pyriproxyfenin LD_{50} değeri

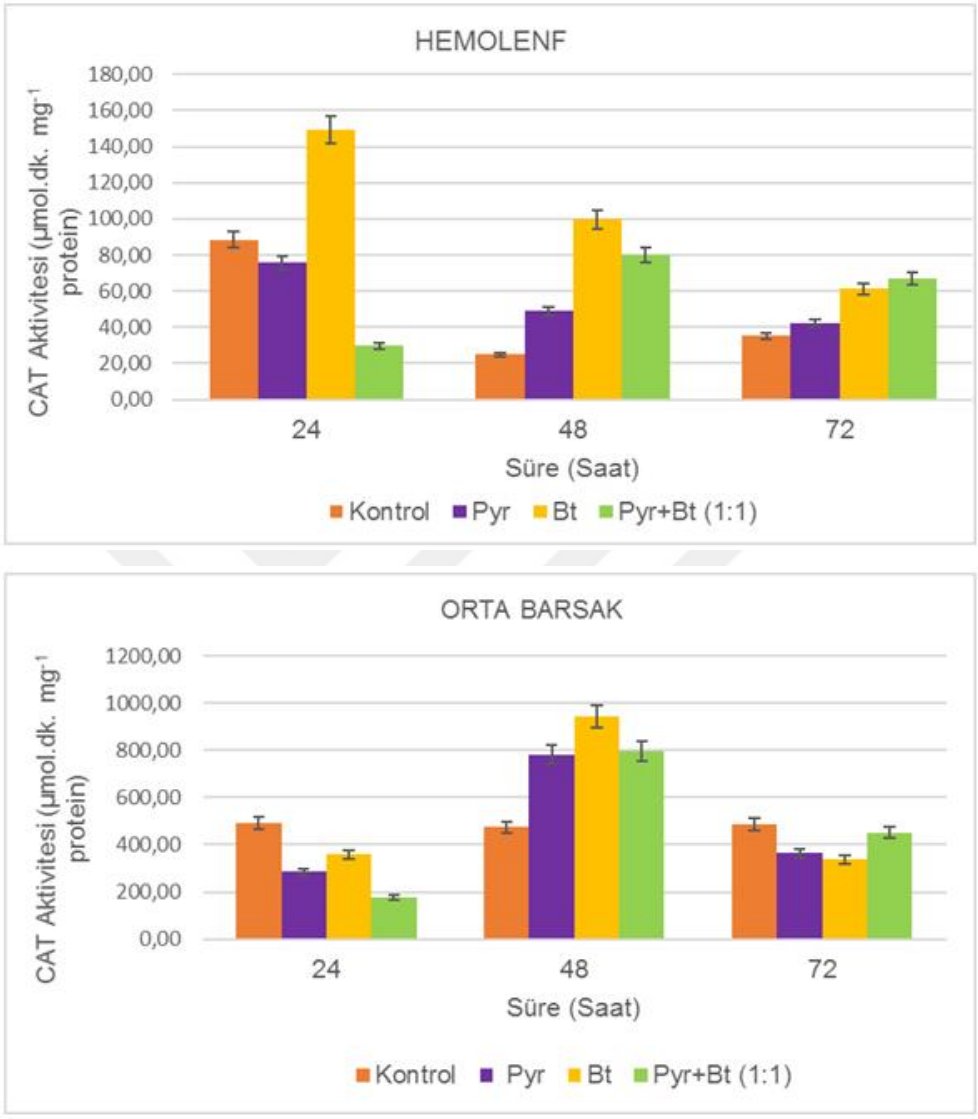
uygulanan grupta ve karışımda 24 saatlik etki sürelerinde azalırken, 48 ve 72 saatlik etki sürelerinde artmıştır (P<0.05) (Çizelge 4.11). Karışımın etkisinde yağ dokudaki CAT aktivitesi 24 saatlik etki süresinde, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulanan gruplara oranla azalma (sırasıyla, %74,8 ve %60,8) gözlenmiştir (P<0.05). Uygulamadan 48 saat sonra, karışım uygulaması yapılan gruptaki CAT aktivitesi pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulaması yapılan gruba oranla azalma (sırasıyla, %73,7 ve %69,9) göstermiştir. 72 saatlik etki süresinde ise, karışım uygulaması yapılan gruptaki CAT aktivitesinde pyriproxyfen uygulanan gruba oranla azalma (%133,5) göstermiş, *B. thuringiensis* uygulanan gruba oranla ise değişim göstermemiştir (P>0.05).

Süreye bağlı etkiler incelendiğinde, pyriproxyfen uygulaması yapılan grupta süreye bağlı olarak artış, *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Karışım uygulaması yapılan grupta ise 48. saatte azalma, 72. saatte ise artış meydana gelmiştir (P<0.05) (Çizelge 4.11).

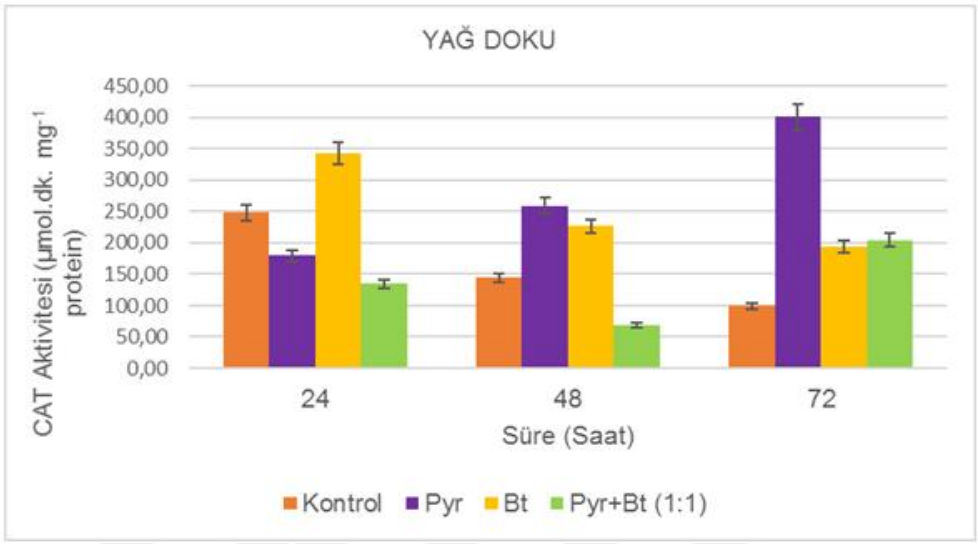
Çizelge 4.11. *G. mellonella*' nın yağ dokuda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	CAT AKTİVİTESİ (µmol dk^{-1} mg^{-1} protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s_{\overline{x}}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s_{\overline{x}}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s_{\overline{x}}$ *
Kontrol	248,100±16,340 aA	144,317± 4,464 aB	99,028± 0,844 aC
Pyr	179,401±11,883 bA	259,009±14,369 bB	401,049±17,209 bC
Bt	343,010±16,546 cA	226,575± 5,804 cB	194,564±11,396 cB
Pyr+Bt (1:1)	134,300±7,325 dA	68,161± 3,583 dB	204,573± 8,820 cC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.



Şekil 4.3. Devamı



Şekil 4.3. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak, yağ dokularında 24, 48 ve 72 saat sürelerindeki CAT enzim aktivitesi (µmol dk^{-1} mg^{-1} protein).

4.1.2.3. GPx Enzim Aktivitesi

Hemolenfteki 24 ve 48 saatlik etki sürelerinde GPx aktivitesi, pyriproxyfen uygulanan grupta ve karışımda kontrole oranla azalma gösterirken, *B. thuringiensis* uygulanan grupta 48 saatlik etki süresinde kontrole oranla artış göstermiştir (Çizelge 4.12). Karışımın 24 saatlik etki süresinde, hemolenfdeki GPx aktivitesi *B. thuringiensis* uygulanan gruba oranla azalmış (%13,4), 48 saatlik etki süresinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulanan gruplara oranla azalma (sırasıyla, %27,9 ve %61,7) göstermiştir. 72 saatlik etki süresinde ise karışımın hemolenfteki GPx aktivitesi insektisitlerin tek başına uygulandığı gruplara oranla artış (sırasıyla, %39,5 ve %49,1) göstermiştir ($p<0.05$). İnsektisitlerin süreye bağlı etkileri karşılaştırıldığında, tek başına pyriproxyfen uygulanan grupta, hemolenfdeki GPx aktivitesinde artış meydana gelmiştir. *B. thuringiensis* uygulamasının süreye bağlı etkisinde, 48. saatte artış tespit edilmiştir. Karışım uygulamasında ise, süreye bağlı

olarak 24 saatlik etki süresine oranla 48. saatte azalma, 72. saatte ise artış meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0.05$).

Çizelge 4.12**.** *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	GPx AKTİVİTESİ (nmol dk^{-1} mg^{-1} protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	30,154±1,440 aA	40,702±0,335 aB	25,209±2,746 aA
Pyr	24,566±0,950 bA	25,162±1,293 bA	29,689±0,930 aB
Bt	29,414±0,779 aA	47,341±0,521 cB	27,761±0,533 aA
Pyr+Bt (1:1)	25,470±0,700 bA	18,144±1,645 dB	41,411±0,403 bC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

Orta barsaktaki GPx aktivitesi 24 saatlik etki süresinde *B. thuringiensis* uygulanan grupta kontrole oranla azalma, karışım uygulanan grupta ise artış meydana gelmiştir (Çizelge 4.13). 48 saatlik etki süresinde tüm gruplarda kontrole oranla azalma gözlenirken, 72 saatlik etki süresinde ise, *B. thuringiensis* ve karışım uygulanan gruplarda kontrole oranla azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Karışımın etkisinde, orta barsaktaki GPx aktivitesi 24 saatlik etki süresinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulanan gruplara oranla artış (sırasıyla, %200 ve %321,4) göstermiştir. Karışım uygulaması yapılan gruptaki GPx aktivitesi, pyriproxyfen uygulaması yapılan gruba oranla 48 saatlik etki süresinde artış (%34,7), 72 saatlik etki süresinde ise azalma (%66) meydana gelmiştir.

Süreye bağlı olarak, tek başına pyriproxyfen uygulanan grupta GPx aktivitesi 48 saatlik etki süresinde 24 saatlik etki süresine oranla azalmış, 72 saatlik etki süresinde ise artmıştır. Tek başına *B. thuringiensis* uygulanan grupta 48 saatlik

etki süresinde 24 saatlik etki süresine oranla artmıştır. Karışımın süreye bağlı etkisinde ise azalma meydana gelmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	GPx AKTİVİTESİ (nmol dk^{-1} mg^{-1} protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	33,642±1,321 aA	45,993±2,175 aB	44,542±0,045 aB
Pyr	29,083±1,689 aAB	20,829±1,100 bA	38,895±4,758 aB
Bt	20,715±1,640 bA	27,324±0,340 cB	19,358±1,626 bA
Pyr+Bt (1:1)	87,304±2,646 cA	28,052±0,760 cB	13,214±0,543 bC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

Yağ dokudaki GPx aktivitesi 24 saatlik etki süresinde *B. thuringiensis*'in tek başına uygulandığı grupta kontrole oranla azalırken, karışım uygulanan grupta artış göstermiştir (P<0.05) (Çizelge 4.14). 48 ve 72 saatlik etki sürelerinde kontrole oranla tüm gruplarda değişim gözlenmemiştir (p>0.05). Karışım uygulaması yapılan gruptaki GPx aktivitesi, 24 saatlik etki süresinde tek başlarına pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulanan gruplara oranla artmıştır (sırasıyla, %18,3 ve %140,9).

Süreye bağlı olarak, insektisitlerin tek başlarına uygulandığı gruplarda yağ dokudaki GPx aktivitesi artış gösterirken, karışımda herhangi bir değişim gözlenmemiştir (P>0.05) (Çizelge 4.14).

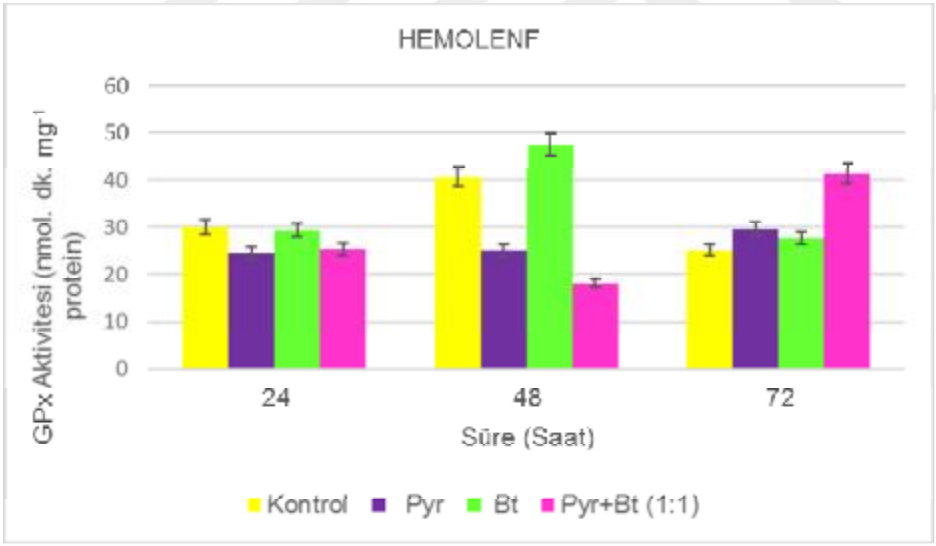
Yaptığımız çalışmada, 72 saat sonunda SOD aktivitesi, uygulanan tüm konsantrasyonlarda ve karışımda *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde en yüksek aktivite gösterirken, CAT aktivitesi hemolenfte en düşük seviyededir. GPx

aktivitesi ise, *G. mellonella* larvalarının yağ dokusunda tüm konsantrasyonlarda ve karşımda en yüksek aktivitenin gözlendiği dokudur.

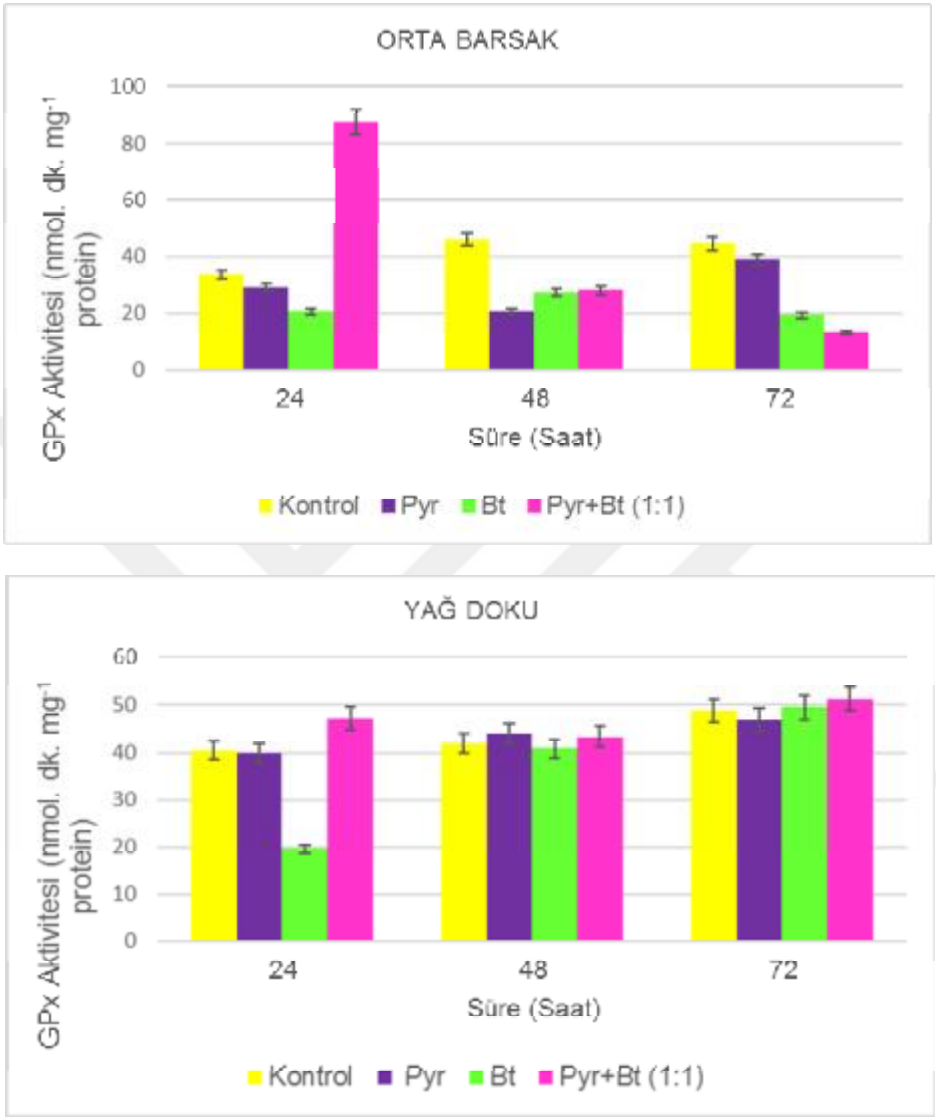
Çizelge 4.14. *G. mellonella*' nın yağ dokuda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	GPx AKTİVİTESİ (nmol dk^{-1} mg^{-1} protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	40,497±1,482 aA	42,088±1,302 aA	48,752±1,147 aB
Pyr	39,869±1,489 aA	44,088±0,559 aB	46,949±0,378 aB
Bt	19,581±1,668 bA	40,819±0,559 aB	49,490±0,372 aC
Pyr+Bt (1:1)	47,168± 2,394 cA	43,397±1,301 aA	51,293±2,500 aA

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.



Şekil 4.4. Devamı



Şekil 4.4. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak, yağ doku dokularında 24, 48 ve 72 saat sürelerindeki GPx enzim aktivitesi (nmol dk^{-1} mg^{-1} protein).

4.1.4. Detoksifikasyon Enzim Aktivitelerinin Tayini

4.1.4.1. AChE Enzim Aktivitesi

G. mellonella hemolenfindeki AChE aktivitesinde 24 saatlik etki süresinde pyriproxyfen uygulaması yapılan grupta artış görülürken, *B. thuringiensis* uygulanan grupta kontrole göre azalma meydana gelmiştir (Çizelge 4.15). 72 saatlik etki süresinde ise, *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta azalma, pyriproxyfen ve karışım uygulaması yapılan gruplarda ise, artış tespit edilmiştir.

Süreye bağlı olarak, tüm uygulama gruplarında 48 ve 72 saatlik etki sürelerinde 24 saatlik etkiye oranla azalma meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.15. *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak AChE aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	AChE AKTİVİTESİ (U/dk/mg protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	105,360±1,542 aA	67,593±3,240 aB	40,535±0,230 aC
Pyr	133,001±1,596 bA	50,781±3,292 aB	45,340±0,162 bB
Bt	77,416±5,126 cA	50,994±3,262 aB	16,653±0,216 cC
Pyr+Bt (1:1)	94,001±4,933 aA	52,640±5,012 aB	84,052±0,355 dA

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0,05$ düzeyinde istatistik ayrım vardır.

Orta barsaktaki 24 saatlik etki süresinde kontrol grubu ile kıyaslandığında, pyriproxyfen ve karışım uygulaması yapılan gruplarda artış tespit edilmiş, buna karşılık 48 saatlik etki süresinde aynı uygulama gruplarında azalma meydana geldiği belirlenmiştir (Çizelge 4.16). *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta ise 24 saatlik etki süresinde istatistiki ayrım gözlenmemiştir ($p>0.05$). Uygulamanın 72 saatlik etki süresinde, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* tek başına ve

karışımlarının uygulandığı gruplarda, AChE aktivitesinde kontrole göre artış olduğu belirlenmiştir. Süreye bağlı olarak, tüm uygulama gruplarında 48 ve 72 saatlik etki sürelerinde 24 saatlik etkiye oranla azalma meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.16. *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak AChE aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	AChE AKTİVİTESİ (U/dk/mg protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	105,074±1,663 aA	67,894±3,210 abB	31,947±4,998 aC
Pyr	133,124±1,725 bA	50,843±3,339 aB	47,068±3,748 bB
Bt	101,625±3,219 aA	76,930±5,037 bB	50,597±3,187 bC
Pyr+Bt (1:1)	118,629±3,276 cA	52,704±4,979 aB	34,014±0,050 aC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0,05$ düzeyinde istatistik ayrım vardır.

G. mellonella larvalarının yağ dokusunda 24 saatlik etki süresinde pyriproxyfen ve karışım uygulamalarında AChE aktivitesinde kontrol grubuna oranla artış meydana gelirken, 48 saatlik etki süresinde pyriproxyfen ve karışım uygulamalarında azalma, *B. thuringiensis* uygulamasında artış meydana geldiği belirlenmiştir (Çizelge 4.17). Uygulamanın 72 saatlik etki süresinde ise, pyriproxyfen uygulaması yapılan grupta kontrole göre azalma görülmüştür ($p<0.05$). Süreye bağlı olarak, tüm uygulama gruplarında 48 ve 72 saatlik etki sürelerinde 24 saatlik etkiye oranla azalma meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.17. *G. mellonella*' nın yağ dokusunda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının etkisinde süreye bağlı AChE aktiviteleri (Ort±S.H).

	AChE AKTİVİTESİ (U/dk/mg protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	105,331±1,657 aA	68,296±3,290 abB	39,823±3,311 aC
Pyr	133,347±1,666 bA	51,212±3,279 aB	32,280±1,899 bC
Bt	102,353±3,283 aA	77,812±5,025 bB	42,694±1,642 aC
Pyr+Bt (1:1)	119,376±3,360 cA	53,147±5,019 aB	42,721±1,642 aB

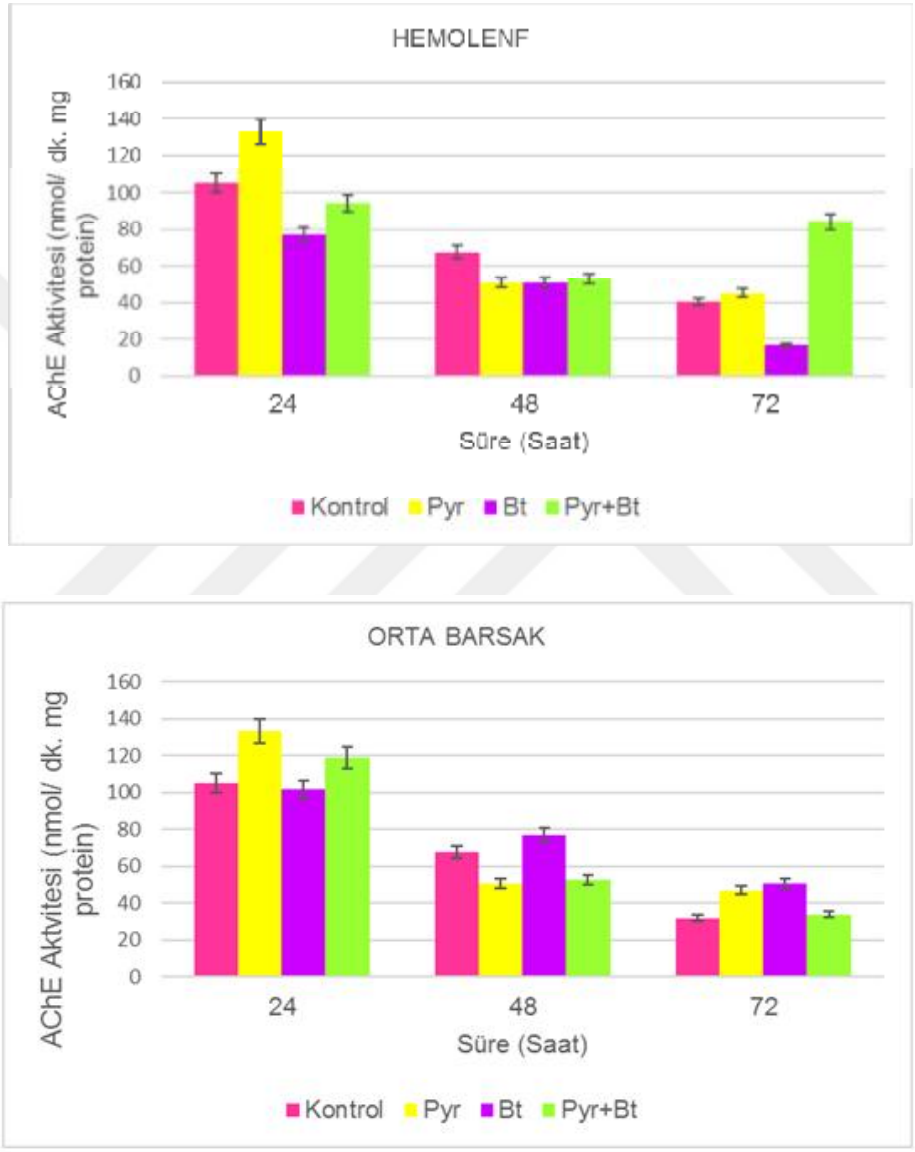
*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

İnsektisitlerin ve karışımlarının süreye bağlı etkisi incelendiğinde, *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak ve yağ dokularındaki AChE aktivitesi etki sürelerindeki artışa bağlı olarak azalma göstermiştir. Bu azalma istatistiki açıdan tüm uygulama gruplarında önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

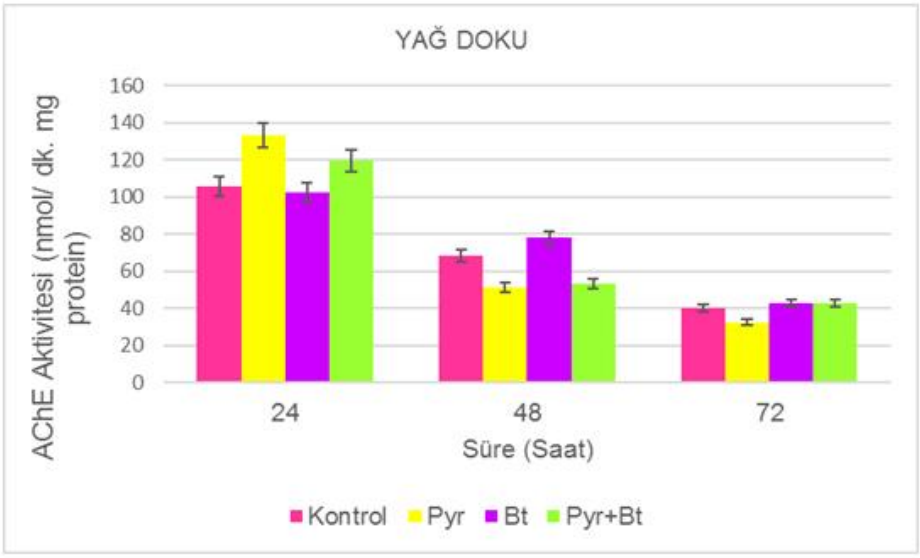
Pyriproxyfen, *B. thuringiensis* ve karışımlarının etkisine maruz bırakılan *G. mellonella* 5. evre larvalarının hemolenfinde AChE aktivitesinde, uygulamadan 24 saat sonra sırasıyla %25 ve %13 oranında inhibisyon meydana gelmiştir. 48 saatlik etki süresinde pyriproxyfen, *B. thuringiensis* ve karışım uygulamalarında sırasıyla %25, %25 ve %23 oranlarında inhibisyon, 72 saatlik etki süresinde ise sadece pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulanan gruplarda sırasıyla %18 ve %73 oranında inhibisyon meydana gelmiştir. *G. mellonella* larvalarının orta barsağında uygulamadan 24 saat sonra sadece *B. thuringiensis* uygulanan grupta %5 oranında inhibisyon meydana geldiği belirlenmiştir. 48 saatlik etki süresinde, pyriproxyfen ve karışım uygulaması yapılan gruplarda sırasıyla %25 ve %78 oranında inhibisyon görülmüştür.

Yağ dokuda ise, 24 saatlik etki süresinde *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta %5 oranında, 48 saatlik etki süresinde ise, pyriproxyfen ve karışım

uygulaması yapılan gruplarda sırasıyla %25 ve %23 oranlarında inhibisyon meydana gelmiştir.



Şekil 4.5. Devamı



Şekil 4.5. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak ve yağ dokuda 24, 48 ve 72 saat sürelerindeki AChE aktivitesi (U/dk/mg protein)

4.1.4.2. GST Enzim Aktivitesi

Hemolenfdeki GST aktivitesinde 24 saatlik etki süresinde, kontrole oranla tüm uygulama gruplarında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.18). Bu azalma sırasıyla %51,06, %13,53 ve %82,11 olarak belirlenmiştir. 48 saatlik etki süresinde hemolenfdeki GST aktivitesi, pyriproxyfenin tek başına ve karışım halinde uygulaması yapılan gruplarda kontrole göre azalma gözlenirken (sırasıyla %60,74 ve %78,27), *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta artış meydana gelmiştir ($p<0,05$). 72 saatlik etki süresinde ise, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis'* in tek başına uygulandığı gruplarda artış (%6,51 ve %48), karışım halinde yapılan uygulama gruplarında ise azalma olduğu tespit edilmiştir (%57,54) ($p<0,05$).

Süreye bağlı olarak, tüm uygulama gruplarında 48 saatlik etki süresinde 24 saatliki etkiye oranla azalma gösterirken, 72 saatlik etki sürelerinde artış gözlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18**.** *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak GST aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	GST AKTİVİTESİ (mmol $dk^{-1}.mg^{-1}$ protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	0,1079±0,00102 aA	0,04051±0,0010 aB	0,0829±0,0010 aC
Pyr	0,0528±0,0020 bA	0,0159±0,0010 bB	0,0883±0,0020 bC
Bt	0,0933±0,0010 cA	0,0588±0,0010 cB	0,1227±0,0010 cC
Pyr+Bt (1:1)	0,0193±0,0010 dA	0,0088±0,0010 dB	0,0352±0,0020 dC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

Orta barsaktaki GST aktivitesinde, 24 saatlik etki süresinde pyriproxyfenin tek başına ve karışım halindeki uygulama yapılan gruplarında kontrole göre azalma gözlenirken (%25,81 ve %44,72), *B. thuringiensis' in* tek başına uygulandığı grupta istatistiki açıdan önemli olmayan artış meydana gelmiştir (%1,63) (p>0,05) (Çizelge 4.19). 48 saatlik etki süresinde, tüm uygulama gruplarında kontrole göre artış olduğu belirlenmiştir (p<0,05). 72 saatlik etki süresinde ise, meydana gelen artış ve azalış miktarları önemsiz bulunmuştur (p>0,05).

Süreye bağlı olarak, pyriproxyfenin tek başına uygulandığı grupta 48 saatlik etki süresinde 24 saatlik etkiye oranla artış gözlenirken, 72 saatlik etki süresinde azalma meydana gelmiştir (p<0,05). *B. thuringiensisin* tek başına ve pyriproxyfen ile karışım halinde uygulanan gruplarda ise süreye bağlı olarak istatistiksel ayrım gözlenmemiştir (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak GST aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	GST AKTİVİTESİ (mmol $dk^{-1}.mg^{-1}$ protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	0,4912±0,0826 aA	0,0159±0,0030 aB	0,2870±0,0414 aC
Pyr	0,3644±0,0242 abA	0,6001±0,0046 bB	0,2401±0,0001 aC
Bt	0,4992±0,0149 aA	0,3376±0,0322 cA	0,3785±0,1344 aA
Pyr+Bt (1:1)	0,2715±0,0599 bA	0,1835±0,0141 dA	0,3334±0,0622 aA

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

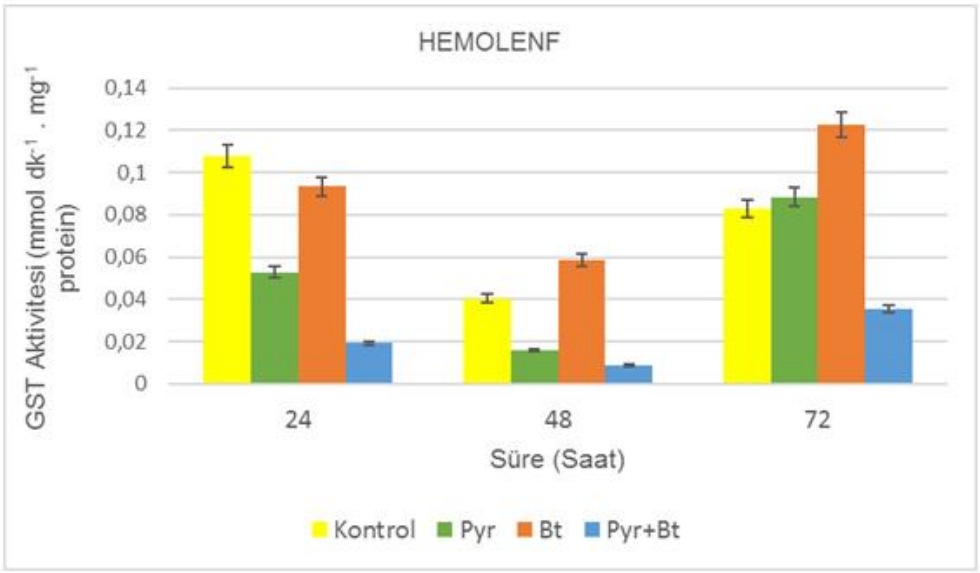
Yağ dokudaki GST aktivitesinde, 24 saatlik etki süresinde pyriproxyfen ve karışım uygulaması yapılan gruplarda kontrole göre azalma meydana gelirken, *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta artış gözlenmiştir (Çizelge 4.20). Fakat sadece *B. thuringiensis* ve karışım uygulamaları yapılan gruplardaki artışlar istatistiki açıdan önemli bulunmuştur (%20,64 ve %49,56) ($p<0,05$). 48 saatlik etki süresindeki uygulama gruplarındaki azalma istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. 72 saatlik etki süresinde ise, kontrole göre tüm uygulama gruplarında azalma olduğu gözlenmiştir. Bu azalma sırasıyla %61, %15,04 ve %62,47 olarak tespit edilmiştir.

Süreye bağlı olarak, sadece pyriproxyfen uygulaması yapılan grupta istatistiksel açıdan önemli düzeyde azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.20).

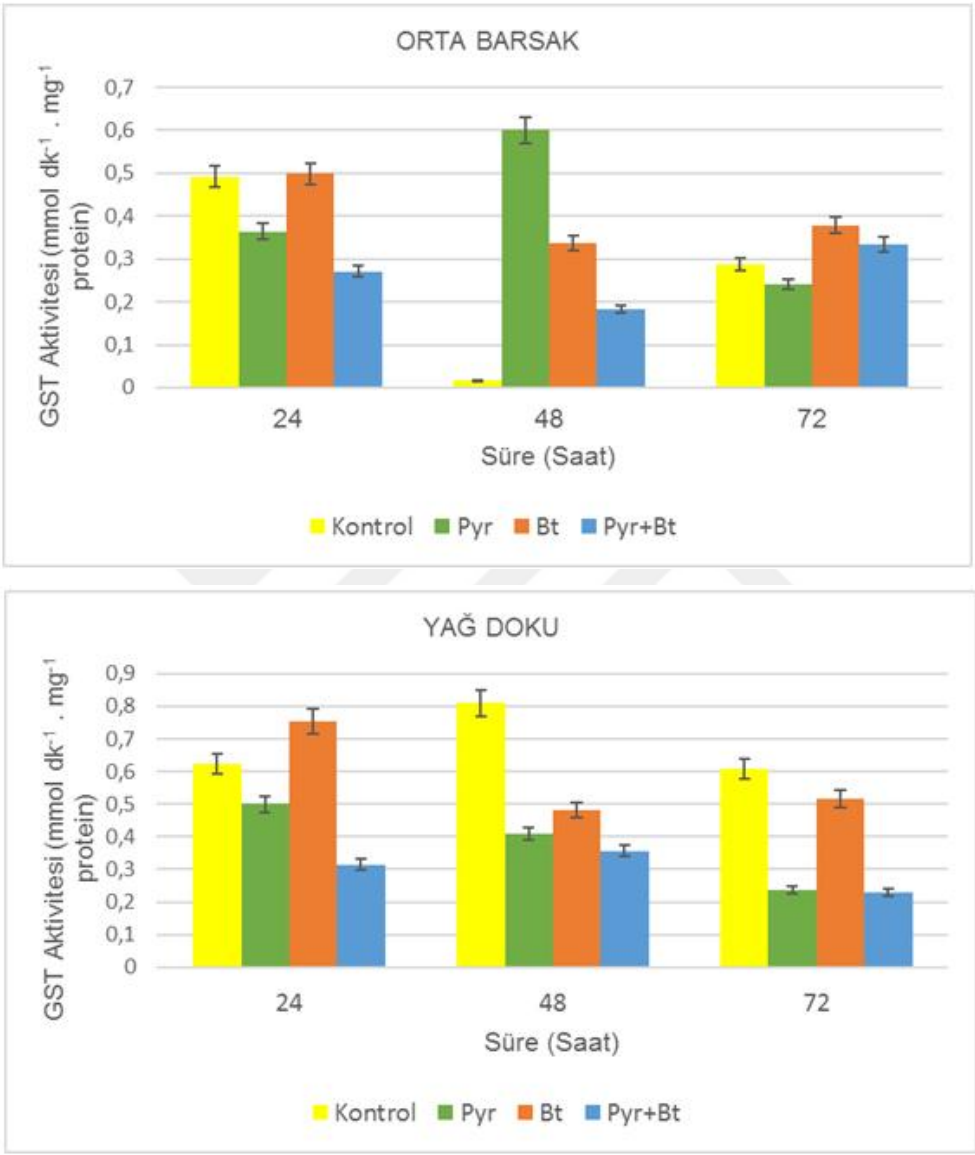
Çizelge 4.20. *G. mellonella*' nın yağ dokusunda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak GST aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	GST AKTİVİTESİ (mmol $dk^{-1}.mg^{-1}$ protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	0,6245±0,0442 abA	0,8092±0,2125 aA	0,6072±0,0046 aA
Pyr	0,5002±0,0586 abA	0,4090±0,0431 aA	0,2368±0,0010 cB
Bt	0,7534±0,1313 bA	0,4816±0,0393 aA	0,5159±0,0247 bA
Pyr+Bt (1:1)	0,3150±0,0654 aA	0,3571±0,0113 aA	0,2279±0,0329 cA

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.



Şekil 4.6. Devamı



Şekil 4.6. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak ve yağ dokusunda 24, 48 ve 72 saat sürelerindeki GST aktivitesi (mmol $dk^{-1}.mg^{-1}$ protein)

4.1.4.3. Cyt P450 monooksijenaz Enzim Aktivitesi

Hemolenfteki Sitokrom P450 aktivitesinde 24 saatlik etki süresinde, kontrole oranla pyriproxyfen uygulaması yapılan grupta artış gözlenirken (%98,27), *B. thuringiensis* ve karışım uygulamalarında azalma meydana gelmiştir (%26,40 ve %24,16) ($p<0,05$) (Çizelge 4.21). 48 saatlik etki süresinde, pyriproxyfenin tek başına uygulandığı grupta artış meydana gelirken (%70,21) *B. thuringiensis* ve karışım uygulamalarında azalma olduğu belirlenmiştir (%35,85 ve %3,27). ($p<0,05$). 72 saatlik etki süresinde ise, kontrol grubuna göre pyriproxyfen uygulaması yapılan grupta %12,95 oranında artış meydana gelirken, *B. thuringiensis* ve karışım uygulamalarında sırasıyla %24,66 ve %3,93 oranlarında azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Süreye bağlı olarak, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis'*in tek başlarına uygulandığı gruplarda 48ve 72 saatlik etki sürelerinde 24 saatlik etki süresine göre azalma meydana gelirken ($p<0,05$), karışım uygulaması yapılan grupta süreye bağlı olarak istatistiki ayrım belirlenmemiştir (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21**.** *G. mellonella*' nın hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak Sitokrom P450 aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	CYT P450 AKTİVİTESİ (pmol/dk/mg protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	178,215±0,8210 aA	148,405±1,085 aB	148,857±0,0044 aB
Pyr	353,166±7,0941 cA	252,599±21,559 bB	168,127±0,1477 bC
Bt	131,166±3,2216 bA	95,197 ±2,198 cB	112,151±1,1775 cC
Pyr+Bt (1:1)	135,162±9,1373 bA	143,551±0,0325 dA	143,004±1,9229 dA

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0,05$ düzeyinde istatistik ayrım vardır.

Orta barsaktaki sitokrom P450 aktivitesinde 24 ve 48 saatlik etki sürelerinde kontrole oranla istatistiki ayrım gözlenmezken, 72 saatlik etki süresinde istatistiki olarak önemli bir artış meydana geldiği tespit edilmiştir (sırasıyla %9,94, %9,80 ve %9,59) ($p<0,05$) (Çizelge 4.22).

Süreye bağlı olarak, sadece pyriproxyfen ve karışım uygulamaları yapılan gruplarda 48 ve 72 saatlik etki sürelerinde 24 saatlik etkiye oranla azalma meydana geldiği belirlenmiş ve bu azalma istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.22**.** *G. mellonella*' nın orta barsağında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak Sitokrom P450 aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	CYT P450 AKTİVİTESİ (pmol/dk/mg protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	158,227±3,082 aA	154,866±2,920 aA	136,762±3,726 aB
Pyr	163,017±1,808 aA	157,876±3,070 aAB	150,355±3,231 bB
Bt	154,798±4,469 aA	149,799±3,816 aA	150,162±1,999 bA
Pyr+Bt (1:1)	167,087±2,149 aA	147,067±0,164 aB	149,873±2,012 bB

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0,05$ düzeyinde istatistik ayrım vardır.

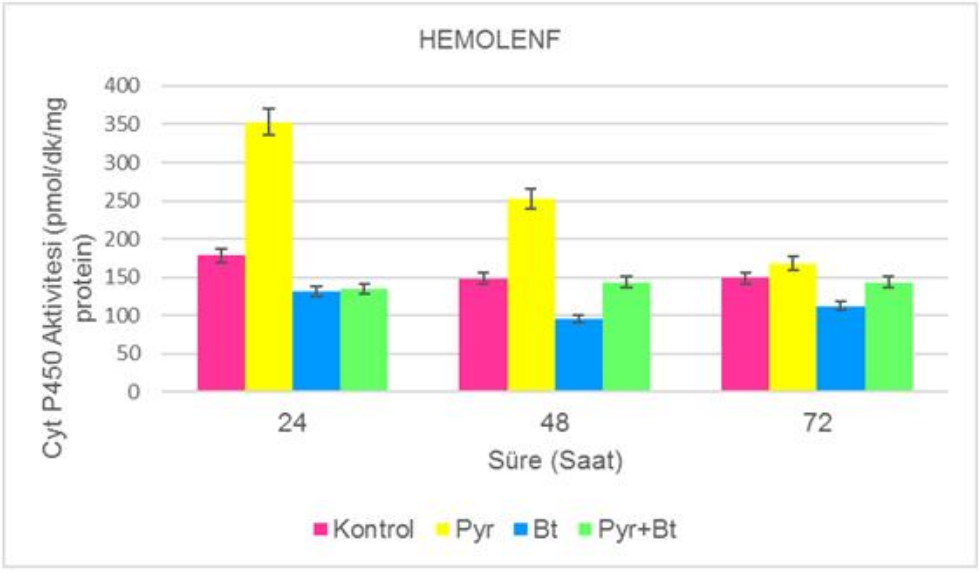
Yağ dokudaki sitokrom P450 aktivitesinde 24, 48 ve 72 saatlik etki sürelerinde kontrol gruplarına oranla istatistiki bir ayrım gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Çizelge 4.23).

Süreye bağlı olarak, pyriproxyfen uygulaması yapılan grupta 48 saatlik etki süresinde 24 saatlik etkiye oranla azalma gösterirken ($p<0,05$), 72 saatlik etki süresinde istatistiki açıdan önemli olmayan düzeyde artış gözlenmiştir ($p>0,05$). İnsektisitlerin karışım olarak uygulandığı grupta ise, 48 ve 72 saatlik etki süreleri 24 saatlik etkiye oranla artış göstermiştir ($p<0,05$).

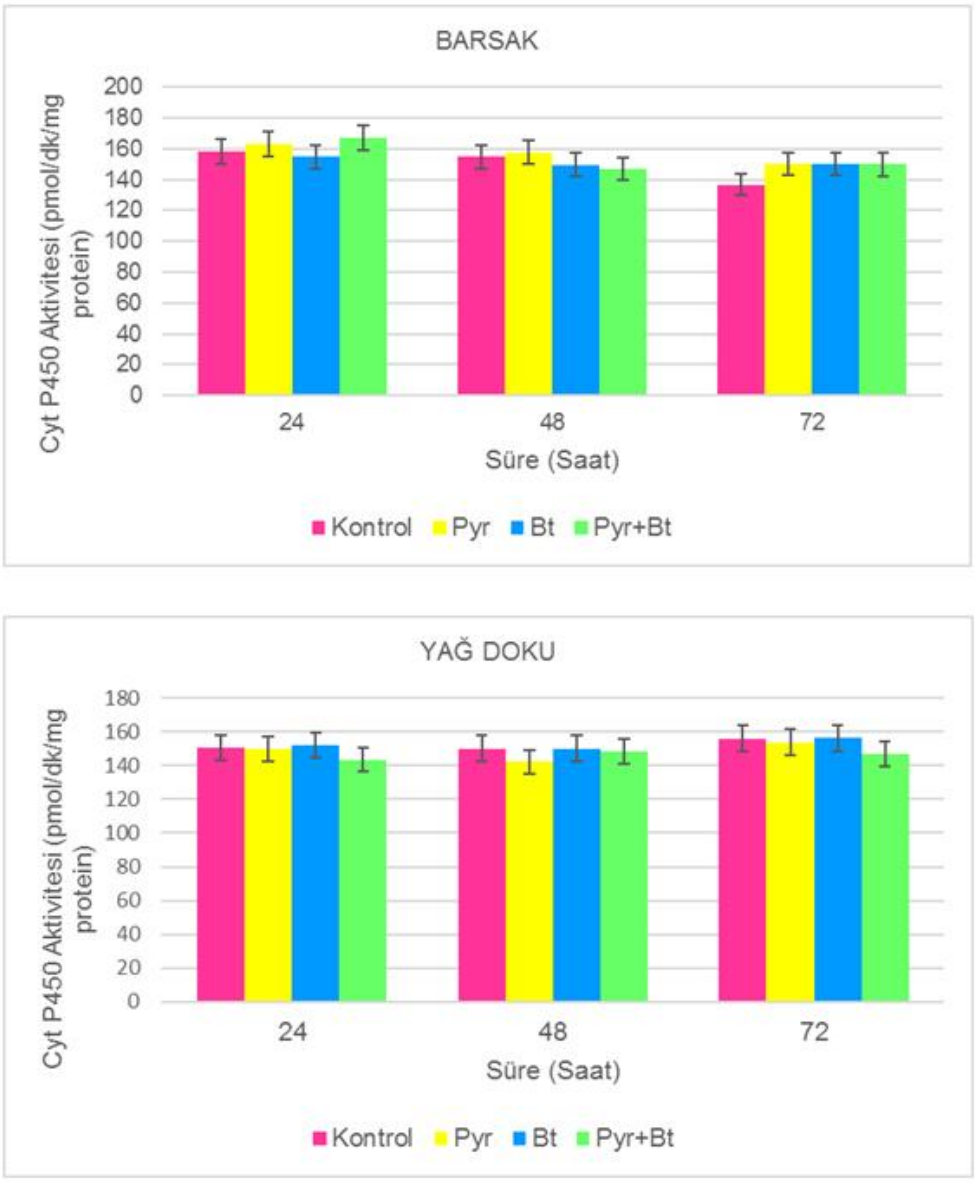
Çizelge 4.23. *G. mellonella*' nın yağ dokusunda pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak Sitokrom P450 aktivitesi üzerine etkileri (Ort±S.H).

	CYT P450 AKTİVİTESİ (pmol/dk/mg protein)		
İnsektisit (µg/mL)	**24 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72 saat** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	150,735±2,529 aA	150,261±1,589 aA	156,124±7,540 aA
Pyr	149,745±0,655 aA	142,237±0,742 aB	153,885±3,057 aA
Bt	152,132±2,902 aA	150,270±4,051 aA	156,549±0,142 aA
Pyr+Bt (1:1)	143,584±0,465 aA	148,401±1,240 aB	147,042±0,094 aB

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.



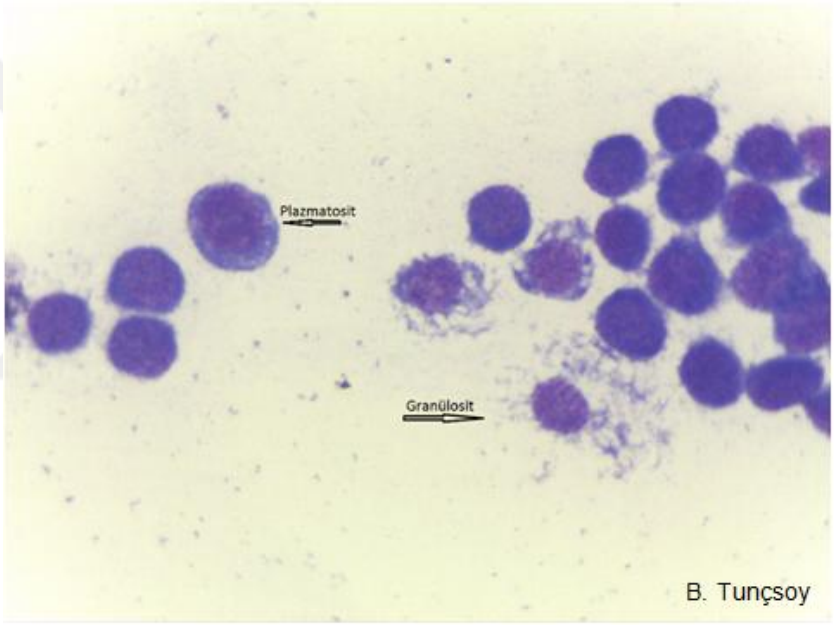
Şekil 4.7. Devamı



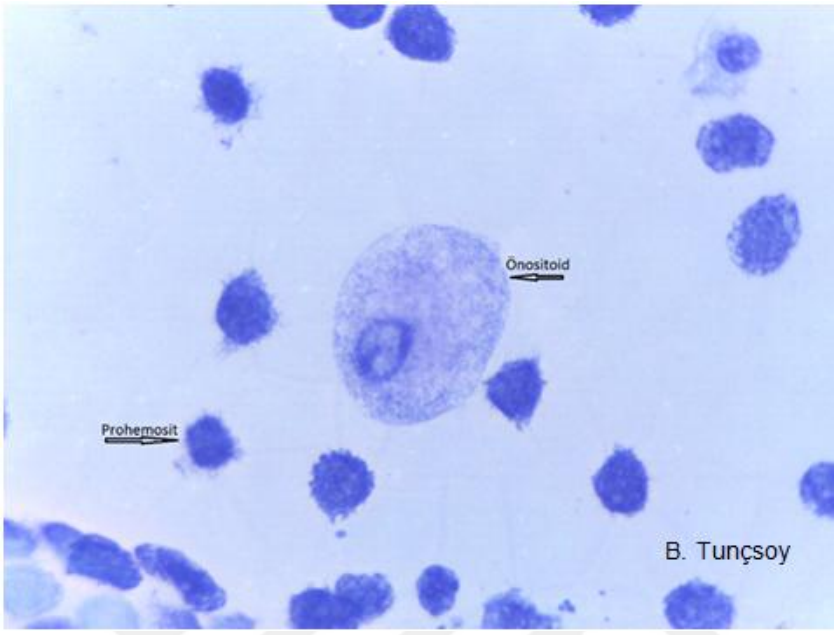
Şekil 4.7. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak, yağ dokuda 24, 48 ve 72 saat sürelerindeki Sitokrom P450 aktivitesi (pmol/dk/mg protein).

4.1.5. *G. mellonella* Larvalarının Hemosit Tiplerinin Belirlenmesi

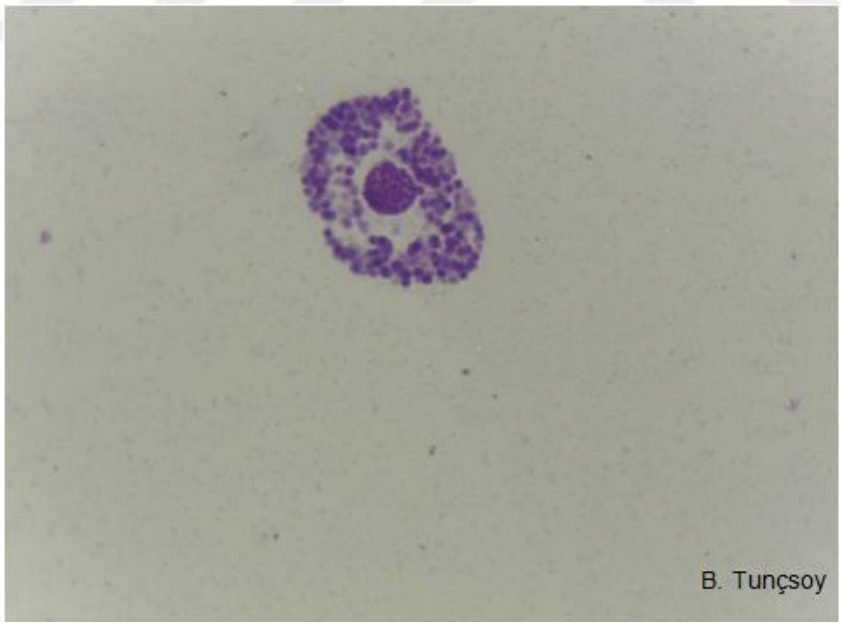
G. mellonella son evre larvalarında farklı tipteki hemositlerin belirlenmesinde Giemsa boyası ile boyanan hücrelerin çekirdekleri açık-koyu pembe, sitoplazmaları açık-koyu lacivert olarak boyanmıştır. Mikroskobik inceleme sonucunda *G. mellonella* son evre larva hemolenfinde mevcut olan hemosit tipleri plazmatosit (Şekil 4.8), granülosit (Şekil 4.8), sferülosit (Şekil 4.10), prohemosit (şekil 4.9) ve önositoidler (Şekil 4.9) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. *G. mellonella* son evre larvalarının hemolenfinde plazmatosit ve granülosit hücreleri (Ölçü Barı: 10 μm; X100).



Şekil 4.9. *G. mellonella* son evre larvalalarının hemolenfinde Prohemosit ve önositoid hücreler (Ölçü Barı: 10 µm; X100).



Şekil 4.10. *G. mellonella* son evre larvalarının hemolenfinde sferülosit hücre (Ölçü Barı: 10 µm; X100).

4.1.5.1. Total Hemosit Sayısı

Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin *G. mellonella* son evre larvalarının hemolenfindeki total hemosit sayısı ile ilgili verilerin aritmetik ortalamaları ve istatistik analiz sonuçları sırasıyla Çizelge 4.24' de verilmiştir.

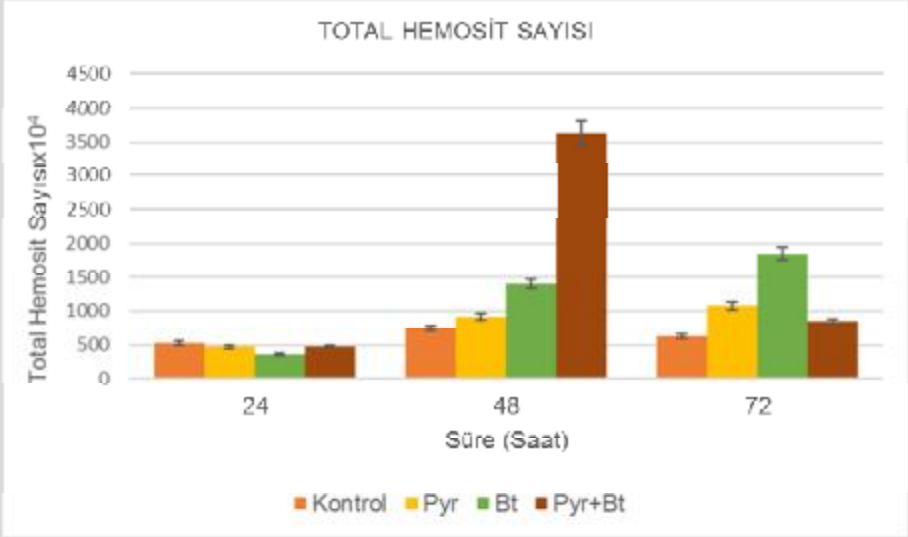
Uygulamadan 24 saat sonra, pyriproxyfen, *B. thuringiensis* ve karışım uygulaması yapılan gruplarda total hemosit sayısında kontrol grubuna oranla azalma meydana geldiği tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bu azalmanın en fazla *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta meydana geldiği gözlenmiştir (1,48 kat) ($p<0.05$). Uygulamadan 48 saat sonra, pyriproxyfen, *B. thuringiensis* ve karışım uygulaması yapılan gruplarda kontrol grubuna göre sırasıyla 1.23, 1.88 ve 4.89 kat artış meydana gelmiştir ($p<0.05$). Özellikle karışım uygulaması yapılan gruptaki total hemosit sayısı 3635x 10^6 hücre/ml olarak en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Uygulamadan 72 saat sonra, pyriproxyfen, *B. thuringiensis* ve karışım uygulaması yapılan gruplarda kontrol grubuna göre sırasıyla 1.71, 2.93 ve 1.33 kat artış meydana gelmiştir ($p<0.05$). Karışım uygulaması yapılan gruptaki total hemosit sayısı insektisitlerin tek başına uygulandığı gruplar ile karşılaştırıldığında 72 saatlik etki süresinde bu sayının azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Pyriproxyfen, *B. thuringiensis* ve karışımlarının uygulandığı tüm deney ve kontrol grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Süreye bağlı olarak, tüm uygulama gruplarında, 48 ve 72 saatlik etki sürelerinde 24 saatlik etkiye oranla artış meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.24. *G. mellonella*' nın son evre larvalarının hemolenfinde pyriproxyfen, *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak total hemosit sayısındaki değişimler (Ort±S.H).

İnsektisit (µg/mL)	**Total Hemosit Sayısı**		
	24 $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	525±14,434 aA	743 ±29,627 aB	630±11,547 aC
Pyr	470±11,547 bA	915 ±2,886 bB	1075±14,433 bC
Bt	355±2,887 cA	1400±80,829 cB	1846±56,960 cC
Pyr+Bt (1:1)	475±14,433 bA	3635±8,660b dB	840±5,773 dC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.



Şekil 4.11. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki total hemosit sayısı

4.1.5.2. Diferansiyel Hemosit Sayısı

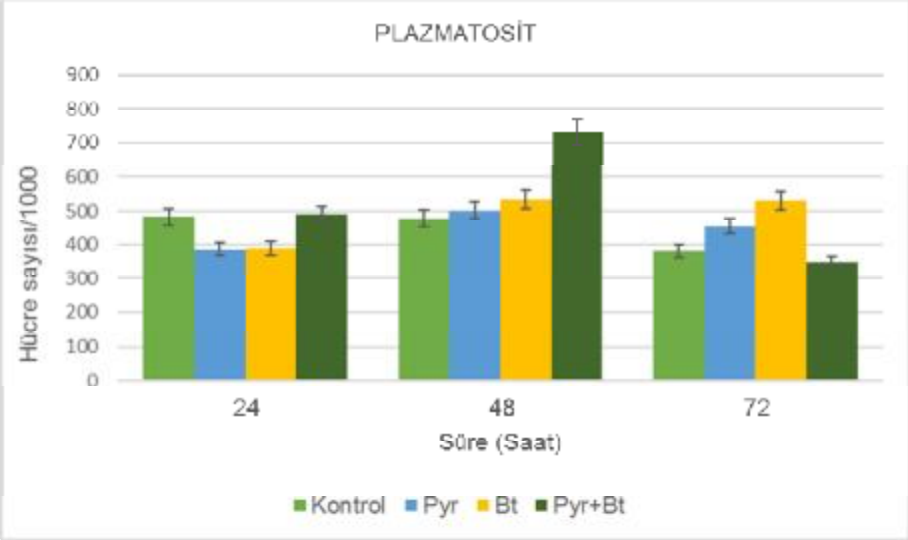
Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin *G. mellonella* son evre larvalarının hemolenfindeki diferansiyel hemosit sayısı ile ilgili verilerin aritmetik ortalamaları ve istatistik analiz sonuçları sırasıyla Çizelge 4.25-29' da verilmiştir.

Kontrol ve uygulama gruplarındaki *G. mellonella* son evre larvalarının hemolenfinde en çok bulunan hemosit tipleri plazmatositler ve granülositler olarak belirlenmiştir. Plazmatosit sayısının 24 saatlik etki süresinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulaması yapılan gruplarda kontrol grubuna göre 1.24 kat azalma meydana gelirken, karışım uygulaması yapılan grupta 1.02 kat artış meydana geldiği tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.25). Uygulamadan 48 saat sonra ise, tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna oranla sırasıyla 1.05, 1.12 ve 1.53 kat artış meydana geldiği belirlenmiştir. 72 saatlik etki süresinde ise, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta kontrol grubuna göre artış meydana gelirken (sırasıyla, 1.19 ve 1.39 kat), karışım uygulaması yapılan grupta azalma (1.10 kat) meydana geldiği tespit edilmiştir. Plazmatosit sayılarındaki artış ve azalmalar tüm uygulama gruplarında istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Uygulamadan 24 ve 48 saat sonraki etki sürelerinde plazmatosit sayısının en fazla karışım uygulaması yapılan gruptaki larvaların hemolenfinde tespit edilmiştir. Uygulamadan 72 saat sonra plazmatosit sayısının en fazla *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$; Çizelge 4.25; Şekil 4.12).

Çizelge 4.25. *G. mellonella*' nın son evre larvalarının hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak plazmatosit sayısındaki değişimler (Ort±S.H).

İnsektisit (µg/mL)	**Plazmatosit Sayısı**		
	24 $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	481,67±0,882aA	478,33±2,028 aA	381,00±1,732 aB
Pyr	387,00±0,577bA	501,00±1,732 bB	454,00±1,732 bC
Bt	389,33±0,882bA	534,00±2,309 cB	530,33±2,028 cC
Pyr+Bt (1:1)	489,33±0,881cA	730,00±1,732 dB	346,66±2,027 dC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.



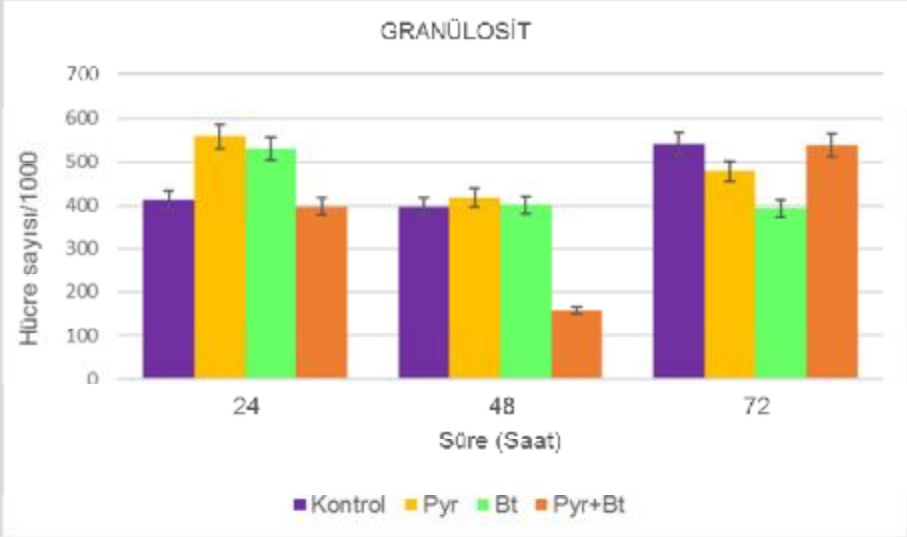
Şekil 4.12. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde plazmatosit sayısı

Granülosit sayısının 24 saatlik etki süresinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulaması yapılan gruplarda kontrol grubuna göre sırasıyla 1.36 ve 1.29 kat artış meydana gelirken, karışım uygulaması yapılan grupta 1.04 kat azalma meydana geldiği tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.26). Uygulamadan 48 saat sonra kontrole göre, pyriproxyfen uygulaması yapılan grupta 1.05 kat artış meydana gelirken, karışım uygulaması yapılan grupta 2.52 kat azalma meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0.05$). *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta meydana gelen azalma istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). 72 saatlik etki süresinde ise, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulaması yapılan gruplarda kontrol grubuna göre 1.13 ve 1.37 kat azalma meydana gelmiştir ($p<0.05$). Karışım uygulaması yapılan gruptaki larvaların hemolenfinde tespit edilen granülosit sayısındaki azalma istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Uygulamadan 24 ve 48 saat sonraki etki sürelerinde granülosit sayısının en fazla pyriproxyfen uygulaması yapılan gruptaki larvaların hemolenfinde tespit edilmiştir. ($p<0.05$; Çizelge 4.26; Şekil 4.13).

Çizelge 4.26. *G. mellonella*' nın son evre larvalarının hemolenfinde pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak granülosit sayısındaki değişimler (Ort±S.H).

İnsektisit (µg/mL)	**Granülosit Sayısı**		
	24 $\overline{X} \pm s_{\overline{x}}$ *	**48** $\overline{X} \pm s_{\overline{x}}$ *	**72** $\overline{X} \pm s_{\overline{x}}$ *
Kontrol	411,66±0,881 aA	397,66±2,333 aB	540,33±0,881 aC
Pyr	558,66±0,882 bA	418,33±2,603 bB	477,00±1,732 bC
Bt	530,66±1,453 cA	401,00±1,528 aB	393,66±2,027 cC
Pyr+Bt (1:1)	397,33±0,882 dA	157,66±1,202 cB	538,33±1,201 aC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.



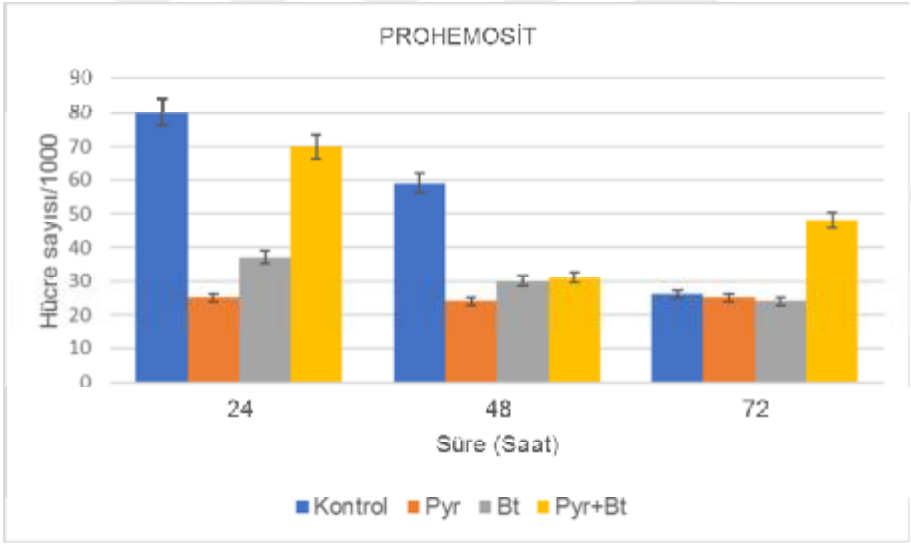
Şekil 4.13. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde granülosit sayısı

Prohemosit sayısının 24 saatlik etki süresinde tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna göre sırasıyla 3.26, 2.15 ve 1.14 kat azalma meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.27). Uygulamadan 48 saat sonra tüm uygulama gruplarında kontrole göre sırasıyla 2.44, 1.96 ve 1.91 kat azalma tespit edilmiştir ($p<0.05$). 72 saatlik etki süresinde ise, karışım uygulaması yapılan grupta kontrol grubuna göre 1.82 kat artış tespit edilmiş ve bu artış istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulaması yapılan gruplardaki larvaların hemolenfinde tespit edilen prohemosit sayısındaki azalma istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$) (Çizelge 4.27; Şekil 4.14).

Çizelge 4.27. *G. mellonella*' nın son evre larvalarının hemolenfinde pyriproxyfen, *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak prohemosit sayısındaki değişimler (Ort±S.H).

İnsektisit (µg/mL)	**Prohemosit Sayısı**		
	24 $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	80,33±1,202 aA	58,66±1,201 aB	26,33±0,881 aC
Pyr	24,66±1,453 bA	24,00±0,577 bA	24,66±1,764 aA
Bt	37,33±0,882 cA	30,00±1,732 cB	24,00±2,309 aB
Pyr+Bt (1:1)	70,33±0,881 dA	30,66±0,881 cB	48,00±1,155 bC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.



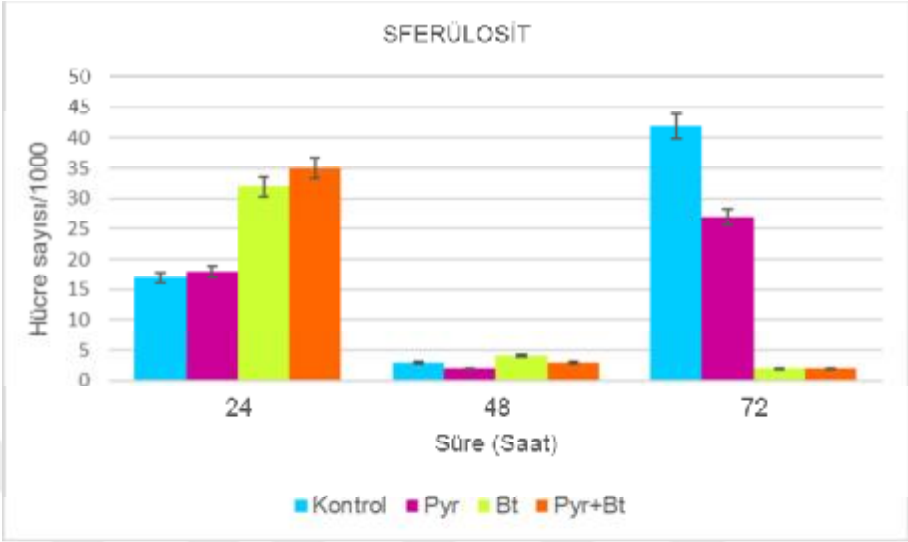
Şekil 4.14. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde prohemosit sayısı

Sferülosit sayısının 24 saatlik etki süresinde *B. thuringiensis* ve karışım uygulaması yapılan gruplarda kontrole göre sırasıyla 1.88 ve 2.08 kat artış meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.28). Uygulamadan 48 saat sonra tüm uygulama gruplarındaki larvaların hemolenfindeki prohemosit sayısındaki değişiklikler istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). 72 saatlik etki süresinde ise, *B. thuringiensis* ve karışım uygulaması yapılan grupta kontrol grubuna göre 21 kat azalma tespit edilmiş ($p<0.05$) (Çizelge 4.28; Şekil 4.15).

Çizelge 4.28. *G. mellonella*' nın son evre larvalarının hemolenfinde pyriproxyfen, *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak sferülosit sayısındaki değişimler (Ort±S.H).

İnsektisit (µg/mL)	**Sferülosit Sayısı**		
	24 $\overline{X} \pm s_{\overline{x}}$ *	**48** $\overline{X} \pm s_{\overline{x}}$ *	**72** $\overline{X} \pm s_{\overline{x}}$ *
Kontrol	17,00±0577 aA	3,00±0,577 aB	42,00±1,732 aC
Pyr	17,67±0,881 aA	2,33±0,333 aB	27,00±1,732 aC
Bt	32,00±0,578 bA	3,67±1,202 aB	2,00±0,577 bB
Pyr+Bt (1:1)	35,33±0,882 cA	3,00±0,578 aB	2,00±0,578 bB

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0,05$ düzeyinde istatistik ayrım vardır.



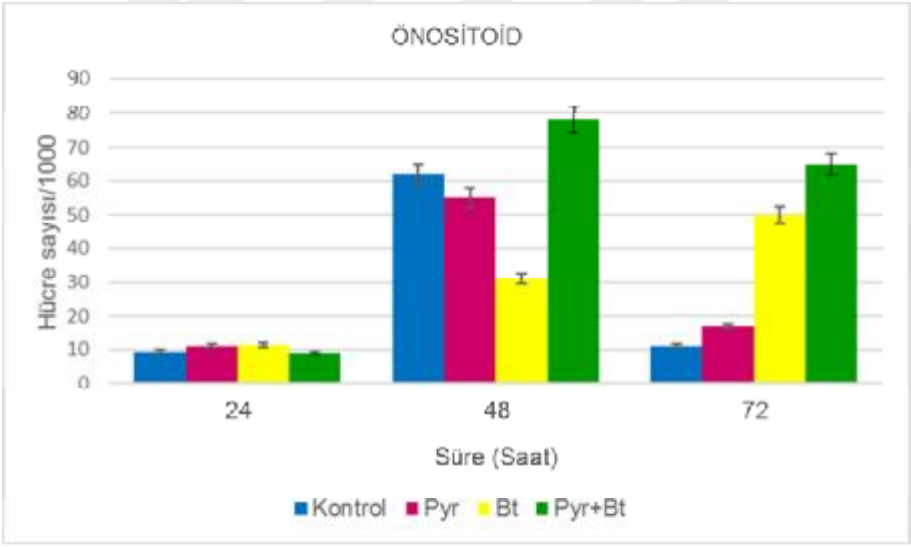
Şekil 4.15. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde sferülosit sayısı

Önositoid sayısının 24 saatlik etki süresinde tüm uygulama gruplarındaki larvaların hemolenfinde tespit edilen önositoid sayılarındaki değişiklikler istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$) (Çizelge 4.29). Uygulamadan 48 saat sonra, *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta kontrole göre 1.99 kat azalma meydana gelirken, karışım uygulaması yapılan grupta 1.27 kat artış meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0.05$). 72 saatlik etki süresinde ise, tüm uygulama gruplarında kontrole göre sırasıyla 1.59, 4.72 ve 6.09 kat artış meydana gelmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.29; Şekil 4.16).

Çizelge 4.29. *G. mellonella*' nın son evre larvalarının hemolenfinde pyriproxyfen, *B. thuringiensis*' in LD_{50} değerlerinin tek başına ve karışımlarının süreye bağlı olarak önositoid sayısındaki değişimler (Ort±S.H).

İnsektisit (µg/mL)	**Önositoid Sayısı**		
	24 $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**48** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *	**72** $\overline{X} \pm s\overline{x}$ *
Kontrol	9,33±0,333 aA	61,67±2,028 aB	10,67±1,202 aA
Pyr	11,33±0,881 aA	55,00±2,309 aB	17,00±1,732 bA
Bt	11,00±0,577 aA	31,00±2,310 bB	50,33±2,028 cC
Pyr+Bt (1:1)	9,00±0,577 aA	78,33±4,33 cB	65,00±2,309 dC

*SNK; Küçük harfler insektisitler arası, büyük harfler ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.



Şekil 4.16. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başlarına ve karışımlarının etkisinde *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde önositoid sayısı

4.2. Tartışma

Tarımsal alanlarda, insektisitlerin bilinçsizce kullanımı sonucunda hem ekolojik dengenin bozulması hem de hedef olmayan canlıların zarar görmesi gibi problemlerle sıklıkla karşılaşılmaktadır. Bunun yanı sıra, bu insektisitlere karşı zararlı böcek türlerinde gelişen direnç mekanizmaları da ilerde gelişebilecek daha büyük sorunlara yol açabilecektir. Bu nedenle, tarımsal alanlarda kullanılan insektisit türlerinin LD_{50} değerlerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmada, *G. mellonella* larvaları için pyriproxyfen ve *B. thuringiensis' in* laboratuvar şartlarında LD_{50} değerleri hesaplanmıştır. Belirlenen LD_{50} değerleri, tek başına ve karışım halinde *G. mellonella* 5. evre larvalarına besin yoluyla uygulanmıştır. Larvaların, hemolenf, orta barsak ve yağ dokularında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* etkisinde anitoksidan enzimlerinden SOD, CAT ve GPx ile lipid peroksidasyonu ürünü MDA seviyesi ve detoksifikasyon enzimlerinden Cyt P450 monooksijenaz, GST ve AChE aktiviteleri ile kan hücreleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

B. thuringiensis etkisindeki böcek larvalarında insektisidal kristal proteinler barsakta çözünerek protoksinler oluşmakta ve enzimler tarafından parçalanarak aktif toksinlere dönüştürülmektedir. Bu toksinler de barsak duvarını parçalayarak, besin artıklarının böcek vücuduna ve hemolenfe karışmasına neden olmaktadır. Çalışmada, *B. thuringiensis* ile karışım halinde kullanılan pyriproxyfen ise yine entegre mücadelede kullanılan ve juvenil hormon analoğu olan bir insektisit türüdür. Pyriproxyfenin sadece hedef tür ve kan hücrelerini baskılayarak immün sistem üzerinde etkili olmasından dolayı, *B. thuringiensis* ile birlikte kullanımı, zararlı tür üzerindeki etkisini arttırmaktadır.

Böceklerde, normal metabolizma faaliyetlerinin dışında vücuda alınan pestisit, ağır metaller gibi kimyasallar, bazı mikroorganizmalar ve radyasyon gibi dış faktörler, vücutta serbest radikallerin artmasına ve buna bağlı olarak da oksidatif strese veya lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Böceklerde de

memelilerde ve diğer organizmalarda olduğu gibi oksidatif stres sonucunda vücutta antioksidan savunma mekanizmaları gelişmektedir. Reaktif oksijen türlerinin neden olacağı hücresel zarardan korunmak için bazı antioksidan enzimler ve enzimatik olmayan antioksidanlar görev almaktadır (Kale ve ark, 1999).

Serbest radikaller, vücutta sürekli olarak oluşturulan ve antioksidan savunma sistemi tarafından ortadan kaldırılan moleküllerdir. Bu dengenin bozulması, serbest radikallerin artmasına ve hücre hasarı oluşturmalarına yol açar. Yapılan araştırmalara göre, hücresel hasara yol açan faktörler arasında, reaktif oksijen türlerinin artışı, antioksidan savunmanın bozulması ve oksidatif hasarın tamirinde yetersizlik yer almaktadır (Dorval ve Hontela, 2003; Keramati ve ark, 2010). Birçok organizmada, SOD, CAT, GPx ve GR gibi reaktif oksijen türlerini yok edici enzimlerin, insektisitler gibi toksik maddelerden kaynaklanan serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücresel sistemi koruyabildikleri saptanmıştır (Banerjee ve ark. 1999; Yarsan ve ark, 1999; Banerjee ve ark, 2001).

Biyolojik membranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, endoplazmik retikulum), membran fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asidlerinin varlığı nedeniyle oksidatif ataklara duyarlıdırlar. Bundan dolayı, serbest radikallerin atakları sonucunda lipid peroksidasyonu denilen bir seri reaksiyon başlar. Lipid peroksidasyonu, membran lipidlerinin oksidatif hasarı sonucunda hücre membran yapısının bozulmasıdır. Hücre membranlarının bütünlüğü ve akıcılığı, hücrenin devamlılığı açısından önemlidir (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Doymamış yağ asitleri ile serbest radikaller arası reaksiyondan açığa çıkan ve hücresel membranlarda lipid peroksidasyonu (LPO) ana ürünü olan hücresel MDA içeriği LPO'nun derecesinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilmektedir (Seth ve ark, 2001; Papadimitriou ve Loumbourdis, 2002; Yu, 2008).

Bu çalışmada, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis'* in *G. mellonella* larvaları için belirlenen LD_{50} değerleri larvalara uygulanmış, hemolenf, orta barsak ve yağ dokularında, uygulamanın 24. saatinde pyriproxyfen uygulanan grupta, 72. saatte

ise hemolenfte tüm gruplarda, orta barsakta *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta, yağ dokuda ise karışım uygulaması yapılan grupta kontrole göre artan SOD aktivitesinin, reaktif oksijen türlerinin eliminasyonuna sebep olduğu düşünülmektedir. Uygulamadan 48 ve 72 saat sonra hemolenfdeki tüm uygulama gruplarında CAT aktivitesindeki artış, artan SOD aktivitesi ile açığa çıkan H_2O_2 konsantrasyonun artması sonucunda meydana gelmiş olabilir. Bu artış, SOD-CAT sisteminin oksijen toksisitesine karşı ilk savunmayı sağladığı fikrini ortaya çıkartmaktadır. Çalışmamızda, orta barsakta insektisitlerin 48 saatlik etki süresinde tüm uygulama gruplarında,72 saatlik etki süresinde ise karışım uygulaması yapılan grupta, *G. mellonella* larvalarının orta barsağındaki azalan SOD aktivitesi, $O_2^{\cdot -}$ radikalinin kendiliğinden dismutasyona uğramasıyla açıklanabilir. Ortam pH' sının hafif asidik olması durumunda $O_2^{\cdot -}$ radikali, SOD enzimi olmadan da kendiliğinden dismutasyonla H_2O_2' e çevrilebilir. *G. mellonella* son evre larvaları ile yaptığımız bir başka çalışmada, topikal aplikasyonla uygulanan pyriproxyfenin, CAT ve SOD aktivitelerinde artış meydana getirdiği belirlenmiştir (Sezer ve Özalp, 2015b). Fahmy (2012), *Spodoptera littoralis* larvaları ile yaptığı çalışmada pyriproxyfen ve buprofezin uygulaması sonucunda CAT, GST ve MDA aktivitelerinde artış meydana geldiğini tespit etmiştir. Dubovskiy ve ark. (2008), *G. mellonella* larvaları ile yaptığı bir çalışmada ise, *B. thuringiensis* ile enfekte edildikten sonra larvaların barsağındaki SOD, GST aktivitelerinde ve MDA mikarında inokülasyondan sonraki ilk günden itibaren artış meydana gelmeye başladığını, CAT aktivitesinde ise azalma görüldüğü bildirilmiştir.

Glutatyon peroksidaz, aktif merkezinde selenosistein bulunduran selenyum taşıyan bir enzimdir ve redükte glutatyonu (GSH) kullanarak H_2O_2' in indirgenmesini katalizleyen sitosol ve mitokondride bulunan tek peroksidazdır. GPx aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH varlığında gerçekleşir. GPx hücrede bulunan toksik peroksitleri detoksifiye ederken GSH'ı okside glutatyona (GSSG) okside eder (Beutler, 1989). Yaptığımız çalışmada, uygulamadan 72 saat

sonra insektisitlerin etkisindeki larvaların yağ dokusundaki artan SOD aktivitesi nedeniyle açığa çıkan H_2O_2' in, ancak CAT ve GPx enzimlerinin artan aktiviteleri ile kontrol altına alınabildiği düşünülmektedir. Hyrls ve ark. (2007), *G. mellonella* son evre larvaları ile yaptıkları bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda borik asit uygulaması sonucunda hemolenfteki SOD aktivitesinin düşük konsantrasyonlarda arttığı, yüksek konsantrasyonlarda azaldığı, yağ dokudaki SOD aktivitesinde ise, artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir. CAT aktivitesinin hemolenf ve yağ dokuda azaldığı, MDA miktarının ise arttğını bildirmişlerdir. GPx aktivitesinin ise, hemolenfte arttığı, yağ dokuda ise düşük borik asit konsantrasyonlarında arttığını, yüksek borik asit konsantrasyonlarında ise azaldığını belirlemişlerdir.

Serbest radikallerin hücre zarı ile etkileşmesi sonucunda, hücre zarının yapısında bulunan lipid ve proteinlerin bozulmasıyla bir dizi reaksiyon meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucunda, özellikle MDA ve protein karbonil ürünleri oluştuğu bilinmektedir. Bu ürünlerin miktarındaki artış lipid peroksidasyonunun ve protein oksidasyonunun önemli bir indikatörüdür (Mano ve ark, 1995; Halliwell, 1994; Heinle ve Betz, 1994). Bazı çalışmalarda çeşitli çevresel stres faktörlerine maruz kalan birkaç böcek türünün ömür uzunluğundaki artışın, lipid peroksidasyonu seviyesinin düşmesi ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Sestini ve ark, 1991). Çalışmamızda, pyriproxyfene maruz bırakılan *G. mellonella* 5. evre larvalarının orta barsak ve yağ dokusunda, uygulamanın 72 saatlik etki sürelerindeki MDA miktarındaki azalmanın, juvenil hormon analoğu olan pyriproxyfenin larval evreyi uzatıcı etkisinden dolayı meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir. *G. mellonella*' nın orta barsağında, 48 ve 72 saatlik etki sürelerinde *B. thuringiensis*' in toksisitesi sonucunda serbest radikal oluşumunun artışı ile MDA miktarının azalmasının nedeninin, lipid peroksidasyonun serbest radikaller tarafından inaktive edilmesinden ve artan serbest radikallerin enzim yapısındaki aminoasitlerle etkileşerek, lipid peroksidasyonu düşürmüş olabilmesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Saraswathy ve ark. 1998).

Ayrıca, uygulama yapılan süreler arasında da MDA miktarlarında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Bu insektisitlerin ve karışımlarının böceğin 5. larval evresinde lipid peroksidasyonuna sebep olarak artan oksidatif strese bağlı olarak etkili olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan insektisitlerin *G. mellonella* larvalalarının hemolenf, orta barsak ve yağ doku hücrelerinde membran lipidlerinin oksidatif hasarı sonucunda lipid preoksidasyonuna ve buna bağlı olarak serbest radikallerin oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir. SOD, CAT ve GPx aktivitelerinin oluşan bu artışın, serbest radikalleri yok etmek amacıyla meydana geldiği fikrini ortaya koymaktadır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, orta barsak ve yağ dokuya oranla hemolenfin serbest radikallerin yıkımında önemli bir görevi olduğu düşünülmektedir. MDA miktarında ise, hemolenf ve orta barsakta uygulamadan 72 saat sonraki sürede tüm uygulama gruplarında daha önemli bir artış meydana geldiği belirlenmiştir. Hemolenfteki MDA miktarında, uygulamanın 72 saatlik etki süresinde meydana gelen artış yağ dokudaki enzimlerin, uygulamanın 3. gününde hemolenfe salınmış olabileceği fikrini desteklemektedir.

Antioksidan savunma sisteminde yer alan GST enzimi, tüm dokularda sadece *B. thuringiensis* uygulaması sonucunda artış göstermiştir. Erdem ve Büyükgüzel (2015), *G. mellonella* larvalarında ksantotoksin uygulaması sonucunda MDA miktarında artış, GST aktivisinde ise azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir. *Lymantria dispar* larvalarına farklı konsantrasyonlarda methidathion uygulaması sonucunda SOD, CAT, GPx aktivitelerinde ve MDA miktarında artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir (Aslantürk ve ark, 2011).

Tarımsal alanlarda zararlılarla mücadelede sıklıkla kullanılan kimyasal insektisitler, zararlı böcek türlerinin yok edilmesinde kısa sürede sonuç elde edilmesine olanak sağlasa da bu insektisitlerin fazla miktarlarda kullanılması zararlılarda direnç gelişimine de neden olmaktadır. Zararlı böcek türleri, nesillerinin devamlılığını sağlamak amacıyla bazı direnç mekanizmaları

geliştirmektedirler. Direnç oluşumunda, böceklerde bulunan asetilkolinesteraz (hedef bölge duyarlılığının azalması), glutatyon-s-transferaz (GST), hidrolaz (karboksilesterazlar) ve monooksigenaz (Sitokrom P450) enzimlerinin etkili olduğu yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir (Whalon, 2008; Hephızlı ve Kumral, 2012).

Asetilkolinesteraz başta sinir ve kas dokusunda olmak üzere merkezi ve periferal birçok dokuda yaygın olarak bulunan bir enzim olup, ana görevi asetilkolini hidroliz ederek sinir iletimini engellemektir (Massoulié ve ark, 1993). Asetilkolin (ACh) sinir uçlarından etkilendiği organa veya sinir ucundan ikinci bir sinir hücresine, sinir implusu taşıma görevini yapmaktadır. Ayrıca sinir ve kas hücreleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasını da sağlayan biyolojik önemi büyük olan bir esterdir (Alon ve ark, 2008). Organikfosforlular ve karbamatlılar asetilkolinin benzeri olarak çalışırlar ve asetilkolinesterazın aktif bölgesine bağlanırlar (Anazawa ve ark, 2003). Asetilkolin hidroliz olmasına rağmen insektisitler, enzim-substrat kompleksi olarak sabit kalırlar. Bu insektisitler asetilkolinesteraz engellemesiyle sinir impulslarının transmisyonunu bloke eder ve asetilkolin reseptörlerinin uyuşmasına neden olurlar (Hollingworth ve Dong, 2008). Sinapsislerdeki artan asetilkolin konsantrasyonu ve daha fazla uyarılmış merkezi sinir sistemi böceklerde ölüme yol açmaktadır (Çakır ve Yamanel, 2005).

Yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, *G. mellonella* hemolenfinde, pyriproxyfen uygulaması yapılan gruplarda, 24 ve 72 saatlik etki sürelerinde, AChE aktivitelerinde önemli bir artış meydana gelirken, *B. thuringiensis* uygulaması yapılan gruplarda, aynı etki sürelerinde azalma olduğu belirlenmiştir. Karışım uygulaması yapılan gruplarda ise, sadece 72 saatlik etki sürelerinde önemli bir artış olduğu tespit edilmiştir. Orta barsakta, pyriproxyfen uygulaması yapılan gruplarda 24 ve 72 saatlik etki sürelerinde artış meydana gelirken, 48 saatlik etki süresinde azalma olduğu belirlenmiştir. *B. thuringiensis* uygulaması yapılan gruplarda, 48 ve 72 saatlik etki sürelerinde artış meydana gelmiştir. Karışım

uygulaması yapılan gruplarda ise, 24 saatlik etki süresinde artış meydana gelirken, 48 saatlik etki sürelerinde önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir. Yağ dokuda ise, pyriproxyfen uygulaması yapılan gruplarda 24 saatlik etki süresinde artış, 48 ve 72 saatlik etki sürelerinde azalma belirlenmiştir. ***B. thuringiensis*** uygulaması yapılan gruplarda, 48 saatlik etki süresinde artış meydana gelmiştir. Karışım uygulamalarında ise, 24 ve 48 saatlik etki sürelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. İnsektisitlerin ve karışımlarının süreye bağlı etkisi incelendiğinde, ***G. mellonella*** larvalarının hemolenf, orta barsak ve yağ dokularındaki AChE aktivitesi etki sürelerindeki artışa bağlı olarak önemli bir azalma göstermiştir.

Schistocerca gregaria nimfleri ile yapılan bir çalışmada abamectin uygulaması sonucunda AChE aktivitesinde artış meydana gelirken, *S. litura* larvalarındaki enzim aktivitesinde önemli bir değişim olmadığı bildirilmiştir (Abd El-Aziz, 2010; 2015). Muthusamy ve ark. (2011), *S. litura* larvaları ile yaptıkları çalışmada lamda-cyhalothirin uygulaması sonucunda AChE aktivitesinde düşük konsantrasyonlarda artış, yüksek konsantrasyonlarda ise azalma tespit etmişlerdir. Dichlorvos uygulaması ile tüm konsantrasyonlarda enzim aktivitesinde inhibisyon meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Oxya chinensis ile yapılan bir diğer çalışmada phoxim etkisinde AChE aktivitesi tüm konsantrasyonlarda inhibe olmuştur (Wu ve ark, 2011). Farklı böcek türleri ile yapılan diğer çalışmalarda ise organofosfatlı insektisitlerin etkisiyle AChE aktivitesinde azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Menozzi ve ark, 2004; Reyes ve ark, 2012). ***G. mellonella*** ile yapılan başka bir çalışmada sodyum tetraboratın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda, hemolenfte AChE aktivitesinde azalma meydana geldiği, yağ dokuda ise artış olduğu tespit edilmiştir (Durmuş, 2007).

Yapılan literatür çalışmalarında, farklı insektisitlerin çeşitli böcek türlerinde AChE aktivitesini değiştirdiği, bu değişimin uygulama dozu ve süresine bağlı olarak artış/azalış şeklinde meydana geldiği görülmüştür. Yapılan bu

çalışmalar, bizim çalışmamız ile süreye ve uygulanan insektisite bağlı olarak benzerlik göstermektedir. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* toksisitesi sonucunda serbest radikal oluşumunun artışı ile AChE aktivitesinde aktifliklerinin azalması bu enzimin serbest radikaller tarafından inaktive edilmesinden kaynaklanabilir. Ayrıca, artan serbest radikaller bu enzimlerin kofaktörü olan metal iyonları veya enzim yapısındaki aktif aminoasitler ile etkileşerek enzimlerin aktivitesini düşürmüş olabileceği fikrini vermektedir.

Direnç mekanizmasında etkili olduğu bilinen bir diğer enzim grubu Glutatyon-s-transferazlardır. Böceklerde bu enzim insektisitlerin toksik etkilerine karşı temel bir savunma olarak bilinir. GST, insektisit ya da toksik metabolitlerin indirgenmiş glutatyonla konjugasyonunu katalize eder (Townsend ve ark, 1992; Tarhan ve ark, 2013). Böceklerde GST enzimi insektisit detoksifikasyonunun yanı sıra, hücresel membranların oksidatif yıkımlara karşı korunmasını da sağlamaktadır (Yu, 2008), çünkü GST alt üniteleri epoksit karsinojenlerine ve pestisitlere karşı yüksek katalitik aktiviteye sahiptir. GST izoenzimlerinin çevresel modulasyonları belirli türlerde kimyasal toksinlere karşı direnç oluşturmakta ya da hassasiyeti etkilemektedir (Hayes ve Pulford, 1996; Gallagher ve Sheehy, 2000). Yapılan çalışmalarda toksik maddelere karşı oluşan GST aktivitelerinde farklı sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Bu durum ksenobiyotiklerin çeşidine, uygulanan konsantrasyona ve uygulama zamanına ve ilgili türe göre değişiklik göstermektedir (Oruç ve Üner, 2000).

G. mellonella larvaları ile yaptığımız çalışmada, doku farkına ve uygulanan insektisit türüne bağlı olarak GST aktivitesinde değişimler görülmüştür. Hemolenfte, uygulamadan 24 saat sonra kontrol grubuna göre azalma meydana gelirken, 48 saat sonra *B. thuringiensis*, 72 saat sonra ise pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulaması yapılan gruplarda artış meydana gelmiştir. Tüm uygulama sürelerinde azalma oranı en fazla karışım uygulaması yapılan gruplarda gözlenmiştir. Orta barsakta, 48 saat sonra tüm uygulama gruplarında artış meydana

gelmiş, 72 saat sonra ise *B. thuringiensis* ve karışım uygulaması yapılan gruplarda artış gözlenmiştir. Yağ dokuda ise, uygulamadan 24 saat sonra sadece *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta artış görülürken, 72 saat sonra tüm gruplarda azalma meydana gelmiştir. Dokulardaki GST aktivitelerinde meydana gelen bu farklı sonuçlar, dokular arasında metabolizmalarındaki ve reaktif oksijen türlerine karşı savunmalarındaki farklılıklar nedeniyle ortaya çıktığını düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada, bal arılarının ventrikullerindeki GST aktivitesi hemolenfe oranla 5 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Weirich ve ark, 2002). GST ayrıca, steroid hormonlarının sentezinde de görevlidir (Hayes ve ark, 2005), bu da enzimin aktivitesinde yağ doku ve sindirim sisteminde görülen farklılıkları açıklamaktadır. *Spodoptera exigua* larvaları ile yapılan başka bir çalışmada, nikel ve diazinonun tek başlarına ve karşım halindeki uygulamaları sonucunda, tüm uygulama gruplarında GST aktivitesinin barsakta arttığı belirlenmiştir. Ayrıca diazinon uygulaması sonucunda vücut duvarında, nikel uygulanan gruplarda ise yağ dokuda GST aktivitesinde azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Zawisza-Raszka ve Dolezych, 2008). GST enziminin inhibisyonu farklı hipotezlerle açıklanabilmektedir, birincisi biyotransformasyon basamakları aracılığı ile Sitokrom P450 enzimi, GST enzimi üzerindeki aktif bölgelerdeki GST substratları ile rekabet ederek farklı metabolitlerin karışımlarını üretebilir (Egaas ve ark, 1999), ikincisi ise Gallagher ve Sheehy (2000)' e göre düşük aktiviteler moleküler seviyede GST proteinlerinin sentezinin azalmasına neden olmuş olabilir. Rachokarn ve ark. (2008), *Melia azedarch* ekstraktının *S. exigua* larvalarında uygulanması sonucunda GST aktivitesinde yüksek seviyede inhibisyon meydana geldiğini bildirmişlerdir. Dere ve ark, (2015), *G. mellonella* larvaları ile yaptığı bir çalışmada, azadirachtin uygulaması sonucunda larvaların hemolenfinde yüksek konsantrasyonlarda 72 saatlik uygulama sonunda, GST aktivitesinin inhibe olduğunu tespit etmiştir. Elde ettiğimiz veriler, yapılan bu çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Buna ek olarak, GST aktivitesindeki değişiklikler, böcek türleri

arasındaki farklı GST izoformlarına, beslenme farklılıklarına veya substrat ve izoenzimler arasındaki farklılaşmalardan da meydana gelebilmektedir (Egaas vd. 1992). Abd El-Aziz (2015), *S. littoralis* larvalarında Abamektin uygulaması sonucunda, Tarhan ve ark. (2013), *G. mellonella* larvalarında 20-hidroksiekdizon ve juvenil hormon uygulamaları sonucunda GST aktivitelerinde azalma meydana geldiğini bildirirken, War ve ark. (2011), *S. litura* larvalarında endosulfan ve neem yağının sinerjistik etkilerinin GST aktivitesini arttırdığını bildirmişlerdir.

Sitokrom P450 monooksigenaz enzimi, hormon, yağ asidi, steroidler gibi endojen bileşiklerin düzenlenmesinde ve pestisit, bitki toksinleri gibi ksenobiyotiklerin katabolizma ve anabolizmalarında önemli görevleri olan metabolik bir sistemdir. Sitokrom P450, monooksigenaz sistemlerinde terminal oksidaz olarak görev yapan bir hemoproteindir (Scott, 1999). Böceklerde monooksigenazların büyüme, gelişme, beslenme, pestisitlere karşı direnç ve bitki toksinlerine karşı tolerans gibi birçok rolü vardır. Buna ek olarak, monooksigenazlar 20-hidroksiekdizon ve juvenil hormon gibi böcek hormonlarının sentezi ile yakından ilişkilidir (Hammock, 1975; Agosin, 1985; Hunt ve Smirle, 1988; Reed ve ark, 1994; Scott, 1999). Yapılan çalışmada, pyriproxyfen, *B. thuringiensis* ve karışımlarına maruz bırakılan *G. mellonella* 5. evre larvalarının, hemolenfte tüm sürelerde, orta barsakta ise uygulamadan 72 saat sonra P450 enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. Tüm sürelerde pyriproxyfen uygulaması sonucunda Sitokrom P450 enziminde meydana gelen önemli artışın nedeninin, monooksigenazların böcek hormonlarının sentezinde görevli olmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir. *Bemisia tabaci* ve *Musca domestica* türleri ile yapılan birçok çalışmada da pyriproxyfene karşı direnç geliştiği tespit edilmiştir (Crowder ve ark, 2007; Ma ve ark, 2010; Karatolos ve ark, 2012). Ökaryot canlıların mitokondri ve endoplazmik retikulum organellerinde bulunan P450 monooksigenaz enziminin, allelokimyasal toksisitesine karşı savunma mekanizması esnasında Lepidoptera ordosuna ait böceklerin malpigi tüpleri ve orta

bağırsaklarında arttığı belirtilmiştir (Yorulmaz ve Ay, 2010). Farklı böcek türleri ile yapılan diğer çalışmalarda da özellikle orta barsakta ve malpigi tüplerinde P450 enzim aktiviteleri en yüksek seviyelerde olduğu tespit edilmiştir (Hodgson, 1985; Scott ve ark, 1998; Brun ve ark, 1996). ***Helicoverpa armigera*** larvaları ile yapılan bir çalışmada pentometilbenzen ve naftalin uygulaması sonucunda sitokrom P450 enziminin larvaların orta barsağında yağ dokuya oranla artış miktarının daha fazla olduğu belirlenmiştir (Qiu ve ark, 2003). Yaptığımız çalışmada ise, orta barsakta sadece 72 saat sonunda aktivitede artış meydana gelirken, hemolenfte 24, 48 ve 72. saatlerde önemli bir artış olduğu tespit edilmiştir. Hemolenfteki bu etkinin, enzimlerin veya proteinlerin, böceğin vücuduna giren toksin maddelere bağlanarak bu molekülleri hedef yerleri olmayan, hemolenf gibi farklı bölgelerde depolanmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir.

İnsektisit direncine karşı kullanılan metotlar arasında, uygulama aralıklarının, dozlarının arttırılması ya da bazı durumlarda yeni ürünlerin alternatif olarak uygulanması sayılabilir. Fakat, yeni ürünlerin kullanılabilirliği, çevresel ve toksikolojik güvenliğin artan standartlarından dolayı sınırlandırılmıştır (Ware, 2000). Direnç gelişiminin önlenmesi için, yeni ürünlerin kullanımının kısıtlanmasından dolayı, bu durum insektisitlerin karışım halinde kullanılmasıyla giderilmektedir. Karışımda kullanılan farklı etki mekanizmalı insektisitler birbirlerinin etkisini arttırmakta ve sonuç olarak bu da maliyetin azalmasına neden olmaktadır (Martinez ve ark, 2004; Attique ve ark, 2006). Bu insektisitlerin, düşük dozlardaki kombinasyonlarının kullanılması ekolojik, biyolojik ve ekonomik yönden farklı yararlar sağlamaktadır. Whalon ve ark. (1994), ***B. thuringiensis'*** in neem ekstraktarı ve böcek büyüme düzenleyicileri ile birlikte karışım halinde uygulandığında ***B. thuringiensis***' in diğer insektisitlere karşı antogonistik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Juvenil hormon analoğu olan azadirachtinin malathion, decametrin ve ***B. thuringiensis*** ile karışım uygulamalarının ***S. litura*** larvalarında mortalite, büyüme ve gelişme üzerine etkili olduğunu bildirmişlerdir.

War ve ark. (2011)' nın aynı tür ile yaptığı bir başka çalışmada ise endosulfan ve neem yağının karışım halinde uygulanması ile esteraz aktivitesinin azaldığı, GST aktivitesinin ise arttığını tespit etmişlerdir. Bazı insektisitlerin sublethal dozlarının *B. thuringiensis*' in etkisini arttırmak amacıyla karışım halinde uygulanarak birçok böcek türüne karşı sinerjistik etki meydana getirdiği bilinmektedir (Schrod ve ark, 1996; Barcic ve ark, 2006). Rizwan-ul-Haq ve ark. (2009), *S. exigua* larvaları ile yaptıkları çalışmada *B. thuringiensis* ile harmalin ve ricininin sublethal dozlarının karışım halindeki uygulamaları sonucunda mortalitenin arttığı, SOD ve CAT aktivitelerinde artış meydana geldiğini bildirmişlerdir.

G. mellonella larvalarına pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in karışım halindeki uygulamalarının antioksidan sistemler ve detoksifikasyon mekanizmaları üzerine etkileri incelendiğinde, karışım uygulamalarının larvaların hemolenfinde antioksidan enzim aktivitelerini (SOD, CAT, GPx) arttırdığı, MDA ve GST aktivitelerini ise azalttığı tespit edilmiştir. AChE aktivitesinde ise, artış meydana getirmiştir. Sonuç olarak, karışım uygulamasının hemolenfte *B. thuringiensis* biyopreparatlarının etkisini arttırdığı belirlenmiştir. Orta barsakta, karışım uygulamalarının pyriproxyfen gruplarına göre antioksidan enzimlerinden CAT ve GPx ile MDA ve detoksifikasyon enzimlerinden AChE ve GST aktivitelerini arttırdığı belirlenmiştir. Cyt P450 aktivitesinde ise azalma meydana gelmiştir. Larvaların yağ dokusunda ise, karışım uygulaması yapılan gruplarda SOD, GPx aktiviteleri ve MDA miktarı artarken, CAT ve GST aktivitelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. AChE aktivitesinde ise, deney süresinin sonunda artış gözlenmiştir.

Böceklerde bağışıklık sisteminde önemli görevleri olan hemositler böceğin gelişimi sırasındaki değişimler ile açlık, yaralanma, parazitizm, hastalıklar ve insektisitleri kapsayan kimyasallar ile mücadele ederler. Bunun sonucu olarak da stres faktörlerinde total hemosit sayılarının değişebildiği, ayrıca bu sayının sadece larval evreler arasında değil, böceğin gelişimi sırasında içinde bulunduğu evrelerde

de farklılıklar gösterebildiği bilinmektedir. Böceklerde hemosit tiplerinin farklı görevleri bulunmaktadır. Prohemositler diğer hemositlerden farklılaşan kök hücrelerdir. Plazmatositler yabancı maddelerin etrafında kapsül ve nodül oluşturur. Granülositlerin fagositoz özelliği vardır. Önositoidler fenoloksidazları sentezler ve hemolenfin melanize olmasına neden olur. Sferülositler ise melanizasyon, fagositoz, pıhtılaşma ve hücre adhezyonunun düzenlenmesi gibi birçok görevinin olabileceği ile ilgili yorum yapılsa da henüz netlik kazanmamıştır (Huang ve ark, 2016). Yapılan çalışmada, *G. mellonella* 5. evre larvalarının hemolenfindeki total hemosit sayısı pyriproxyfen, *B. thuringiensis* ve karışımlarının etkisinde kontrol grubu ile kıyaslandığında, uygulamadan 24 saat sonra azalmış, 48 ve 72. saatlerde ise artış göstermiştir. Diferansiyel hemosit sayıları üzerine etkilerine bakıldığında, plazmatosit sayısı uygulamadan 24 saat sonra pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta azalmış, karışım uygulaması yapılan grupta ise artmıştır. Uygulamadan 48 saat sonra tüm uygulama gruplarında plazmatosit sayısı artmıştır. 72 saatlik etki süresinde ise pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulaması yapılan gruplarda artış görülürken, karışım uygulaması yapılan grupta azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Granülosit sayısı, uygulamadan 24 ve 48 saat sonra pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta artmış, karışım uygulaması yapılan grupta ise azalmıştır. Uygulamadan 72 saat sonra ise granülosit sayısı tüm uygulama gruplarında azalmıştır. Prohemosit sayısı, 24 ve 48 saatlik etki sürelerinde azalmış, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulaması yapılan gruplarda artmıştır. Sferülosit sayısı, uygulamadan 24 saat sonra *B. thuringiensis* ve karışım uygulaması yapılan gruplarda artmış, 72 saat sonra ise azalma görülmüştür. Önositoid sayısı ise, 48 saatlik etki süresinde *B. thuringiensis* uygulaması yapılan grupta azalma, karışım uygulaması yapılan grupta artış, 72 saatlik etki süresinde ise tüm uygulama gruplarında artış meydana gelmiştir.

Ghasemi ve ark. (2014), *Ephestia kuehniella* larvaları ile yaptıkları bir çalışmada pyriproxyfen uygulanması sonucunda total hemosit sayısı, plazmatosit,

prohemosit ve sferülosit oranlarında azalma meydana geldiğini, granülosit ve önositoid oranlarının ise arttığını tespit etmişlerdir. Methoxyfenozide uygulaması sonucunda ise, total hemosit sayısının ve plazmatosit, önositoid oranlarının arttığı, granülosit, prohemosit ve sferülosit oranlarının ise azaldığını bildirmişlerdir. *Mythimna separata* larvaları ile yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyonlardaki hexaflumuronun total ve diferansiyel hemosit sayıları üzerine etkileri incelenmiş, düşük konsantrasyonlarda böcek büyüme düzenleyicisi hexaflumuron uygulanan larvalarda total hemosit sayısının uygulamadan 24 ve 48 saat sonra arttığını tespit etmişlerdir. Buna karşın, yüksek konsatrasyonda ise total hemosit sayısının azaldığını bildirmişlerdir. Uygulamadan 96 saat sonra ise konsantrasyon artışına bağlı olarak total hemosit sayısında azalma meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca konsantrasyon artışına bağlı olarak granülosit sayısında azalma, plazmatosit sayısında ise artış meydana geldiğini bildirmişlerdir (Huang ve ark, 2016). *S. litura* larvaları ile yapılan bir çalışmada subletal konsantrasyonlarda hexaflumuron uygulanması sonucunda total ve diferansiyel (plazmatosit ve granülosit) hemosit sayılarında artış meydana gelmiştir (Zhu ve ark, 2012). Böceklerde total hemosit sayısı, ekdizon hormonunun miktarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Prasada Rao ve ark, 1984). 20-hidroksiekdizon (20E) ve juvenil hormon gibi böcek hormonları, böceklerde bağışıklık sisteminde iki farklı şekilde etki gösterirler. 20E, hemositlerin proliferasyonuna neden olurken, juvenil hormon ve analogları ters etki göstermektedirler (James ve Xu, 2012). Akai ve Sato (1971)' ya göre, *Bombyx mori* hemolenfinde ekdisteroid oranının artış göstermesinin nedeni hemositlerin hematopoietik organlardan daha fazla miktarda salınmasıdır. Nakahara ve ark. (2003), hematopoietik organlardan salınan bu hemositlerin öncelikli olarak prohemositlerden ve plazmatositlerden meydana geldiğini bildirmişlerdir. Benzer sonuçlar *Pseudoplusia includens* (Walker) ve *S. frugiperda* (Smith) (Gardiner ve Strand, 2000) ve *M. sexta* (L.) (Nardi ve ark, 2003) türlerinde de tespit edilmiştir. Bu sonuçlar böceklerde eksdisteroid hormonunun hemosit

üretiminde önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Buna karşın, pyriproxyfen gibi juvenil hormon analoğu insektisitler ekdizon biyosentezi üzerinde engelleyici etki göstermekte ve hematopoietik organlardan hemositlerin salınımını baskılamaktadır. Kim ve ark. (2008), *S. exigua* (Hübner)' da juvenil hormonun hemosit sayıları ve yayılım davranışı üzerine antogonistik etki gösterdiği sonucuna varmışlardır. *Eurygaster integriceps* erginleri ile yapılan bir çalışmada, pyriproxyfen uygulanması sonucunda total hemosit, plazmatosit ve granülosit sayılarının azaldığı gözlenmiştir (Zibaee ve ark, 2012). *E. kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) 4. evre larvalarında total hemosit sayısına ek olarak, plazmatosit ve granülosit sayıları üzerinde pyriproxyfenin kısıtlayıcı etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır (Rahimi ve ark, 2013). Gelbic ve ark. (2006), juvenil hormon analoğu olan metirapon uygulanması sonucunda *S. littoralis* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae)' de granülosit sayısının azaldığını, buna karşın plazmatosit sayısının arttığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada, *G. mellonella* larvalarına pyriproxyfen uygulanmasından 72 saat sonra plazmatosit oranının artması, buna karşın granülosit oranının ise azalmasından dolayı, pyriproxyfenin uzun süreli etkisine karşı daha hassastırlar. Bu sonuç, böcek büyüme düzenleyicilerinin hemositlerin farklılaşmasında önemli olduğunu ve dolayısıyla larvanın immun savunma sisteminin kapasitesini baskıladığı fikrini ortaya koymaktadır. Ayrıca, çalışmada pyriproxyfenin uygulamadan 48 ve 72 saat sonra total hemosit sayısında artışa neden olması, toksik moleküllerin melanizasyon yoluyla enkapsülasyonu arttırmış olmasından kaynaklanmış olabilir, çünkü enkapsülasyon sırasında melanin birikimi çoğunlukla hemositler tarafından ya da plazmadaki fenoloksidaz enzimi ile başlatılmaktadır (Rolff ve Siva-Jothy, 2002; Nappi ve Christensen, 2005). Yapılan bazı çalışmalarda, juvenil hormon analoglarının uygulanması sonucunda beyin hormonunun salgılanmasının inhibe olabileceği de bildirilmiştir (Tiwari ve ark, 2006; Pandey ve Tiwari, 2011). Ayrıca, total hemosit sayısındaki bu artışın, sesil haldeki hemositlerin salınımı ve

hemositlerin mitotik bölünmesi ile de bağlantılı olabileceği düşünülmektedir, çünkü birçok böcek türü bazı insektisitler veya böcek büyüme düzenleyicilerine karşılık olarak aktive olabilen sesil hemosit popülasyonlarına sahiptir (Ratcliffe ve George, 1976). Buna ek olarak, patojenler veya böcek büyüme düzenleyicileri gibi yabancı maddelere karşı immun tepki olarak total hemosit sayısında artış meydana geldiği farklı böcek türleri ile yapılan birçok çalışma da mevcuttur (Chu ve ark, 1993; Anderson ve ark, 1995; Ordas ve ark, 2000; Ghoneim ve ark, 2015). Farklı böcek türleri ile yapılan çalışmalar göz önünde tutulduğunda, pyriproxyfen gibi juvenil hormon analoglarının hemosit sayıları üzerindeki olumsuz etkileri, larval hematopoietik fonksiyonların inhibisyonu veya hücre poliferasyonu gibi sitotoksik etkiler ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Rosenberger ve Jones (1960)' a göre, böceklerin hemosölünde patojenlein varlığı savunma sistemleriyle total hemosit sayısında değişimler meydana getirerek aktive edilebilir. Bununla birlikte, savunma olarak total hemosit sayısında artış ya da azalma olabileceği ile ilgili kesin bir yargı bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda patojenlerin varlığı sonucunda nodülasyon ve enkapsülasyon nedeniyle dolaşımdaki hemosit sayısında azalma meydana gelebileceği bildirilmiştir (Ratcliffe ve ark, 1985; Morton ve ark, 1987; Rivers ve ark, 2002). Buna karşın, Richards ve Edwards (1999) ve Russo ve ark. (2001), hemosölde patojenlerin varlığının hemolenfteki hücrelerin sayısının artışına neden olan hemopoiesisi uyardığını ortaya koymuşlardır.

Yapılan çalışmada *G. mellonella* larvalarında, *B. thuringiensis* uygulaması sonucunda, total hemosit sayısında uygulamadan 24 saat sonra azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Broderick ve ark. (2010), *L. dispar* larvaları ile yaptıkları çalışmada *B. thuringiensis* ile enfeksiyonu sırasında total hemosit sayısının azaldığı belirlenmiştir. Hücresel bağışıklık reaksiyonlarının azalması, bakteriyel intoksikasyon sonucunda hemositlerin azalmasıyla bağlantılı olabilir. Ayrıca *B. thuringiensis* bakteriyosizinin bir etkisi olan açlık sonucunda da total hemosit

sayısında azalma meydana gelmiş olabilir (De Block ve Stoks, 2008; Lee ve ark, 2006). *L. dispar* ve *Trichoplusia ni* larvaları ile yapılan başka bir çalışmada oral yolla *B. thuringiensis* ile enfekte olan larvaların dolaşımındaki hemosit sayısının azaldığını bildirmişlerdir (Broderick ve ark, 2010; Ericsson ve ark, 2009). Buna ek olarak, subletal konsantrasyonlarda *B. thuringiensis* uygulaması sonucunda *Agrotis ipsilon* ve *Rhynchophorus ferrugineus*' da total hemosit sayılarında azalma belirlenmiştir (Abd El-Aziz ve Awad, 2010; Manachini ve ark, 2011). Yüksek konsantrasyonlarda *B. thuringiensis* ile enfekte olan böcekler, kontrol grupları ile kıyaslandığında besinden kesilme, ağırlık kaybı ve gelişimin engellenmesi gibi semptomlar sergilemektedir (Bravo ve ark, 2005). Kısa süreli besinsel yoksunlukta immun reaksiyon aktivitesinin azalmasına yol açmaktadır (Siva-Jothy ve Thompson, 2002). Yapılan diğer çalışmalar göz önünde tutulduğunda, *B. thuringiensis* uygulamasından 24 saat sonra azalan hemosit sayısının bağışıklık reaksiyonlarına hücrelerin katılması veya barsaklarda *B. thuringiensis* enfeksiyonu sonucunda ortaya çıkan açlık ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, uygulamadan 48 ve 72 saat sonra total hemosit sayılarında meydana gelen artışın, *G. mellonella* larvalarının enfeksiyonu sonucunda patojenlere karşı oluşturulmuş immun tepkiden kaynaklanabilir.

Prohemositler, diğer hemosit tiplerinin oluşumunda önemli rol oynayan hematopoietik hücrelerdir (Lavine ve Strand, 2002). Yapılan çalışmada, *B. thuringiensis* ile enfekte edilen *G. mellonella* larvalarındaki prohemositlerin azalmasını bakteri enfeksiyonuna cevap olarak diğer hücre tiplerine dönüşmesi nedeniyle meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir. *B. thuringiensis* uygulamasından 24 saat sonra prohemosit sayısının azalması, granülosit ve sferülosit sayılarının artışıyla bağlantılı olabilir, çünkü hemositlerin poliferasyonu sırasında prohemositler plazmatositlere dönüşmekte, plazmatositler de hemolenfteki granülosit ve sferülosit gibi diğer hücre tiplerine farklılaşmaktadır (Beaulaton, 1979).

Chain ve Anderson (1982), *G. mellonella* larvaları ile yaptıkları çalışmada *Bacillus cereus* enfeksiyonunun hemolenften plazmatositlerin yok edilmesine neden olduğunu bildirmişlerdir. *Manduca sexta* larvaları, *Pseudomonas aerugina* ve *Escherichia coli* ile enfekte edildiğinde plazmatosit ve granülosit sayılarında azalma, sferülosit sayısında ise artış meydana gelmiştir (Horohov ve Dunn, 1982). Bakteri enfeksiyonları sonucunda plazmatosit sayılarında meydana gelen azalma bu hücrelerin biraraya toplanmasına veya hemosölün duvarına yapışmasından dolayı olabileceği fikrini ortaya koymaktadır (Abd El-Aziz, 2010). Ayrıca, granülositlerin hemolenfteki yabancı maddelerin tanımlanmasında ve fagositoz ile detoksifikasyon proseslerinde görevleri olduğu bilinmektedir (Nardi, 2004; Riberio ve Brehelin, 2006). Ayaad ve ark. (2001), *Parasaarcophaga surcoufi* 3. evre larvaları ile yaptıkları çalışmada nematod enfeksiyonu sonucunda plazmatosit ve granülosit sayılarının enfeksiyondan 40 saat sonra azaldığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmalar bizim sonuçlarımız ile benzerlik göstermektedir. *B. thuringiensis* uygulanmasından 24 saat sonra plazmatosit sayısında, 72 saat sonra ise granülosit sayısında azalma meydana gelmiştir. Bu azalmalar, plazmatositlerin ve granülositlerin fagositoz ve enkapsülasyon olaylarında görevli olmaları nedeniyle meydana geldiği fikrini ortaya koymaktadır. Gillespie ve ark. (1997) göre, bakteriler gibi küçük partiküllü yabancı maddelere karşı hemositlerin en önemli görevi reseptör aracılı endositoz formu olarak özelleşmiş fagositoz olayıdır.

Farklı etki mekanizmalı insektisitlerin karışım halinde kullanılmaları bazı durumlarda tek başlarına kullanımlarına göre avantaj sağlamaktadır. Bu durum, insektisitlerin formulasyonlarına, karışım oranlarına ve zararlı türlerin biyolojik dönemlerine göre değişiklik göstermektedir (Cloyd, 2010). İnsektisitlerin karışım halinde kullanılmalarının en önemli nedeni dayanıklılık oluşumunu önlemek ve geciktirmektir. Juvenil hormon analogları gibi bazı insektisit türleri, böceklerde bağışıklık sisteminde baskılayıcı etki göstermektedir. Bu insektisit türleri entomopatojen organizmalarla karışım halinde kullanıldığında patojenezitenin

artmasına neden olmaktadır. *Plutella xylostella* larvaları ile yapılan bir çalışmada pyriproxyfen ile birlikte *B. thuringiensis* kurstaki bakterileri uygulandığında pyriproxyfenin bağışıklığı baskılayıcı özelliğinden dolayı mortalitenin arttığı tespit edilmiştir. Jung ve Kim (2007), *P. xylostella* larvaları ile yaptıkları başka bir çalışmada *B. thuringiensis* toksinlerinin larvanın orta barsağında yabancı materyallerin barsak lümeni ve hemosöl arasında aynı yönde ilerleyebilmesini sağlayan porlar meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Bu nedenle *G. mellonella* larvaları ile yaptığımız çalışmada *B. thuringiensis* ve pyriproxyfenin birlikte uygulandığında *B. thuringiensis* enfenksiyonu sonunda ortaya çıkabilecek porlar yoluyla hemosöle girebilen barsak mikroplarına maruz kalan larvalarda, pyriproxyfenin meydana getirdiği bağışıklık baskılanması nedeniyle septisemi oluşmuş olabilir. Farklı etki mekanizmalı insektisitlerin karışımlarının Lepidoptera larvalarında total ve diferansiyel hemosit sayıları üzerine etkileri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. *Chilo suppresalis* larvaları ile yapılan bir çalışmada hexaflumuronun farklı konsantrasyonları tek başına ve *Beauveria bassiana* sporları ile birlikte uygulandığında farklı zaman aralıklarında hemosit sayılarında artış meydana geldiği tespit edilmiştir (Mirhaghparast ve ark, 2015b). Tomilova ve ark. (2016), avermektin ve entomopatojen fungus *Metarhizium robertsii*' nin sinerjistik etkilerinin *Leptinotarsa decemlineata* Say. larvalarında total hemosit sayısında artış meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçların aksine, *S. littoralis* (Boisd.) larvalarında multikapsid nukleopolihedrovirus (Spli MNPV) ve azadirachtinin tek başına ve karışım halindeki uygulamaları sonucunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında total hemosit sayısında azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir (Shaurub ve ark., 2014). Entomopatojenik fungus *M. robertssi* ve subletal dozdaki *B. thuringiensis ssp. morrisoni* var. tenebrionis bakterisinin sinerjistik etkilerinin *L. decemlienata* 4. evre larvalarında immun savunma sistemi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada bakteriyel enfeksiyonun larvanın integumentinde fungal konidyumu hızlandırdığını ve total hemosit sayısında azaltma meydana getirdiği

tespit edilmiştir (Yaroslavtseva ve ark, 2017). *G. mellonella* ile yapılan başka bir çalışmada ise, entomopatojen organizmalardan *Crodyceps militaris* ve *Beauveria bassiana'* nın birlikte kullanımının total hemosit sayısında azalma meydana getirdiği belirlenmiştir (Kryukov ve ark, 2015). Pyriproxyfenin ve *B. thuringiensis*' in karışım halinde uygulanması sonucunda, *G. mellonella* larvalarında immun sistem üzerine etkilerinin belirlenmesinde elde edilen sonuçlar diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.

G. mellonella ve birçok böcek türü ile yapılan çalışmalar pyriproxyfen, *B. thuringiensis* ve diğer tür insektisitlerin, böceklerin biyolojik parametreleri üzerindeki olumsuz etkilerinde oksidatif stresin, detoksifikasyon mekanizmasının, nörotoksik özelliğin ve immun sistemin önemli rol oynadığını açıkça göstermektedir. Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis*' in tek başına ve karışım halindeki uygulamalarının, böcek üzerinde gösterdigi toksik etki mekanizmasının anlaşılması zararlı böceklerle mücadelede, hedef olmayan canlılara ve çevreye daha az olumsuz etkisi olan yeni kimyasal yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlayabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada, *G. mellonella* 5. evre larvalarında, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* biyopreparatlarının tek başına ve karışım halindeki uygulamalarının fizyolojik, biyokimyasal ve immünolojik etkilerinin araştırılması amacıyla, hemolenf, orta barsak ve yağ dokuda antioksidan ve detoksifikasyon enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon seviyeleri ile total ve diferansiyel hemosit sayılarındaki değişimler belirlenmiştir.

Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis'* in, oksidatif stresin göstergesi olan CAT, SOD, GPx ve MDA miktarındaki değişimlere karşı, önemli bir detoksifikasyon enzimi olan Cyt P450, GST ile sinirsel iletimden sorumlu AChE enzimlerinin aktivitelerinde değişimlere sebep olduğu açıkca görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak ve yağ dokusundaki olumsuz etkilerin, pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* ile uyarılan oksidatif stresten kaynaklandığını göstermektedir. Farklı türlerle yapılan çalışmalarda insektisitlere maruz bırakılan böceklerde antioksidan enzim aktivitelerinin dokuya özgü olarak değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Yapılan çalışmada da oksidatif strese karşı her dokudaki antioksidan savunma mekanizması ve hücre adaptasyonunda farklılık gözlenmiştir.

İnsektisitlerin sublethal dozlarının kullanımı, zararlılarla entegre mücadelede çevreye dost bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, insektisitlerin gereğinden fazla uygulanmasını önlemek amacıyla, LD_{50} değerlerinin belirlenmesi daha sağlıklı sonuçların alınmasına neden olmaktadır. İnsektisitlerin LD_{50} değerlerinin karışım halinde uygulanması durumunda, düşük dozda kullanım, hava kirliliğinin önlenmesi açısından ekolojik olarak, karışım uygulamaları direnç gelişimini yavaşlatacağı için biyolojik olarak ve her uygulamada düşük maliyetler elde edileceği için de ekonomik yönden yarar sağlayacaktır. Sunulan çalışmada da dokular arası farklılaşmalar olsa da genel

olarak karışımın etkisinde antioksidan enzimlerde, MDA miktarı ve detoksifikasyon enzimlerinde artış meydana geldiği görülmüştür.

Pyriproxyfen ve *B. thuringiensis'* in tek başına ve karışım halindeki uygulamalarında total hemosit sayısında uygulamadan 24 saat sonra azalma, 48 ve 72 saat sonra ise artış meydana gelmiştir. Diferansiyel hemosit sayısı üzerine etkilerinde ise, prohemosit, plazmatosit, granülosit, sferülosit ve önositoid sayılarında pyriproxyfen ve *B. thuringiensis* uygulamasına ve uygulama zamanına bağlı olarak artış ve azalmalar meydana geldiği belirlenmiştir. Toksik maddelere maruz kalan böcek türlerinde hemosit sayılarındaki artış ve azalmaların hemolenfte toksisiteye bağlı olarak meydana gelen melanizasyon, enkapsülasyon ve fagositoz gibi savunma mekanizmaları neden olmaktadır. Ayrıca, böceklerdeki endokrin hormonların hemosit populasyonlarını ve bu hücrelerin farklılaşmasını düzenlediği de bilinmektedir.

Son yıllarda özellikle çevresel kimyasallar kullanılarak yapılan toksikolojik çalışmalarda omurgasız türleri tercih edilmektedir. Yapılan birçok çalışmada, omurgasızların toksikolojik çalışmalarda kullanılmasıyla, insan akut toksisite çalışmaları için iyi bir yol gösterici olduğu ortaya konmuştur. Bazı böcek türlerinin, laboratuvar koşullarında kolay üretiminin yapılabilmesi, maliyetin düşük olması, etik ve legal sorunlara yol açmaması gibi nedenlerden dolayı tıp alanındaki çalışmalarda da sıklıkla tercih edilmektedir. Özellikle immünolojik çalışmalarda, Lepidoptera ordosuna ait türlerin memeliler ile benzer doğal bağışıklık sistemine sahip olması, bu türlerin tercih edilmesine neden olmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma ile, *B. thuringiensis'* in pyriproxyfen gibi böceklerde immun sistemi baskılayıcı etkisi olan ve sadece hedef türler üzerinde etkili olan insektisitlerle karışım halinde uygulanması, hem son yıllarda *B. thuringiensis'* e karşı gelişen direncin önüne geçilmesini sağlayacak hem de insektisitlerin düşük dozlarda kullanımı ile çevreye ve insan sağlığı üzerinde olumlu etkiler yaratacaktır. Ayrıca, bundan sonra yapılacak genetik ile ilgili

çalışmalarda direnç genlerinin tespit edilmesine ve insektisitlere karşı gelişen direnç mekanizmalarının belirlenmesinde, kullanılan sinerjistik maddeler ile yapılacak diğer çalışmalara da yol gösterecektir. Bunun yanı sıra, bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile tıp alanında *G. mellonella* türü ile yapılacak immünolojik çalışmalara da ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

Abd El-Aziz, N.M., 2010. Physiological and Cytological Effects of Abamectin in the Desert Locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acridiidae). Egyptian Journal of Biological Pest Control, 20(1):35-41.

Abd El-Aziz, N.M., 2015. Detoxification System in *Spodoptera littoralis* against Abamectin. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, 4(6):4219-4228.

Abd El-Aziz N.M., Awad H.H., 2010. Changes in the Haemocytes of *Agrotis ipsilon* Larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in Relation to Dimilin and *Bacillus thuringiensis* Infections. Micron, 41:203-209.

Aebi H., 1984. Catalase in Vitro. Methods in Enzymology, 105:121-126.

Agosin, M., 1985. Role of Microsomal Oxidations in Insecticide Degradation". G.A. Kerkut, L.I. Gilbert (Eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, Vol. 12, Pergamon, New York, s. 647-712

Ahmad, S., 1995. Antioxidant Mechanisms of Enzymes and Proteins. In: Ahmad, S. (Ed.), Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. Chapman and Hall, New York, s. 238-272.

Ahmad, S., Beilsen, M.A., Pardini, R.S., 1989. Glutathione Peroxidase Activity in Insects: A Reassessment. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 12:31-49.

Akai, H., Sato, S., 1971. An Ultrastructural Study of the Haemopoietic Organs of the Silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Physiology, 17:1665-1676.

Ali, A.D., Bakry, N.M., Abdellatif, M.A., El-sawaf, S.K., 1973. The Control of Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L., by Chemicals I. Susceptibility of the Wax Moth Larvae and Honey-Bee Workers to Certain Chemicals. Journal Applied of Entomology, 74:170-177.

Alon, M., Alon, F., Nauen, R., Morin, S., 2008. Organophosphates Resistance in the Biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is Associated with a Point Mutation in an Ace1-type Acetylcholinesterase and Overexpression of Carboxylesterase". Insect Biochemistry and Molecular Biology, 38:940–949.

Altuntaş, H., 2015. Determination of Giberellic acid (GA3)-Induced Oxidative Stress in a Model Organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). Environmental Entomology, 44(1):100-105.

An, C., Ishibashi, J., Ragan, E.J., Jiang, H., Kanost, M.R., 2009. Functions of Manduca Sexta Hemolymph Proteinases HP6 and HP8 in Two İnnate İmmune Pathways. Journal of Biological Chemistry, 284:19716-19726.

An, C., Budd, A., Kanost, M.R., Michel, K., 2011. Characterization of a Regulatory Unit That Controls Melanization and Affects Longevity of Mosquitoes. Cellular and Molecular Life Sciences, 68:1929-1939.

Anane, R., Creppy E.E., 2001. Lipid Peroxidation as Pathway of Aluminium Cytotoxicity in Human Skin Fibroblast Cultures: Prevention by Superoxide Dismutase, Catalase and Vitamins E and C. Human and Experimantal Toxicology, 20:477-481.

Anazawa, Y., Tomita, T., Aiki, Y., Kozaki, T., Konoa, Y., 2003. Sequence of a cDNA Encoding Acetylcholinesterase from Susceptible and Resistant Two-spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33:509-514.

Anderson, R.S., Burreson, E.M., Paynter, K.T., 1995. Defense Responses of Haemocytes Withdrawn from *Crassostrea virginica* Infected with *Perkinsus marinus.* Journal of Invertebrate Pathology, 66:82-89.

Arnold, J.W., Hinks, C.F., 1976. Haemopoiesis in Lepidoptera. I. The Multiplication of Circulating Haemocytes. Canadian Journal of Zoology, 54:1003-1012.

Ashida M., Ochiai M., Niki, T., 1988. Immunolocalization of Prophenoloxidase among Hemocytes of Silkworm *Bombyx mori*. Tissue&Cell, 20:599-610.

Aslantürk, A., Kalender, S., Uzunhisarcıklı, M., Kalender, Y., 2011. Effects of Methidathion on Antioxidant Enzyme Activities and Malondialdehyde Level in Midgut Tissues of *Lymantria dispar* (Lepidoptera) Larvae. Journal of Entomological Research Society, 13(3):27-38.

Attique, M.N.R., Khaliq, A., Sayyed, A.H., 2006. Could Resistance to Insecticides in *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae) beovercome by Insecticide Mixtures. Journal of Applied Entomology, 130:122-127.

Ay, R., Yorulmaz, S., 2009. Bifenthrin'e Dirençli *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de Çoklu Direnç, Direnç Kalıtımı ve Sitokrom P450 Aktivitesinin Belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 49(2):67-78.

Ayaad, T.H., Dorrah, M.A., Shaurub, E.H., El-Sadawy, H.A., 2001. Effects of the Entomopathogenic Nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 and Azadirachtin on the Immune Defense Response and Prophenoloxidase of *Parasarcophaga surcoufi* Larvae (Diptera: Sarcophagidae). Journal of the Egyptian Society of Parasitology, 31(1):295-325.

Bakr, R.F.A., Abd Elaziz, M.F., El-barky, N.M., Awad, M.H., Abd El-Halim, H.M.E., 2013. The Activity of Some Detoxification Enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae (Lepidoptera: Noctuidae) Treated with Two Different Insect Growth Regulators. Egyptian Academic Journal of Biological Science, 5(2):19-27.

Banerjee, B.D., Seth, V., Ahmed, R.S., 2001. Pesticide-İnduced Oxidative Stress: Perspectives and Trends. Review of Environmental Health, 16(1):1-40

Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pahsa, S.T., Chakraborty, A.K., 1999. Biochemical Effects of Some Pesticides on Lipid Peroxidation and Free-Radical Scavengers. Toxicology Letters, 107:33-47

Bar-Or, D., Rael, L.T., Lau, E.P., Rao, N.K.R., Thomas, G.W., Winkler, J.V., Yukl, R.L., Kingston, R.G., Curtis, C.G., 2001. An Analog of the Human Albumin N-terminus (Asp-Ala-His-Lys) Prevents Formation of Copper-Induced Reactive Oxygen Species. Biochemical and Biophysical Research Communications, 284:856-862.

Barcic, I.J., Bazok, R., Bezjak, S., Culjak, T.G., Barcic, J., 2006. Combination of several insecticides used for integrated control of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Say., Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of Pest Science, 79: 223–232.

Beckage, N., 2008. Insect ımmunology. Elsevier Inc., s. 360.

Beaulaton, J., 1979. Hemocytes and Hemocytopoiesis in Silkworms. Biochimie, 61:157-164.

Beutler, E., 1989. Nutritional and Metabolic Aspects of Glutathione. Annual Review of Nutrition, 9:287-302.

Bi, J.L.G., Felton, W., 1995. Foliar Oxygen Stress and Insect Herbivory: Primary Compounds, Secondary Metabolites, and Reactive Oxygen Species as Components of Induced Resistance. Journal of Chemical Ecology, 21:1511-1530.

Bitsadze, N., Jaronski, S., Khasdan, V., Abashidze, E., Abashidze, M., Latchininsky, A., Samandashvili, D., Rippa, M., Ishaaya, I., Horowitz, A.R., 2013. Joint Action of *Beauveria bassiana* and the Insect Growth Regulators Diflubenzuron Novaluron, on the Migratory Locust, *Locusta migrtoria*. Journal of Pest Science, 86(2):293-300.

Blandin, S., Levashina, E.A., 2004. Thioester-Containing Proteins and Insect Immunity. Molecular Immunology, 40:903-908.

Bohn, H., Barwig, B., 1984. Hemolymph Clotting in the Cockroach *Leucophaea maderae* (Blattaria). Influence of Ions and Inhibitors; Isolation of the Plasma Coagulogen. Comparative Physıology Part B, 154:457-467.

Bokov, A., Chaudhuri, A., Richardson, A., 2004. The Role of Oxidative Damage and Stress in Aging. Mechanisms of Ageing and Development, 125:811-826.

Boşgelmez A., Çakmakçı L., Gürkan B., Gürkan F., Çetinkaya G., 1983. Büyük Mum Güvesi *Galleria mellonella* (L.) (Lep.: Galleridae) Üzerinde *Bacillus thurigiensis*'in Etkisi. Mikrobiyoloji Bulletin, 17(4):233-242.

Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, 72:248-254.

Bravo, A., Gill, S.S., Soberon, M., 2005. *Bacillus thuringiensis*: Mechanisms and Use (L.I. Gilbert, I. Kostas, S.S. Gill Ed.), Comprehensive Molecular Insect Science, Elsevier, Amsterdam, s. 175-205.

Brehelin, M., Zachary, D., 1986. Insect Haemocytes, a New Classification to Rule Out Controversy. In Immunity in Invertebrates (M. Brehelin, Ed.), Springer Verlag, Berlin, s. 36-48.

Broderick, N.A., Raffa, K.F., Handelsman, J., 2010. Chemical Modulators of the Innate Immune Response Alter Gypsy Moth Larval Susceptibility to *Bacillus thuringiensis.* BMC Microbiology, 10:129.

Bronksil, J.F., 1961. A Cage to Simplify the Rearing of The Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). Journal of Lepidopteran Society, 102-104.

Brun, A., Cuany, A., LeMouel, T., Berge, J., Amichot, M., 1996. Inducibility of the *Drosophila melanogaster* Cytochrome P450 Gene, CYP6A2, by Phenobarbital in Insecticide Susceptible or Resistant Strains. Insect Biochemistry and Moleculer Biology, 26:697-703.

Burges, H.D., Bailey, L., 1968. Control of the Greater and Lesser Wax Moths (*Galleria mellonella* and *Achroia grisella*) with *Bacillus thuringiensis.* Journal of Invertebral Pathology, 11:184-195.

Büyükgüzel, E., 2009. Evidence of Oxidative and Antioxidative Responses by *Galleria mellonella* Larvae to Malathion. Journal of Economic Entomology, 102(1):152-159.

Callaghan, A., 1991. Insecticide resistance: mechanism and detection methods. Scientific Progress, Edinburhg, 75:423-438.

Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretti, G., Landriscina, C., 2004. Rat Liver Glutathione S-transferase Activity Stimulation Following Acute Cadmium of Manganese Intoxication. Toxicology, 200:29-38

Cerenius, L., Lee, B.L., Soderhall, K., 2008. The ProPo-System: Pros and Cons for its Role in Invertebrate Immunity. Trends Immunology, 29:263-271.

Chain, B.M., Anderson, R.S., 1982. Selective Depletion of the Plasmatocytes in *Galleria mellonella* Following Injection of Bacteria. Journal of Insect Physiology, 28:377-384.

Chapman, R.F., 1998. The Insects: Structure and Function, Cambridge University Press, Cambridge, s. 770.

Chattopadhyay, A., Bhatnaga, N.B., Bhatnagar, R., 2004. Bacterial Insecticidal Toxins. Critical Reviews in Microbiology, 30:33-54.

Christensen, B.M., Li, J., Chen, C.C., Nappi, A.J., 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. Trends Parasitology, 21:192–199.

Chu, F.L.E., La-Peyre, J.F., Burreson, C.S., 1993. *Perkinsus marinus* Infection and Potential Defense-Related Activities in Eastern Oysters, *Crassostrea virginica*: Salinity Effect. Journal of Invertebral Pathology, 62:226-232.

Cloyd, R.A., 2010. Pesticide Mixtures, Chapter 5. http://www.intechopen.com/source/pdfs/13005/InTechPesticide_mixtures.pdf (Erişim tarihi: 13.06.2017).

Cociancich, S., Dupont, A., Hegy, G., Lanot, R., Holder, F., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Bulet, P., 1994. Novel Inducible Antibacterial Peptides from a Hemipteran Insect, the Sap-Sucking Bug *Pyrrhocoris apterus*. Journal of Biochemistry, 300:567-575

Constant, R.H., Roush, R.T., 1990. Resistance Detection and Documentation: The Relative Roles of Pesticidal and Biochemical Assays. Pesticide Resistance in Arthropods (Roush and Tabashnik, Ed.). Chapman and Hall, New York, s. 303.

Cormick, D.B., Greene, H.L., 1999. Vitamins in Burtis C.A., Aswood, E.R. Tietz, Textbook of Clinical Chemistry. Saunders Company, Chapter 29: 1000.

Cornelis, L., Soderhall, K., 2004. The Prophenoloxidse-Activating System in Invertebrates. Immunologıcal Revıews, 198:116-126.

Crowder, D.W., Dennehy, T.J., Ellers-kirk, C., Yafuso, C.M., Ellsworth, P.C., Tabashnik, B.E., Carrie`re, Y., 2007. Field Evaluation of Resistance to Pyriproxyfen in *Bemisia tabaci* (B Biotype). Journal of Economical Entomology, 100:1650-1656.

Çakır, Ş., Yamanel, Ş., 2005. Böceklerde İnsektisitlere Direnç. Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi, 6(1): 21-29.

Çaylak, E., 2011. Hayvan ve Bitkilerde Oksidatif Stres ile Antioksidanlar. Tıp Araştırmaları Dergisi, 9(1):73-83.

Çelik, D., 2014. Konağa Verilen İndol-3-Asetik Asit'in Konak *Achoria grisella* Fabricus, 1794 (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae) Hemositlerine Etkisi. Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli.

Darriet, F., Corbel, V., 2006. Laboratory Evaluation of Pyriproxyfen and Spinosad, Alone and in Combination, against *Aedes aegyptii* Larvae. Journal of Medical Entomology, 43:1190-1194.

Dean, P., Potter, U., Richards, E.H., Edwards, J.P., Charnley, A.K., Reynolds, S.E. 2004. Hyperphagocytic Haemocytes in *Manduca sexta.* Journal of Insect Physiology, 50(11):1027-1036.

De Block, M., Stoks, R., 2008. Compensatory Growth and Oxidative Stress in a Damselfly. Proceedıngs of The Royal Socıety of London Serıes B-Biological Sciences, 275:781-785.

Demirbağ, Z., Nalçacıoğlu, R., Katı, H., Demir, İ., Sezen, K., Ertürk, Ö., 2008. Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele. Esen Ofset matbaacılık, Trabzon.

Dere, B., Altunta, H., Nurullahoğlu, Z.U., 2015. Insecticidal and Oxidative Effects of Azadirachtin on the Model Organism *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 89(3):138-152.

Dorval, J., Hontela, A., 2003. Role of Glutathione Redox Cycle and Catalase in Defense against Oxidative Stress Induced by Endosulfan in Adrenocortical Cells of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Toxicology and Applied Pharmacology, 192:191-200

Dubovskiy, I.M., Martemyanov, V.V., Vorontsova, Y.L., Rantala, M.J., Gryzanova, E.V., Glupov, V.V., 2008. Effect of Bacterial Infection on Antioxidant Activity and Lipid Peroxidation in the Midgut of *Galleria mellonella* L. Larvae (Lepidoptera: Pyralidae). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 148:1-5.

Dubovskiy, I.M., Yaroslavtseva, O.N., Kryukov, V.Y., Benkovskaya, G.V., Glupov, V.V., 2013. An Increase in the Immune Systm Activity of the Wax Moth *Galleria mellonella* and of the Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* under Effect of Organophosphorus Insecticide. Comparative and Ontogenic Physiology, 49(6): 592-596.

Durmuş, Y., 2007. Sodyum tetraboratın Büyük Bal Mumu Güvesi *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nin Yaşama, Gelişimi ve Bazı Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine Etkisi. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.

Egaas, E., Sandvik, M., Fjeld, E., Ka¨llqvist, T., Goksoyr, A., Svensen, A., 1999. Some Effects of the Fungicide Propiconazole on Cytochrome P450 and Glutathione S-transferase in Brown Trout (*Salmo trutta*). Comparative Biochemistry and Physiology, 122:337-344.

Egaas, E., Svendsen, N.O., Kobro, S., Skaare, J.U., 1992. Glutathione S-transferases in Endosulfan-Treated Red Sword Grass Moth (*Xylena vetusta* Hb.) and Hebrew Character Moth (*Orthosia gothica* L.) Reared on Leaves from Apple (*Malus domestica* cult.) or Willow (*Salix caprea* L.). Comparative Biochemistry and Physiology, 101(C):143-150.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. Biochemical Pharmacology, 7:88-95.

Er, A., Keskin, M., 2016. Influence of abscisic acid on the biology and hemocytes of the model insect *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Annals of the Entomological Society of America, 19(2): 244-251.

Erdem, M., Büyükgüzel, E., 2015. The Effects of Xanthotoxin on the Biology and Biochemistry of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 89(49):193-203.

Ericsson, J.D., Janmaat, A.F., Lowenberger C., Myers, J.H., 2009. Is Decreased Generalized Immunity a Cost of Bt Resistance in Cabbage Loopers *Trichoplusia ni*. Journal of Invertebral Pathology, 100:61-67

Esterbauer, H., Schaur R.J., Zollner H., 1991. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. Free Radical Biology and Medicine, 11:81-128.

Fahmy, N.M., 2012. Impact of Two Insect Growth Regulators on the Enhancement of Oxidative Stress and Antioxidant Efficiency of the Cotton Leaf Worm, *Spodoptera littoralis* (Biosd.), Egyptian Academical Journal of Biological Science, 5(1):137-149.

Felton, G.W., Summers, C.B., 1995. Antioxidant Systems in Insects. Archieves of Insect Biochemistry, 29:187-197.

Ferré, J., Real, M.D., Van Rie, J., Jansens, S., Peferoen, M., 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* Bioinsecticide in a Field Population of *Plutella xylostella* is Due to a Change in a Midgut Membrane Receptor. Proceedings of the National Academical Science, USA, 88:5119-5123.

Frutos, R., Rang, C., Royer, M., 1999. Managing Insect Resistance to Plants Producing *Bacillus thuringiensis* Toxins. Critical Reviews in Biotechnology, 19:227-276.

Gallagher, E.P., Sheehy, K.M., 2000. Altered Glutathione S-transferase Catalytic Activities in Female Brown Bullheads from a Contaminated Central Florida Lake Marine. Environmental Research, 50:399-403.

Garcia-Lara, J., Needham, A.J., Foster, S.J., 2005. Invertebrates as Animal Models for *Staphylococcus aureus* Pathogenesis: a Window into Host-Pathogen Interaction. Fems Immunology and Medical Microbiology, 43:311-323.

Gardiner, E.M.M., Strand, M.R. 1999. Monoclonal Antibodies Bind Distinct Classes of Hemocytes in the Moth *Pseudoplusia includens*. Journal of Insect Physiology, 45:113-126.

Gardiner, E.M.M., Strand, M.R. 2000. Hematopoiesis in Larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. Archives of Insect Biochemıstry and Physiology, 43:147-164.

Garvey,K.K.,2014.http://ucanr.edu/blogs/bugsquad/index.cfm?tagname=Galleria%20Mellonella.

Gelbič, I., Strbáčkova, J., Berger, J., 2005. Influence of Metyrapone on the Morphology of Hemocytes of the Egyptian Cotton Leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd). Zoological Studies, 45(3):371-377.

Ghasemi, V., Moharramipor, S., Sendi, J.J. 2014. Impact of Pyriproxyfen and Methoxyfenozide on Hemocytes of the Mediterranean Flour Moth, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Crop Protection, 3(4):449-458.

Ghoneim, K., Tanani, M., Hamadah, K., Basiouny, A., Waheeb, H., 2015. Effects of Novaluron and Cyromazine, Chitin Synthesis Inhibitors, on the Larval Hemogram of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). International Journal of Advanced Research, 3(1):554-576

Gillespie, J.P, Kanost, M.R., Trenczek, T., 1997. Biological Mediators of Insect Immunity. Annual Review of Entomology, 42:611-643.

Giulianini, P.G., Bertolo, F., Battistella, S., Amirante, G.A., 2003. Ultrastructure of the Hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* Larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): Involvement of Both Granulocytes and Oenocytoids in Vivo Phagocytosis. Tissue Cell, 35:243-251.

Gomes, T., 2012. Effects of Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytılus galloprovincialis.* Universidade do Algarve, Faculdade De Ciências E Tecnologia.

Gonzalez-Reya, M., Mattos, J.J., Piazza, C.E., Bainy, A.C.D., Bebianno, M.J., 2014. Effects of Active Pharmaceutical Ingredients Mixtures in mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology, 153:12-26.

Götz, L.P., Boman, H.G., 1985. Insect immuniry. in: (Kerkur, G. A. & Gilbert, L. Ed). Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Pergamon Press, London, 3:453-485.

Greenwald, R.A., 1985. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. CRC Press: Boca Raton, Florida, United States of America, s. 447.

Grizanova, E.V., Dubovskiy, I.M., Whitten, M.M., Lupov, V.V., 2014. Contributions of cellular and humoral immunity of *Galleria mellonella* larvae in defence against oral infection by *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology, 119: 40-46.

Gupta, A.P., 1985. Cellular Elements in Hemolymph. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, (G. A. Kerkut, L. I. Gilbert, Ed.), Pergamon Press, Oxford 3:401-451.

Gupta, A.P., 1991. Insect Immunocytes and Other Hemocytes: Role in Cellular and Humeral Immunity. In: Immunology of Insects and other Arthopods. CRC Press, Boca Raton, s. 19-118.

Gümüş, E., Turanlı, F., 2012. Salkım Güvesi *Lobesia botrana* Den.& Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae)' nın Savaşımında Bazı Biyopestisitler ve Karışımlarının Etkinliklerinin Incelenmesi. Ege Üniv. Ziraat Fak. Dergisi, 49(2):119-125.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferases, The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. Journal of Biological Chemistry, 249:7130-7139.

Halliwell, B., 1994. Free Radicals, Antioxidant, and Human Disease: Curiosity, Cause or Consequence. The Lancet, 344:721-724.

Halliwell, B., 1997. Antioxidants and Human Disease: A General Introduction. Nutrition Reviews, 55:44-49.

Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed., Oxford, New York, s. 944.

Hammock, B.D., 1975. NADPH Dependant Epoxidation of Methyl Farnesoate to Juvenile Hormone in the Cockroach. Life Science, 17(3):323-328.

Hassall K.A., 1990. The Biochemistry and Uses of Pesticides. Second Eddition. VCH, New York, s. 536.

Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione Transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45:51-88

Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1996. The Glutathione S-transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 30:445-600.

Heinle, H., Betz, E., 1994. Effects of Dietary Garlic Supplementation in Rat Model of Atherosclerosis. Arzneimittelforschung, 44:614-617.

Hephızlı, P., 2011. Kırmızı Örümcek Avcısı *Stethorus gilvifrons* (Muls.)'un Farklı Irklarının Bazı İnsektisit ve Akarisitlere Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı.

Hephızlı, P., Kumral, N.A., 2012. Farklı *Stethorus gilvifrons* (Coleoptera: Coccinellidae) Popülasyonlarının Bazı Insektisit ve Akarisitlere Duyarlılıkları ve Enzimatik Özelliklerinin Saptanması. Türkiye Entomoloji Dergisi, 36(4):573-586.

Higbee, B.S., Horton, D.R., Krysan, J.L., 1995. Reduction of Egg Hatch in *Pear psylla* (Homoptera: Psyllidae) After Contact by Adults with Insect Growth Regulators. Journal of Economic Entomology, 88(5):1420-1424.

Hillyer, J.F., 2016. Insect Immunology and Hematopoiesis. Developmental and Comparative Immunology, 58:102-118.

Hillyer, J.F., Christensen, B.M., 2002. Characterization of Hemocytes from the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. Histochemistry and Cell Biology, 117:431-440.

Hillyer, J.F., Christensen, B.M., 2005. Mosquito Phenoloxidase and Defensin Colocalize in Melanization Innate Immune Responses. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 53:689-698.

Hillyer, J.F., Schmidt, S.L., Christensen, B.M., 2003a. Hemocyte-mediated Phagocytosis and Melanization in the Mosquito *Armigeres subalbatus* Following Immune Challenge by Bacteria. Cell and Tissue Research, 313:117-127.

Hillyer, J.F., Schmidt, S.L., Christensen, B.M., 2003b. Rapid Phagocytosis and Melanization of Bacteria and *Plasmodium sporozoites* by Hemocytes of the Mosquito *Aedes aegypti*. Journal of Parasitology, 89:62-69.

Hillyer, J.F., Schmidt, S.L., Fuchs, J.F., Boyle, J.P., Christensen, B.M., 2005. Age-associated Mortality in Immune Challenged Mosquitoes (*Aedes aegypti*) Correlates with a Decrease in Haemocyte Numbers. Cell Microbiology, 7:39-51.

Hinks, C.F., Arnold, J.W. 1977. Haemopoiesis in Leptidoptera II, The Role of Haemopoietic Organs. Canadian Journal of Zoology, 55:1740-1755.

Hodgson, E., 1985. Microsomal mono-oxygenases. (Kerkut, G.A., Gilbert, L.C. Ed), Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology, Pergamon Press, Oxford, 11:647–712.

Hoffmann, J.A., 1995. Innate immunity of insects. Current Opinion in Immunology 7:4-10.

Hoffmann, J.A., Janeway, C.A. Jr., Natori, S., 1994. Phylogenetic Perspectives in Immunology: The Insect Host Defense, R.G. Landes Company, Austin.

Hollingworth, R.M., Dong, K., 2008. The Biochemical and Molecular Genetic Basis of Resistance to Pesticides in Arthropods. (Global Pesticide Resistance in Arthropods, Ed: Whalaon, M.E., Mota-Sanchez, D. and Hollingworth, R.M.), Cromwell, UK, 40-90

Horohov, W., Dunn, P.E., 1982. Changes in the Circulating Hemocyte Population of *Manduca sexta* Larvae Following Injection of Bacteria. Journal of Invertebrate Pathology 40:327-339.

Huang, F., Buschman, L.L., Higgins, R.A., Mc-Gaughey, W.H., 1999. Inheritance of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin (Dipel ES) in the European Corn Borer. Science, 284:965-967.

Huang, Q., Zhang, L., Yang, C., Yun, X., He, Y., 2016. The Competence of Hemocyte Immunity in the Armyworm *Mythimna separata* Larvae to Sublethal Hexaflumuron Exposure. Pesticide Biochemistry and Physiology, 130:31-38.

Hunt, D.W.A., Smirle, M.J., 1988. Partial Inhibition of Pheromone Production in *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae) by Polysubstrate Monooxygenase Inhibitors. Journal of Chemical Ecology, 14:529-536.

Hyrsl, P., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., 2007. The Effects of Boric acid-Induced Oxidative Stress on Antioxidant Enzymes and Survivorship in *Galleria mellonella*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 66:23-31.

Imler, J.L., Bulet, P., 2005. Antimicrobial Peptides in Drosophila, Structures, Activities and Gene Regulation. In Mechanisms of Epithelial Defense (D. Kabelitz and J. M. Schroder, Ed.), Karger, Basil, 86:1-21.

Irving, P., Ubeda, J., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J., Hetru, C., Meister, M., 2005. New Insights into Drosophila Larval Haemocyte Functions Through Genomewide Analysis. Cellular Microbiology, 7:335-350.

Ishaaya, I., Horowitz, A.R., 1992. Novel Phenoxy Juvenile Hormone Analog (Pyriproxyfen) Suppresses Embryogenesis and Adult Emergence of the Sweet Potato Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). Journal of Economical Entomology, 85(6):2113-2117.

Işçi, M., Ay, R., 2017. Determination of Resistance and Resistance Mechanisms to Thiacloprid in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) Populations Collected from Apple Orhards in Isparta Province, Turkey. Crop Protection, 91:82-88.

James, R.R., Xu, J., 2012. Mechanisms by Which Pesticides Affect Insect Immunity. Journal of Inverterbrate Pathology, 109(2):175-182.

Jones, J.C., 1962. Current Concepts Corncerning Insect Hemocytes. American Zoology, 2:209-246.

Jung, C, Kim, Y., 2006. Potentiating Effect of *Bacillus thuringiensis* ssp. kurstaki on Pathogenicity of Entomopathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophila* K1 against Diamondback Moth, *Plutella xylostella*. Journal of Economic Entomology, 100:246-250.

Kale, M.N., Rathore, S.J., Bhatnagar, D., 1999. Lipid Peroxidative Damage on Pyrethroid Exposure and Alteration in Antioxidant Status in Rat Erythrocytes: A Possible Involvement of Reactive Oxygen Species. Toxicology Letters, 105(3):197-205.

Kanost, M.R., Jiang, H., Yu, X.Y., 2004. Innate Immune Responses of a Lepidopteran Insect, *Manduca sexta*. Immunologıcal Reviews, 198:97-105.

Karatolos, N., Williamson, M.S., Denholm, I., Gorman, K., Konstant, R.H., 2012. Over-expression of a Cytochrome P450 is Associated with Resistance to Pyriproxyfen in the Greenhouse Whitefly *Trialeurodes vaporariorum*". Plos One, 7(2):31077.

Kavanagh, K., Reeves, E.P., 2004. Exploiting the Potential of Insects for in Vivo Pathogenicity Testing of Microbial Pathogens. FEMS Microbiology Reviews, 28:101-112.

Keramati, V., Shahla, J., Ramin, M., 2010. Effect of Diazinon on Catalase Antioxidant Enzyme Activity in Liver Tissue of *Rutilus rutilus*. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 5(5):368-376.

Khvoschevskay, M.F., Dubovskiy, I.M., Glupov, V.V., 2004. Changes in Superoxide Dismutase Activity in Various Larval Organs of Greater Wax Moth (*Galleria mellonella* L., Lepidoptera: Pyralidae) Induced by Infection with *Bacillus thuringiensis* ssp. galleriae. Biology Bulletin, 6:613-619.

Kim, Y., Jung, S., Madanagopal, N., 2008. Antagonistic Effect of Juvenile Hormone on Hemocyte-Spreading Behavior of *Spodoptera exigua* in Response to an Insect Cytokine and Its Putative Membrane Action. Journal of Insect Physiology 54(6):909-915.

Konuş, M., 2015a. Malathion Resistance Mediated by Detoxificatıon Enzymes in *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae). Fresenius Environmental Bulletin, 24(6a):2146-2151

Konuş, M., 2015b. Effects of Oxidative Stress on Xenobiotic Metabolizing Enzymes in *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Turkish Journal of Biochemistry, 40(2):175-180

Krautz, R., Arefin, B., Theopold, U., 2014. Damage Signals in the Insect Immune Response. Frontiers in Plant Science, 5:342.

Kryukov, V.Y., Yaroslavseva, O.N., Surina, E.V., Tyurin, M.V., Dubovskiy, I.M., Glupov, V.V., 2015. Immune Reactions of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) Larvae Under Combined Treatment of the Entomopathogens *Cordyceps militars* (L.: Fr.) Link and *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Ascomycota, Hypocreales). Entomological Review, 95(6):693-698.

Kumova, U., Korkmaz, A., 2002. Peteklerin BüyükBal Mumu Güvesi (*Galleria mellonella* L.) 'ne Karşı Korunması Üzerine Bir Araştırma. Türkiye 3. Arıcılık Kongresi, Adana.

Kwon, S., Kim, Y., 2007. Immunosuppressive Action of Pyriproxyfen, a Juvenile Hormone Analog, Enhances Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki against Diamond- Back Moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). Biological Control, 42:72-76.

Lackie, A.M., 1988. Haemocyte Behaviour. Advances in Insect Physıology, 21:85-178.

Lardinnois, O.M., 1995. Reactions of Bovine Liver Catalase with Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide. Free Radical Research, 22:251-274.

Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect Hemocytes and Their Role in Cellular Immune Responses. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32:1237-1242.

Lawrence, R.A., Burk, R.F., 1976. Glutathione Peroxidase Activity in Selenium-Deficient Rat Liver. Biochemical and Biophysical Research Communications, 71(4):952-958

Lee, Y.W., Zairi, J., Yap, H.H., Adanan, C.R. 2005. Integration of *Bacillus thuringiensis* H-14 Formulations and Pyriproxyfen for the Control of Larvae of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Journal of American Mosquito Control Association, 21:84-89.

Lee, K.P., Cory, J.S., Wilson, K., Raubenheimer, D., Simpson, S.J., 2006. Flexible Diet Choice Offsets Protein Costs of Pathogen Resistance in a Caterpillar. Proceeding of Royal Society Biological Science, 273:823-829.

Levin, D.M., 2007. An Integrin Required for The Encapsulation Immune Response in the Tobacco Hornworm, *Manduca Sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae). Kansas State University, Manhattan, Kansas.

Levin, D.M., Breuer, L.N., Zhuang, S.F., Anderson, S.A., Nardi, J.B., Kanost, M.R. 2005. A Hemocyte-Specific Integrin Required for Hemocytic Encapsulation in the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35:369-380

Li, X.Z., Liu, Y.H., 2007. Diet Influences the Detoxification Enzyme Activity of *Bactrocera tau* (Walker) (Diptera： Tephritidae). Acta Entomologica Sinica, 50(10):989-995

Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R., Kiguchi, K., 2005. Hemocyte Differentiation in the Hematopoietic Organs of the Silkworm, *Bombyx mori*: Prohemocytes Have the Function of Phagocytosis. Cell Tissue Research, 320:535-543.

Liu, Y.B., Tabashnik, B.E., Dennehy, T.J., Patin, A.L., Bartlett, A.C., 1999. Development Time and Resistance to Bt Crops. Nature, 400:519.

Ma, W., Li, X., Dennehy, T.J., Lei, C., Wang, M., Degain, B.A., Nichols, R.L., 2010. Pyriproxyfen Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Biotype B: Metabolic Mechanism. Journal of Economical Entomology, 103(1):158-165.

Manachini, B., Arizza, V., Parrinello, D., Parrinello, N., 2011. Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and Their Response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus* thuringiensis. Journal of Inverterbrate Pathology, 106:360-365

Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger F., 2005. The Point About Oxidative Stress in Molluscs. Invertebrate Survival Journal, 2:91-104.

Mano, T., Sinohara, R., Sawai, Y., Oda, N., Nishida, Y., Mokumo, T., Asano, K., Ito, Y., Kotake, M., Hamada, M., 1995. Changes in Lipid Peroxidation and Free Radical Scavengers in the Brain of Hyperand Hypothyroid Aged Rats. Journal of Endocrinology, 147(2):361-5.

Manogem, E.M., Cheruparambath, P., Shibi, P., Arathi, S., Banu, A., 2016. Effect of Chitin Synthesis Inhibitor, Flufenoxuron on Haemocytes of *Spodoptera mauritia* (Boisd). (Lepidoptera: Noctuidae). International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences, 6(1): 68-75.

Martinez, C., Porkar, M., Lopez, A., Escudero, I.R., Perez-Larena, J., F., Caballero, P., 2004. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* Strain with a Broad Spectrum of Activity aganist Lepidopteran Insects. Entomologia Experimentalis et Applicata, 111:71-77.

Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M., 1993. Molecular and Cellular Biology of Cholinesterases. Progress in Neurobiology, 41:31-91.

McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocuprein (Hemocuprein). Journal of Biological Chemistry, 244(22):6049-6055.

Menozzi, P., Shi, M.A., Lougarre, A., Tang, Z.H., Fournier, D., 2004. Mutations of Acetylcholinesterase Which Confer Insecticide Resistance in *Drosophila melanogaster* Populations. BMC Evolutionary Biology, 4(4):1-7.

Mirhaghparast, S.K., Zibaee, A., 2013. Effects of Hexaflumuron and Pyriproxyfen on the Purified Phenoloxidase of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae). Archievs of Phytopathology and Plant Protection, 46(15):1775-1784.

Mirhaghparast, S.K., Zibaee, A., Hoda, H., Sendi, J.J., 2015a. Changes in cellular immune responses of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) due to pyriproxyfen treatment. Journal of Plant Protection Research, 55(3): 287-293.

Mirhaghparast, S.K., Zibaee, A., Sendi, J.J., Hoda, H., Fazeli-Dinan, M., 2015b. Immune and metabolic responses of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) larvae to an insect growth regulator, hexaflumuron. Pesticide Biochemistry and Physiology, 125: 69-77.

Morton, D.B., Dunphy, G.B., Chadwich, J.S., 1987. Reactions of Hemocytes of Immune and Nonimmune *Galleria mellonela* Larvae to *Proteus mirabillis*. Developmental and Comparative Immunology, 11:47-55.

Muthusamy, R., Shivakumar, M.S., Karthi, S., Ramkumar, 2011. Pesticide Detoxifying Mechanism in Field Population of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from South India. Egyptian Academical Journal of Biological Science, 3(1):51-57.

Nakahara, Y., Kanamori, Y., Kiuchi, M., Kamimura, M., 2003. In Vitro Studies of Hematopoiesis in The Silkworm, Cell Proliferation in and Hemocyte Discharge from the Hematopoietic Organ. Journal of Insect Physiology, 49:907-916.

Nakahara, Y., Matsumoto, H., Kanamori, Y., Kataoka, H., Mizoguchi, A., Kiuchi, M., Kamimura, M., 2006. Insulin Signaling is Involved in Hematopoietic Regulation in an Insect Hematopoietic Organ. Journal of Insect Physiology, 52:105-111.

Nappi, A.J., Christensen, B.M., 2005. Melanogenesis and Associated Cytotoxic Reactions: Applications to Insect Innate Immunity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35:443-459.

Nardi, J.B., 2004. Embryonic Origins of the Two Main Classes of Hemocytes – Granular Cells and Plasmatocytes in *Manduca sexta*. Development Genes and Evolution, 214:19-28.

Nardi, J.B., Ujhelyi, E., Pilas, B., Garsha, K., Kanost, M.R., 2003. Hematopoietic Organs of *Manduca sexta* and Hemocyte Lineages. Development Genes and Evolution, 213:477-491.

Nordberg, J., Arner, E.S., 2001. Reactive Oxygen Species Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. Journal of Free Radicals in Biology & Medicine, 31:1287-1312.

Oliveira, A.C.B., Teixeira, V.W., Siqueira, H.A.A., Alves, T.J.S., Ribeiro, L.M.S., Teixeira, A.A.C., 2013. Immune response of *Alabama argillacea* (Hubner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) treated with formulations of *Bacillus thuringiensis* Berliner. Animal Biology, 63: 343–355.

Ordas, M.C., Ordas, A., Belosa, C. Figueras, A., 2000. Immune Parameters in Carpet Shell Clams Naturally Infected with *Perkinsus atlanticus*. Fish Shellfish Immunology, 10(7):597-609.

Oruç, E.Ö., Üner, N., 2000. Combined Effects of 2,4-Diamin and Azinphosmethyl on Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Liver of *Oreochromis niloticus.* Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 127:291-295.

Osta, M.A., Christophides, G.K., Vlachou, D., Kafatos, F.C., 2004a. Innate Immunity in the Malaria Vector *Anopheles gambiae*: Comparative and Functional Genomics. Journal of Experimental Biology, 207(15):2551-2563.

Osta, M.A., Christophides, G.K., Kafatos, F.C., 2004b. Effects of Mosquito Genes on Plasmodium Development. Science, 303:2030-2032.

Öncüer, C., Durmuşoğlu, E., 2008. Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları. Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, 28:464

Özden, S., 2006. Bazı Pestisidlerin Oksidatif Stres Oluşturma Potansiyellerinin ve Antioksidan Sistemler Üzerine Etkilerinin Sıçanlarda Araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı.

Öztürk, A.İ. 2001. Bal Arısı Hastalıkları. Muğla'da Tarım, 1(5):57-59.

Pandey, J.P., Tiwari, R.K., 2011. Neem Based Insecticides Interaction with Development and Fecundity of Red Cotton Bug, *Pysdercus cingulatus* Fab. International Journal of Agricultural Research, 6:335-346.

Papadimitriou, E., Loumbourdis, N.S. 2002. Exposure of The Frog *Rana ridibunda* to Copper: Impact on Two Biomarkers, Lipid Peroxidation, and Glutathione. Bulletin of Environmental Contamination of Toxicology, 69:885-891

Patton, R.L., 1983. Introductory Insect Physiology. W. B. Saunders Co. Philadelphia, s. 245.

Pech, L.L., Strand, M.R., 1995. Encapsulation of Foreign Targets by Hemocytes of the Moth *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera, Noctuidae) Involves an RGD-dependent Cell Adhesion Mechanism. Journal of Insect Physiology, 41:481-488.

Pottelberge, S.V.L., Amermaet K.V., 2008. Induction of Sitokrom P450 Monooksigenaz Activity in the Two Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae* and Its Influence on Acaricide Toxicity". Pesticide Biochemistry and Physiology, 91:128-133.

Prasada Rao, C.G., Ray, A., Ramamurty, P.S., 1984. Effects of Ligation and Ecdysone on Total Hemocyte Count in the Tobacco Caterpilar *Spodoptera litura* (Noctuidae: Lepidoptera). Canadian Journal of Zoology, 62:1461-1463.

Qiu, X., Tian, W.Y., Leng, X., 2003. Cytochrome P450 Monooxygenases in the cotton Bollworm (Lepidoptera: Noctuidae): Tissue Differences and Induction. Journal of Economical Entomolology, 96(4): 1283-1289.

Rachokarn, S., Piyasaengthong, N. ve Bullangpoti, V., 2008. Impact of Botanical Extracts Derived from Leaf Extracts *Melia azedarach* L. (Meliaceae) and *Amaranthus viridis* L. (Amaranthaceae) on Populations of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) and Detoxification Enzyme Activities. Communication in Agricultural Applied Biological Science, 73:451-457.

Rahimi, V., Zibaee, A., Mojahed, S., Maddahi, K., 2013. Effects of Pyriproxyfen and Hexaflumuron on Cellular Immunity of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Romanian Journal of Biology-Zoology, 58(2):151-162.

Ratcliffe, N.A., George, S.J., 1976. Cellular Defense Reactions of Insect Haemocytes in Vivo: Nodule Formation and Development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* Larvae. Journal of Inverterbrate Pathology, 28:373-382.

Ratcliffe, N.A., Gagen, S.J., 1977. Studies on the in Vivo Cellular Reactions of Insects: An Ultrastructural Analysis of Nodule Formation in *Galleria mellonella*. Tissue Cell, 9:73-85.

Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W., Rhodes, C.P., 1985. Invertebrate Immunity, Basic Concepts and Recent Advances. International Review of Cytology, 97:183-349.

Reed, J.R., Vanderwel, D., Choi, S., Pomonis, J.G., Reitz, R.C., Blomquist, G.J., 1994. Unusual Mechanism of Hydrocarbon Formation in the Housefly: Cytochrome P450 Converts Aldehyde to the Sexpheromone Component (Z)-9-Tricosene and CO2. Proceedings of the National Academical Science, USA, 91:10000-10004.

Reyes, M., Rocha, K., Alarcón, L., Siegwart, M., Sauphanor, B., 2012. Metabolic Mechanisms Involved in the Resistance of Field Populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to Spinosad. Pesticide Biochemistry and Physiology, 102:45-50.

Ribeiro, C., Brehelin, M., 2006. Insect Haemocytes: What Type of Cell Is What? Joornal of Insect Physiology, 52:417-429.

Ribeiro, C., Simoes, N., Brehelin, M., 1996. Insect Immunity: The Haemocytes of the Armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and Their Role in Defence Reactions, in Vivo and in Vitro Studies. Journal of Insect Physiology, 42:815-822.

Richards, E.H., Edwards, J.P., 1999. Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidade) by the Ectoparasitic Wasp *Eulophus pennicornis*: Effects of Parasitization, Venon and Starvation on Host Haemocytes. Journal of Insect Physiology, 45:1073-1083.

Rivers, D.B., Ruggiero, L., Hayes, M., 2002. The Ectoparatisitic Wasp *Nosonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalydae) Differentially Affects Cells Mediating the Immune Response of Its Flesh Fly Host, *Sacophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae). Journal of Insect Physiology, 48:1053-1064.

Rizwan-ul- Haq, M., Hu, Q.B., Hu, M.Y., Lin, Q.S., Zhang, W.L., 2009. Biological Impact of Harmaline, Ricinine and Their Combined Effects with *Bacillus thurngiensis* on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Pest Science, 82:327-334.

Rolff, J., Siva-Jothy, M.T., 2002. Copulation Corrupts Immunity: A Mechanism for a Cost of Mating in Insects. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 99:9916-9918.

Root, A.I., 1972. The ABC and XYZ of Bee Culture. Root Company, Medina, Ohio, USA, s. 703

Rose, R., Barbhaiya, L., Roe, R., Rock, G., Hodgson, E., 1995. Cytochrome P-450-Associated Insecticide Resistance and the Development of Biochemical Diagnostic Assays in *Heliothis virescens*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 51:178-191.

Rose, R.L., Gould, F., Levi, P.E., Hodgson, E., 1991. Differences in Cytochrome-P450 Activities in Tobacco Budworm Larvae As Influenced by Resistance to Host Plant Allelochemicals and Induction. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology, 99(3):535-540.

Rosenberger, C.R., Jones, J.C., 1960. Studies on Total Blood Cell Counts of the Southern Armyworm Larva, *Prodenia eridania* (Lepidoptera). Annals of the Entomological Society of America, 53(3):351-355.

Rowley A. F., Ratcliffe N.A., 1981. Insects, In: Invertebrate Blood Cells, 3, Academic Press, London.

Russo, J., Brehélin, M., Carton, Y., 2001, Haemocyte Changes in Resistant and Susceptible Strains of *D. melanogaster* Caused by Virulent and Avirulent Strains of the Parasitic Wasp *Leptopilina boulardi*. Journal of Insect Physiology, 47:167-172.

Sanford, M.T., 2003. Controlling Wax Moth, One of a Series of the Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

Saraswathy, S.D., Suja, V., Gurumurthy, P., Shyamala Devi, C.S., 1998. Effect of Liv.100 aganist Antitubercular Drugs (Isoniazid, Rifampicin and Pyrazinamide) Induced Hepartotoxicity in Rats. Indian Journal of Pharmacology, 30:233-238.

Satyavathi, V.V., Minz, A., Nagaraju, J., 2014. Nodulation: an Unexplored Cellular Defense Mechanism in Insects. Cell Signal, 26:1753:1763.

Schaeffer, F., Stainer, R.Y., 1978. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, Kinetics and Molecular Properties. Archives of Microbiology, 116-119.

Schmit A.R., Ratcliffe, N.A., 1977. The Encapsulation of Foreign Tissue Implants in *Galleria mellonella* Larvae. Journal of Insect Physiology, 23:175-184.

Schrod, J., Basedow, T., Langenbruch, G.A., 1996. Untersuchungen zur Bionomie und biologischen Beka¨mpfung des Kartoffelka¨fers (*Leptinotarsa decemlineata* Say, Col., Chrysomelidae) an zwei Standorten in Su¨dhessen (BRD). Journal of Applied Entomology, 120:619-626

Scott, J.G., 1999. Cythochromes P450 and Insecticide Resistance. Insect Biochemistry and Moleculer Biology, 29:757-777.

Scott, J.G., Liu, N., Wen, Z., 1998. Insect Cytochrome P450: Diversity, Insecticide Resistance and Tolerant to Plant Toxins. Comparative Biochemistry and Physiology, 31:313-323.

Scully, L.R., Bidochka, M.J., 2006. Developing Insect Models for the Study of Current and Emerging Human Pathogens. FEMS Microbiology Letters, 263:1–9.

Sestini, E.A., Carlson, J.C., Allsopp, R., 1991. The Effects of Ambient Temperature on Life Span, Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase, and Phospholipase A2 Activity in *Drosophila melanogaster*. Experimental Gerontology, 26:385-395.

Seth, V., Banerjee, B.D., Chakravorty, A.K., 2001. Lipid Peroxidation, Free Radical Scavenging Enzymes, and Glutathione Redox System in Blood of Rats Exposed to Propoxur. Pesticide Biochemistry and Physiology, 71:133-139.

Sezer, B., Ozalp, P., 2015a. Effects of Pyriproxyfen on Hemocyte Count and Morphology of *Galleria mellonella*. Fresenius Environmental Bulletin. 24(2a):621-625.

Sezer, B., Özalp, P., 2015b. Effect of Juvenile Hormone Analogue, Pyriproxyfen on Antioxidant Enzymes of Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae: Galleriinae) Larvae. Pakistan Journal of Zoology, 47:665-669.

Sharma, P.R., Sharma, O.P., Saxena, B.P., 2003. Effect of Neem Gold on Haemocytes of the Tobacco Armyworm, *Spodoptera littura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Current Science, 84:690-695.

Shaurub, E.S.H., El-Meguid, A.A., El-Aziz, N.M.A., 2014. Quantitative and Ultrastructural Changes in the Haemocytes of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) Treated Individually or in Combination with *Spodoptera littoralis* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus (SpliMNPV) and Azadirachtin. Micron, 65:62-68.

Sies, H., 1985. Oxidative Stress: Introductury Remarks in Oxidative Stress. London, Academic Press, s. 1-8.

Sies, H., 1991. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. American Journal of Medicine, 91:31-38.

Sies, H., 1997. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Progress of Theoretical and Experimental Physics, 82:291-295.

Silva, J.E.B., Boleli, I.I.C., Simões, Z.L.P., 2002. Hemocyte Types and Total and Differential Counts in Unparasitized and Parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) Larvae. Brazilian Journal of Biology, 62:689-699.

Singh, D., 2010. Morphotaxonomy of Immature Stages of Some Economically Important Pyraloidea (Ditrysia: Lepidoptera) of Punjab. Doctor of Philosophy Thesis, Punjabi University.

Singh, G., Rup, P.J., Koul, O., 2007. Acute, Sublethal and Combination Effects of Azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* Toxins on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae. Bulletin of Entomological Research, 97:351-357.

Siva-Jothy, M.T., Thompson, J.J.W., 2002. Short-Term Nutrient Deprivation Affects Immune Function. Physiological Entomology, 27:206-212.

Soderlund, D.M., 1997. Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance. (Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals. (Ed Sjut, V., Chemistry of Plant Protection, Ed: Ebing, V.), Springer, Germanyi 13:21-73.

Sorg, O., 2004. Oxidative Stress: A Theoretical Model or a Biological Reality? CR Biologies, 327:649-662.

Strand, M.R., Pech, L.L., 1995. Immunological basis for compatibility in Parasitoid–Host Relationships. Annual Reviwes of Entomology, 40:31-56.

Suwalsky, M., Ramos, P., Villena, F., Cardenas, H., Norrıs, B., Cuevas, F., Sotomayer, C.P., 2001. The Organophosphorus Insecticide Parathion Changes Properties of Natural and Model Membranes. Pesticide Biochemistry and Physiology, 70:74-85.

Tarhan, L., Kayalı, H.A., Karacali, S., 2013. The Glutathione-Related Detoxication Responses to Juvenile and Ecdysone Hormones in *Galleria mellonella*. Comperative Biochemical Physiology C Toxicology and Pharmacology, 158(2):117-121.

Temizkan, G., Arda, N., 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s. 345.

Theopold, U., Li, D., Fabbri, M., Scherfer, C., Schmidt, O., 2002. The Coagulation of Insect Hemolymph. Cellular and Molecular Life Sciences, 59:363-672.

Theopold, U., Schmidt, O., Soderhall, K., Dushay, M.S., 2004. Coagulation in Arthropods, Defence, Wound Closure and Healing. Trends in Immunology, 25:289-294.

Tiwari, R.K., Pandey, J.P., Dinesh K., 2006. Effects of Neem Based Insecticides on Metamorphosis, Haemocytes and Reproductive Behavoiur in the Red Cotton Bug *Dysdercus koenigii* Fab. (Heteroptera: Pyrrhocoridae). Entomon, 31(4):267-275.

Townsend, A.J., Tu, C.P.D., Cowan, K.H., 1992. Expression of Human μ or α class Glutathione S-Transferases in Stably Transfected Human MCF-7 Breast Cancer Cells: Effect on Cellular Sensitivity to Cytotoxic Agents. Molecular Pharmacology, 41:230-236.

Tomilova, O.G., Kryukov, V.Y., Duisembekov, B.A., Yaroslavtseva, O.N., Tyurin, M.V., Kryukova, N.A., Skorokhodov, V., Dubovskiy, I.M., Glupov, V.V., 2016. Immune-Physiological Aspects of Synergy between Avermectins and the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium robertsii* in Colorado Potato Beetle Larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 140:8-15.

Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Feri, L., Gregolin, C., 1982. Purification from Pig Liver of a Protein Which Protects Liposomes and Biomembranes from peroxidative degradation and Exhibits Glutathione Peroxidase Activity on Phosphatidylcholine Hydroperoxides. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA), 710:197-211.

Vilmos, P., Kurucz, E., 1998. Insect Immunity: Evolutionary Roots of the Mammalian Innate Immune System. Immunology Letters, 62:59-66.

Volz, J., Muller, H.M., Zdanowicz, A., Kafatos, F.C., Osta, M.A., 2006. A Genetic Module Regulates the Melanization Response of Anopheles to Plasmodium. Cell Microbiology, 8:1392-1405.

War, A.R., Paulraj, M.G., Ignacimuthu, S. 2011. Synergistic Activity of Endosulfan with Neem Oil Formulation against Tobacco Caterpillar *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Entomology, 8 (6):530-538.

Ware, G.W., 2000. The Pesticide Book, fifth ed. Thomson Publications, Fresno, CA, s. 331.

Weirich, G., Collins, A., Williams, V., 2002. Antioxidant Enzymes in the Honey Bee, *Apis mellifera*. Apidologie, Springer Verlag, 33(1):3-14.

Whalon, M.E., Mota-Sanchez, R.M., Hollingworth, R.M., Duynslager, L., 2008. Artrhopods Resistant to Pesticides Database (ARPD). http://www.pesticideresistance.org.

Whalon, M.E., Rahardja, U., Verakalasa, P., 1994. Selection and Management of *Bacillus thuringiensis*-Resistant Colorado Potato Beetle. (In: Zehnder GW, Powelson ML, Jansson RK, Raman KA Eds) Advances in Potato Pest Biology and Management. American Phytopatological Society, St. Paul, s. 309–321.

Wojda, I., 2017. Immunity of The Greater Wax Moth *Galleria mellonella.* Insect Science, 24:342-357.

Wu, H., Liu, J., Zhang, R., Zhang, J., Guo, Y., Ma, E., 2011. Biochemical Effects of Acute Phoxim Administration on Antioxidant System and Acetylcholinesterase in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). Pesticide Biochemistry and Physiology, 100:23–26.

Wu, G., Yi, Y., 2015. Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. Comparative Biochemical and Physiology C Toxicology and Pharmacology.,167:131-139.

Yamashita, M., Iwabuchi, K., 2001. *Bombyx mori* Prohemocyte Division and Differentiation in Individual Microcultures. Journal of Insect Physiology, 47:325-331.

Yarsan, E., Tanyuksel, M., Celik, S., Aydin, A., 1999. Effects of Aldicarb and Malathion on Lipid Peroxidation. Bulletin Environmental Contamination of Toxicology, 63:575-581.

Yaroslavtseva, O.N., Dubovskiy, I.M., Khodyrev, V., Duisembekov, B.A., Kryukov, V.Y., Glupov, V.V., 2017. Immunological Mechanisms of Synergy between Fungus *Metarhizium robertsii* and Bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. Morrisoni on Colorado Potato Beetle Larvae. Journal of Insect Physiology, 96:14-20.

Yorulmaz S., Ay, R., 2010. Akar ve Böceklerde Pestisitlerin Detoksifikasyonunda Rol Oynayan Enzimler. Journal of Agricultural Faculty of Uludag University, 24(2):137-148.

Yu, S.J., 2008. The Toxicology and Biochemistry of Insecticides. CRC Pres, Taylor Francis Group, s. 250

Zawisza-Raszka, A., Dolezych, B., 2008. Acetylcholinesterase, Catalase and Glutathione S-Transferase Activity in Beet Armyworm (*Spodoptera exigua*) Exposed to Nickel and/or Diazinon. Acta Biologica Hungarica, 59(1):31-45

Zawisza-Raszka, A., Dolezych, B., Dolezych, S., Migula, P., Ligaszewski, M., 2010. Effects of Nickel Exposure and Acute Pesticide Intoxication on Acetylcholinesterase, Catalase and Glutathione S-Transferase Activity and Glucose Absorption in the Digestive Tract of *Helix aspersa* (Pulmonata, Helicidae). International Journal of Environment and Pollution, 40(4):380-390.

Zhu, Q., He, Y., Yao, J., Liu, Y., Tao, L., Huang, Q., 2012. Effects of Sublethal Concentrations of the Chitin Synthesis Inhibitor, Hexaflumuron, on the Development and Hemolymph Physiology of the Cutworm, *Spodoptera litura*, Journal of Insect Science, 12:27.

Zibaee, A., Bandani, A., Malagoli, D., 2011. Purification and Characterization of Phenoloxidase from the Hemocytes of *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae). Comparative Biochemistry and Physiology, 158:117-123.

Zibaee, A., Bandani, A.R., Malagoli, D., 2012. Methoxyfenozide and Pyriproxifen Alter the Cellular Immune Reactions of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) against *Beauveria bassiana*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 102(1):30-37.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Adana'da doğdu. İlköğrenimini Adana Cebesoy İlkokulu'nda, ortaöğrenimini 1998 yılında Adana Çukurova Özel Bilfen Lisesi'nde, lise öğrenimini ise 2002 yılında Adana Ticaret Odası Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2002 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoloji bölümünü kazandı. 2007 yılında lisans eğitimini tamamlayarak mezun oldu. 2008 yılında Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisansa başladı. 2010 yılında doktora eğitimine Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında başladı. 2013 yılında Portekiz Algarve Universitesi' nde araştırmacı olarak bir projede görev aldı.