T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NEEM AZAL-T/S' NİN ALTINCI EVRE *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA:PYRALIDAE) LARVAL İNTEGÜMENTİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Hakan SART

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül- 2014

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEEM AZAL-T/S' NİN ALTINCI EVRE *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) LARVAL İNTEGÜMENTİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Hakan SART

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Sadettin ÜNSAL

2014, 46 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. İlhami ÇELİK
Yrd. Doç. Dr. Sadettin ÜNSAL
Doç. Dr. Haluk ÖZPARLAK

Neem-Azal-T/S'nin altıncı evre *Galleria mellonella* L. larvalarının integümenti üzerine kitin sentez inhibitörü (CSI) etkisi araştırıldı. Probit analizi yöntemiyle *G. mellonella* larvaları için Neem Azal-T/S'nin oral yolla uygulanması sonucunda LC_{95} değeri 4200 ppm olarak belirlendi. Çalışmada 4200 ppm ve bunun yarı yarıya azalan oranları olan 2100, 1050 ve 525 ppm'lik konsantrasyonları kullanıldı.

Uygulama yapılan larvalarda morfolojik olarak, tüm larvalarda aynı oranda olmamakla beraber: kullanılan insektisitin doz/cevap ilişkisine bağlı olarak; larvaların hareketlerinde yavaşlama, gelişmenin inhibisyonu, doku sıvısı kaybı, kararma ve kanamalar gözlendi. Kullanılan dört farklı konsantrasyonda da larvaların deri değişimleri başarısız oldu.

Neem Azal-T/S'nin kullanılan dört farklı konsantrasyonunda kütiküla kalınlığı üzerine etkili olduğu gözlendi. Histolojik olarak, deneme gruplarında doz/cevap ilişkisiyle epidermal hücrelerin kütiküla sekresyonu daha yüksek oranlarda bloke edildi ve endokütikülar lamellerin şekillenmesi engellendi. 525 ppm'lik konsantrasyonda Neem Azal-T/S' li diyetle beslenen larvaların kütiküla sekresyonu % 27, 1050 ppm'de % 29, 2100 ppm'de % 33 ve 4200 ppm' de ise % 37 oranında azaldı. Neem Azal-T/S'nin etki şekli, diğer klasik CSI (kitin sentez inhibitörü)'lerle benzer bulundu.

Anahtar Kelimeler: Azadirachtin, büyük kovan güvesi, *Galleria mellonella*, kitin sentez inhibitörü (CSI), kütiküla, Neem Azal T/S

ABSTRACT

MS. THESIS

THE EFFECTS OF NEEM AZAL-T/S INSECTICIDES ON THE INTEGUMENT OF SIXTH INSTAR *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) LARVAE

Hakan SART

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELCUK UNIVERSITY

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Advisor: Assit. Prof. Dr. Sadettin ÜNSAL

2014, 46 Pages

Jury

Prof. Dr. İlhami ÇELİK
Assit. Prof. Dr. Sadettin ÜNSAL
Assoc. Prof. Dr. Haluk ÖZPARLAK

Effects of Neem-Azal-T/S on the chitin synthesis inhibitor of sixth instar larval integument of *Galleria mellonella* L (CSI) have been investigated. With probit analysis method oral LC_{95} value of Neem Azal-T/S was determined as 4200 ppm for *Galleria mellonella* larvae. Decreasing concentrations of the substance such as, 4200 ppm, 2100 ppm, 1050 ppm and 525 ppm were used.

Morphologically, in all exposed the larvae slowing of the movements, growth inhibition, loss of tissue fluid, blackout and bleeding were observed in a dose/response manner. Nevertheless, the changes were not at the same level in all group. The moulting was unsuccessful at four different concentrations.

Neem Azal-T/S was found to be effective on cuticle thickness. Histologically, cuticle secretion of epidermal cells was blocked at a dose/response manner and the blockage was more definite at higher concentrations and endocuticular lamellae formation was blocked. Cuticle secretion of the larvae decreased 27% in 525 ppm, 29% in 1050 ppm, 33% in 2100 ppm and 37% in 4200 ppm Neem Azal-T/S containing diet. The action mode of Neem Azal-T/S was found to be similar to that of the classical CSIs (chitin synthesis inhibitors).

Keywords: Azadirachtin, greather wax moth, cuticle, *Galleria mellonella*, chitin synthesis inhibitor (CSIs), Neem Azal-T/S

ÖNSÖZ

S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde yürütülmüş olan bu yüksek lisans tez çalışmasıyla; halk arasında kovan güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella* L. zararlısının altıncı evre larval integümenti üzerine Neem Azal-T/S etkisinin ışık mikroskobik düzeyde araştırılmıştır.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde teşvik ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Yrd. Doç. Sadettin ÜNSAL'a, laboratuvar çalışmalarımda görüşleriyle yardımcı olan Doç. Dr. Haluk ÖZPARLAK'a, mesai arkadaşlarım Sernur BAĞCI, Rukiye UÇKAÇ, Mürsel GÖKÇEN ve Hikmet BÜYÜKKARCI'ya yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Hakan SART

KONYA-2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ ..... **iii**
İÇİNDEKİLER…… ……**iv**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **v**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **5**
2.1. *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) 5
2.2. Böceklerde İntegümentin Yapısı 5
2.3. Azadirachtinin Böcekler Üzerindeki Etkileri 6
2.4. Azadirachtin İle İlgili Çalışmalar 8
3. MATERYAL VE METOT **12**
3.1. Materyal 12
3.1.1. Azadirachtin 12
3.1.2. *Galleria mellonella* L. kültürü 13
3.2. Metot 13
3.2.1. *Galleria mellonella* L. larvalarına Neem Azal T/S uygulanması 13
3.2.2. Larvalardan blok hazırlanması, kesitlerin alınması ve boyanması 14
3.2.3. Kütiküla kalınlık ölçümleri 14
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **16**
4.1. Araştırma Sonuçları 16
4.1.1. Kontrol grubu altıncı evre *Galleria mellonella* L. larvalarına ait gözlemler 16
4.1.1.1. Larval integümente ait makroskobik ve histolojik gözlemler 16
4.1.1.2. İntegümental siklus 16
4.1.1.3. Larval kütiküla kalınlık ölçümleri 21
4.1.2.1. Neem Azal T/S integümentin üzerindeki makroskobik etkileri 21
4.1.2.2. Neem Azal T/S'nin kütiküla kalınlığı üzerine etkileri 31
4.2. Tartışma 33
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **37**
KAYNAKLAR **39**
ÖZGEÇMİŞ **46**

SİMGELER VE KISALTMALAR

AO : aritmetik ortalama

apz : apoliz

CSI : kitin sentez inhibitörü (Chitin synthesis Inhibitor)

ek : eski kütiküla

ekb : ekuviyal boşluk

ekk : ekzokütiküla

eks : ekuviyal sıvı

enk : endokütiküla

enl : endokütikülar lamel

epb : epidermal hücre por kanalı bağlantısı

eph : epidermal hücre

epk : epikütiküla

eps : epidermal hücre salgısı

ept : epikütikülar tüberkül

esy : epidermal hücre salgısı yoğunlaşması

hep : hidroliz edilen prokütiküla

hms : hemosit

IGR : böcek gelişim düzenleyicisi (Insect Growht Regulator)

ik : interzon kütiküla

KO : kareler ortalaması

KT : kareler toplamı

LC_{95} : test hayvanlarının % 95'ni öldürmek için gerekli olan konsantrasyon

phz : prokütikülanın hidrolizi

pk : por kanalı

prk : prokütiküla

prl : prokütikülar lamel

SD : serbestlik derecesi

SH : standart hata

su : sitoplazmik uzantı

yd : yağ dokusu

yet : yeni kütikülar tüberkül

yk : yeni kütiküla

ysk : yeni sentezlenen kütiküla

ysl : yeni sentezlenen lamel

1.GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde önemli besin kaynaklarından birisi de doğal bir besin kaynağı olan baldır. Türkiye'de arıcılık, çok eski yıllardan beri bir gelenek olarak yapıla gelen sosyo-ekonomik bir faaliyettir. Arıcılık, gerek insan yaşamı üzerine olumlu etkileri ve gerekse ekonomik önemi nedeniyle geçmişten bugüne ilgi çeken bir uğraşı alanı olmuştur. Hızla değişen dünyada gün geçtikçe insan sağlığına verilen önem artarken, doğal ürünler içerisinde arı ürünlerine yönelim hızla artmaktadır. Bal arısının diğer bir faydası, yabani ve kültür bitkilerinin yaklaşık % 85'inin temel tozlayıcısı olmasıdır. Bu şekilde bitkisel üretim ve çeşitliliğe katkısı kendi ürün değerinin yaklaşık 15 katıdır. Arıcılık, dünyada birçok ülkede ve Türkiye'de kırsal kalkınmada önemli rol oynamaktadır. Ülkemiz; doğası ve zengin coğrafi yapısı, endemik bitki türü çeşitliliği, henüz bozulmamış bir ekosisteme sahip olması gibi nedenlerden dolayı organik arıcılık son yıllarda Türkiye arıcılığında giderek artan bir yer edinmektedir (Mert ve ark, 2007). Ortalama 4.5-5 milyon koloni varlığı ile dünya koloni varlığı içerisinde % 8'lik paya sahip olan Türkiye'de 2007 yılı itibariyle ortalama üretilen bal miktarı 84.000 tondur. Dünyada çam balı üretiminin % 91'i Türkiye'de yapılmaktadır (http://www.aricilik.info). Ancak bu önemli gelişmeye karşın, ülkemizde kovan başına ortalama bal üretimi 16 kg dolayında olup, dünya ortalaması olan 20 kg'ın altındadır. Bununla birlikte, Türkiye'nin dünya bal ticaretinde % 1.8'lik payla 10. sırada yer alışı, sahip olunan kovan varlığı ve bal üretimiyle uyum sağlamamaktadır (FAO 2003). Hem dünya bal ticaretindeki payımız hem de koloni başına bal üretimimiz dikkate alındığında, ülkemizin sahip olduğu mevcut arıcılık potansiyelinden yeteri kadar faydalanamadığımız ortaya çıkmaktadır. Bunun başlıca nedenleri bal ve yavru üretiminin azalmasına, arılarda kış kayıplarına ve kolonilerin ilkbahar gelişmelerinin yavaşlamasına neden olan arı hastalık ve zararlılarının yaygınlığıdır.

Arıcılık sektöründe en büyük zararlıların başında, arı kovanlarında ve depolarda peteklere zarar veren birkaç güve türü gelir. Bunlar arasında *Galleria mellonella* L. (büyük balmumu güvesi) ve *Achroia grisella* L. (küçük balmumu güvesi) en tanınmış türlerdir. *G. mellonella* larvaları büyük zarara sebep olduğu için en tehlikeli olanıdır. *G. mellonella*'nın larvaları; balmumu, bal ve depolanmış polenler üzerinde beslenerek bal üretiminde ekonomik kayıplara neden olurlar. Sağlıklı aktif kolonilerde mum güvesi zararı, işçi arılar tarafından etkili bir şekilde kontrol edilmekte ise de; hastalıklara maruz

kalarak zayıflamış kolonilerde, büyük kayıplar meydana gelmektedir. En ağır kayıplar ise kış ayları süresince depolanmış peteklerde görülmektedir (Tutkun ve Boşgelmez, 2003).

G. mellonella Lepidoptera ordosu Pyralidae familyasına ait holometabol bir böcektir. Yumurta, larva, pupa ve ergin devreler içeren bir hayat siklusuna sahip olan bu türün hayat siklusu yumurtadan ergin devreye kadar yaklaşık altı haftadır. Yumurtadan çıkan *G. mellonella* larvaları, larval devrede yedi instar evresi geçirirler. Son evrede ise maksimum büyüklüğe ulaşarak olgunlaşırlar. Olgun son evre larvaları, çevrelerine koza örerek pupa devresine geçerler. Daha sonra pupalardan ergin kelebekler oluşur. Halk arasında ‘’kovan güvesi’’ olarak da bilinen *G. mellonella* erginleri, yumurtalarını kovanlarda bal arılarının ulaşamayacağı ahşap kısımlarındaki çatlaklara bırakırlar. Yumurtadan çıkan genç larvalar petekler içinde tüneller şeklinde oyuklar açmak suretiyle, bal ve polen ile beslenirler. Yaşlı larvalar ise ördükleri ipeksi ağlarla petekleri birbirine yapıştırmak ve onları tamamıyla yemek suretiyle zarar verip bal üretiminde % 45’lere varan ürün kaybına neden olurlar (Ali ve ark, 1973).

Dolaylı yoldan bal oluşumunu engelleyen bu zararlı ile gerektiği şekilde mücadele yapılmadığı takdirde kovandan alınan bal miktarı önemli derecede düşmektedir. Bu sebeple, gerek insan sağlığı ve gerekse çevre sağlığı açısından problem oluşturmayacak insektisitlerle bu zararlıya karşı mücadelenin iyi organize edilerek larval dönemde yapılması gerekmektedir.

Bal üretimini ve diğer tarımsal ürünleri, pestlerin zararlı etkisinden korumak amacıyla çok çeşitli kimyasal ya da biyolojik bileşikler kullanılmaktadır.

En çok tercih edilen yol, sentetik yâda yarı sentetik pestisitlerle yapılan mücadeledir. Ancak bu mücadele yöntemlerinin uygulanması, arı ürünlerinde kalıntı bırakmaları, insan ve bal arısı sağlığında ciddi riskler yaratmaları nedeniyle organik tarım yönetmeliği kapsamınca yasaklanmıştır.

Sentetik insektisitlerin bilinçsizce kullanımı sonucu zararlılarda oluşan dayanıklılık, insan sağlığı ve çevreye toksisitesi gibi olumsuz etkilerinden dolayı zararlılarla savaşta eğilim, biyolojik savaş ve doğal organik insektisitlerin kullanılması yönünde artmıştır (Miller ve Uetz, 1998).

Böceklerde, sentetik insektisitlere karşı gelişen dayanıklılığın dölden döle aktarılması da bu olumsuz etkiyi arttırmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda birçok arthropoda türünün, insektisitlere karşı direnç gösterdiği kanıtlanmıştır (Plapp, 1984). İnsektisit direncinin evrimi zararlı böcek popülasyonlarının kontrolü açısından önemli

bir sorun oluşturmaktadır. 1940 yılının başlarında organoklorlu ve organofosforlu insektisitlerin keşfinden önce gelişmiş ülkelerde bitkisel insektisitlerin kullanımı çok büyük önem taşımaktaydı. Yüzyıllardır insanlar, besinlerini yok eden ve insan sağlığını etkileyen böceklerle mücadelede doğal insektisitleri kullanıyorlardı. Oysa 20. yüzyılda, zarar verici böceklerden, kenelerden ve ev tozu akarlarından korunmak için doğal insektisitlerin yerini sentetik insektisitler almıştır (Coats, 1994).

Günümüz de ise artık tüketici kitlesi gıdanın kaynağını, güvenilirliğini, işleme ve depolama koşullarını, bulaşma risklerini sorgulamaya başlamıştır. İşte; "biyolojik", "organik", "ekolojik", "kontrollü" gıda gibi terimler böylece gündeme gelmiştir. Organik arıcılıkta, tedavi edici etkilerinin öngörülen tedaviye uygun olması kaydıyla, kimyasal bileşimli ilaçlar yerine, organik asitler, fitoterapik ve homeopatik tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, organik arıcılık yönetmeliğince kabul edilen biyolojik mücadele yöntemlerinde uygulamada yer alması ile organik arıcılıkta, hastalık ve zararlılarla mücadele sorunu bu şekilde önemli ölçüde aşılabilecektir (Mert ve ark, 2007).

Böceklerle entegre mücadele, onları öldürmek amacıyla değil, popülasyonlarını asgariye indirmek amacıyla yapılmaktadır. Böceklerde entegre mücadele birimi (IPM) programı, hangi insektisitin biyolojik kontrolde etken olduğunun bulunmasında ve yıkıcı etkilerinin neler olduğunu teşhis etmede uygulanmaktadır (Schneider ve ark, 2004). Bütün bu insektisitler çevreye zarar vermemelerinden, çabuk bozulmalarından, insanlara karşı düşük toksik etkilerinden ve düşük dozlarda kullanılmalarından dolayı geniş spektrumlu pestisitlere nazaran daha güvenli bir alternatif olarak göz önünde tutulmaktadır (Liu ve ark, 2000). Doğal insektisitlerin en önemli avantajları, nemde, güneş ışığında ve rüzgarlı hava koşullarında çok hızlı parçalanmalarıdır.

Bitkilerden elde edilen biyopestisitlerin en önemli özelliklerinden biri de böceklerde beslenmeyi önleyici ve uzaklaştırıcı etkisinin olmasıdır (Isman, 2006).

Biyopestisitler, US-EPA (United States-Environmental Protection Agency)'nın yapmış olduğu sınıflandırmada; mikrobiyal pestisitler, bitki pestisitleri ve biyokimyasal pestisitler olmak üzere 3 sınıfa ayrılır. Biyopestisitler, geleneksel pestisitlerden daha az zararlıdır.

Organik tarım için peste karşı daha etkili, hedef canlı dışındaki diğer canlılara karşı daha az zararlı ya da tamamen zararsız bileşikler geliştirilmiştir. Bu geliştirilen insektisitler; böcek büyüme düzenleyicileri (IGRs)'dir (Mommaerts ve ark, 2006). Böcek gelişim düzenleyicileri (IGRs) üçüncü nesil insektisitler olarak isimlendirilip etki

şekillerine göre üç grupta sınıflandırılmaktadır. Bunlar; (i) jüvenil hormon ve analogları, (ii) ekdizon antagonistleri ve (iii) kitin sentez inhibitörleridir (CSIs) (Mondial ve Perween, 2000). Bunlardan kitin sentez inhibitörleri (CSIs) larvaların deri değiştirmesini engelleyerek bulundukları evrede ölmelerine neden olmaktadır.

Söz konusu doğal insektisitlerin önemlilerinden ve son zamanlarda en çok kullanılanı Neem ağacı olarak bilinen *Azadirachta indica* Juss. (Meliaceae)'dan elde edilen azadirachtin etken maddesidir. Azadirachtin, ilk olarak Butterworth ve Morgan (1971) tarafından izole edilmiş doğal bir insektisittir. Geçen 20 yıl boyunca birçok bitki türü üzerinde yapılan çalışmalarda azadirachtin tüm dünyada entomolojistlerin ve bitki kimyacılarının ilgisini çekmiştir (Schmutterer, 1990).

Bugün için bir IGR olarak kabul gören (Tunaz ve Uygun, 2004) azadirachtinin böcekler üzerinde beslenmeyi (Mordue (Luntz) ve Blackwell, 1993), büyüme ve gelişmeyi engellediği ve yüksek dozlarının toksik etkide bulunduğu (Schmutterer, 1988), aynı zamanda azadirachtin'in bir kitin sentezi inhibitörü olduğu (Schmutterer, 1988) belirlenmiştir. Buna karşılık çevre ve diğer canlılar üzerinde olumsuz etkileri mevcut değildir (Walter, 1999).

Arthropoda şubesine dâhil olan böcekler, kas gücünün en faydalı şekilde kullanılabilmesine izin veren bir ekzo-iskelet sistemine sahiptir (Reynolds, 1987). Böceklerde larval devrede ekzo-iskelet görevini yerine getiren integüment; larvaları dış etkilerden koruyan zırh görevinin yanında, önemli bir diğer görevi de iç dokular ile dış ortam arasında su, iyon ve diğer maddelerin geçişine engel olan esas bir bariyer olmasıdır (Nesbitt, 1970). Ancak integümentin bu faydalı fonkiyonları yanında larvaların büyümesine sınırlandırdığı için periyodik olarak değiştirilme zorunluluğu vardır. Deri değiştirme olarak adlandırılan bir seri olaylar zinciri sonunda eski deri atılarak yerine yenisi meydana getirilir. İntegüment deri değiştirme olayının hemen hemen tüm evreleri boyunca, zararlıyla yapılacak olan mücadelede çok önemli bir hedeftir.

Bu çalışmada *Galleria mellonella* larval integümentinin yapısının bilinmesi yanında; bir IGR olan azadirachtinin (Neem Azal-T/S) öncelikli olarak altıncı evre *G. mellonella* larvaları üzerindeki LC_{95} değerinin belirlenmesi ve sonrasında da letal konsantrasyonla beraber subletal konsantrasyonlarının integüment üzerindeki kitin sentez inhibitörü (CSI) etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)

Genellikle zayıf kolonilerde önemli ölçülerde zarar yapan petek güvelerinin, birisi iri yapılı *Galleria mellonella* ve diğeri daha küçük yapılı *Achroia grisella* olmak üzere iki üyesi bulunmaktadır. Büyük petek güvesi daha zararlı olanıdır. Yaşamının yalnızca larva döneminde zararlı olan petek güvesinin ergini çalılık arazide yaşamını sürdürür. Genellikle akşamüstü ergin dişi, bal kovanına girerek yumurtalarını bal arılarının bozamayacağı yarık ve deliklere bırakır (Gülpınar, 2005). Yumurtalar pembemsi krem veya beyazımtırak renkte olup, boyu eninden biraz uzun ve yaklaşık 0.5 mm'den biraz küçüktür. Normal koşullarda (24-26 °C) bu yumurtalardan 5-8 gün içerisinde larvalar çıkar. Çıkış süresi 10-15°C'de 34 güne kadar uzar (Cymborowski, 2000). Larvalar özellikle balla beslenirler. Bu arada bal mumu da yerler. Ancak sadece bal mumu ile beslenen larvalar gelişimini tamamlayamazlar. Eski petekler ve pek çok arı, larva kalıntısı içermesinden dolayı büyük mum güvesi zararı açısından oldukça risklidir.

2.2. Böceklerde İntegümentin Yapısı

Genel olarak omurgasız hayvanlarda, bazal membran üzerinde tek sıra hücrelerden oluşan epidermis katmanıyla epidermis hücrelerinin salgısından oluşan kütiküla tabakası için integüment terimi kullanılır (Lower, 1956).

Epidermis, kütiküla katmanının hemen altında epidermal hücrelerden meydana gelir ve kütikülayı salgılar. Larvanın gelişim durumuna göre epidermis geniş ve yassı şekilden, prizmatik şekile değişebilen hücrelerden oluşmuştur. Epidermis tüm gelişimi boyunca en iyi yeni kütiküla oluşurken görülür. Diğer zamanlarda oldukça incelmiştir (Ünsal ve Ayvalı, 1989). Epidermal hücreleri vücut boşluğundan ayıran bazal membran ise epidermisin altında ince bir tabaka olarak uzanır. Bazal membran alt yüzünde hemositler bulunur (Wigglesworth, 1974).

Kütiküla ise tipik bir şekilde üç esas kattan meydana gelmiştir. Bu tabakalar içte endokütiküla, ortada ekzokütiküla ve yüzeysel katman olan epikütiküla'dır. Bazı böceklerde ekzokütikülanın yerinde yada endokütiküla ve ekzokütiküla arasında ilave

bir tabaka bulunur. Kendine has bir boyanma ile boyanan bu ince tabaka, mezokütiküla adını alır (Nesbitt, 1970; Wigglesworth, 1974). Son olarak, kütiküla ve epidermis arasında mukoid bileşimli ve kütiküla ile epidermal hücreleri birleştirmeye yarayan bir tabaka daha vardır. Bu tabaka subkütiküla adını alır. Bu tabakanın henüz stabilize olmayan salgılanmış kütiküla olarak olabileceği ifade edilmiştir (Wigglesworth, 1974; Reynolds, 1987).

Kitin içermeyen epikütiküla, tanenleşmiş lipoprotein tabakası olarak kabul edilir. Epikütikülanın lipit yapısı sulu solüsyon ve süspansiyonların penetrasyonuna başlıca engeldir (Nesbitt, 1970). Wigglesworth (1974) *Rhodnius* ve *Tenebrio*'nun epikütikülasının üç tabakaya ayırmıştır. Bu tabakalar dıştan içe doğru sement, mum ve kütikülindir. Epikütikülanın altındaki tabaka ekzokütiküladır. Ekzokütiküla, kitin ve tanenleşmiş proteinden meydana gelir ki, tanenleşmiş bu protein ekzoiskelete sertlik kazandırır (Nesbitt, 1970). Ekzokütikülanın altındaki ve kütikülanın en büyük kısmını oluşturan tabaka endokütiküladır. Yumuşak, elastik ve lamelli endokütikülanın esas bileşeni kitindir (Wigglesworth, 1974). Epikütikülanın alt kısmı prokütiküla olarak da adlandırılır (Lower, 1956). Ekzokütiküla ve endokütiküladа, düşey doğrultuda epidermal hücrelerden çıkan ve epikütikülaya kadar uzanan çok sayıda kanal uzanır. Bu kanallar por kanalları adını alır (Wigglesworth, 1974).

Kütikülanın prokütiküla kısmı şekilsiz bir matriks içinde gömülü çok sayıda, ince ve uzun fibrillerden meydana gelmiştir. Kütiküla, matrik kısmı proteinden, fibrilleri ise kitinden oluşan bileşik bir yapıdır. Kitin mikrofibrilleri 2-8 nm çapında olup boyları ise mikron ile ölçülebilecek kadar uzundur. Her bir mikrofibril 18-21 kitin molekülü ihtiva eder (Anderson, 1979). Kitin mikrofibrilleri son derece organize olmuş helizoidal bir düzende düzenlenmiştir. Kütiküla mikrofibrilleri bir polisakkarit olan kitinden yapılmıştır. Kitin β (1-4) düzleminde birbirine bağlanmış N-asetilglukozamin'in basit bir polimeridir (Reynolds, 1987). Prokütikülanın % 20-50'si kitindir. Kitin ve proteinden oluşan prokütikülada ayrıca lipitler, pigmentler, inorganik maddeler ve az miktarda organik moleküller de bulunur (Andersen, 1979). Kütikülada ayrı bir öneme sahip olan fenol türevleri ise tanenleşme olayında rol oynarlar (Reynolds, 1987).

2.3. Azadirachtinin Böcekler Üzerindeki Etkileri

Azadirachtin, laboratuvar koşullarında belirlenen en önemli böcek büyüme düzenleyicilerinden (IGR) biridir (Schmutterer, 1997). Böcek büyüme düzenleyicileri,

böceklerin büyüme ve gelişmesi için etkili olan sistemlerin düzenlenmesini önleyerek etkiler. Büyüme düzenleyici etkisi olan insektisitler, biyokimyasal yollarla büyüme ve gelişme için gerekli olan sistemleri düzenleyerek veya önleyerek böceklerde etkili olurlar. Bu maddeler gelişimde etkili olan hormonların çalışmasına etki ederek böcekleri öldürürler (Tunaz ve Uygun, 2003).

Azadirachtin'in böcekler üzerinde uzaklaştırıcı, beslenmeyi engelleyici, doğurganlığı azaltıcı, kısırlaştırıcı, öldürücü ve yumurta bırakmayı önleyici gibi etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Azadirachtin içeren ürünler fitofaj böcekler için orta ve geniş spekturumlu insektisitlerdir. Orthoptera, Homoptera, Heteroptera, Lepidoptera, Coleoptera, Diptera ve Hymenoptera takımına bağlı birçok türü etkilemektedir. *Leptinotarsa decemlineata, Pieris brassicae, Plutella xylostella, Ostrinia nubilalis, Bemisia tabaci, Sitophilus granarius, Spodoptera littoralis'e* karşı azadirachtin içeren ürünlerle yapılan çalışmalarda bu böcek türlerinin gelişimlerinin engellenmesi noktasında başarılı sonuçlar alınmıştır (Kısmalı, 1988).

Azadirachtin bir ekdizon (deri değiştirme hormonu) antagonistidir. Böceklerin gömlek değiştirme mekanizmasının bozulmasına yol açar. Ekdizon hormonu ve ekdisis uyarıcı hormon, deri değiştirme hazırlığı ve deri değiştirme zamanını düzenlemektedir. Larval dönemde bir evreden diğerine geçişte deri değişimi (ekdisis) görülür. Beyin içi salgı bezlerinden salgılanan aktivasyon hormonu tarafından harekete geçirilen metamorfoz evreleri, protrasik bez ve corpora allata bezlerinden salgılanan jüvenil hormonu ve ekdizon hormonlarının denetimi altında devam eder (Malczewska ve ark 1988).

Azadirachtinin böceklerde uzaklaştırıcı, beslenmeyi önleyici, üremeyi, yumurtlamayı ve verimliliği engellemek gibi etkilerinin yanı sıra, uçma kabiliyetinin kaybolmasına neden olduğu da bilinmektedir (Jacobson, 1989 ; Ascher, 1993 Schmutterer, 1995 ; Awad ve ark 1998). Böcekler ya da konak bitkiler azadirachtin veya neem'in alkoloid ekstraktları ile muamele edildiğinde 30 türde ovipozisyonu önleyici ve 70'in üzerinde türde ise büyümeyi ve üremeyi kısıtlayıcı etkisi olduğu görülmüştür. Gelişim, deri değiştirme ve üreme gibi fizyolojik etkileri birçok türde benzerlik gösterir (Mordue (Luntz) ve Blackwell, 1993). Böceklerde yapılan bazı çalışmalarda, sinir ve endokrin sisteme etki ederek jüvenil hormonun sentezini engellediği ortaya çıkmıştır (Howatt, 1994). Ayrıca azadirachtinin birçok böcek türünde metamorfozu değişikliğe uğrattığı da gözlenmiştir (Schmutterer, 1997; Tang ve ark 2002). Azadirachtinin deri değiştirme ve morfogenetik peptid hormonu salınımının

durdurulmasıyla beraber böceklerin birçok dokusunda etkili olduğu vurgulanmıştır (Mordue (Luntz) ve Blackwell, 1993).

Lepidoptera takımı, diğer organizmalar arasında neem özütüne karşı en çok hassas olan grubu oluşturur (Schmutterer ve Singh, 1995). Kültür bitkilerinde önemli zarar yapan başta Lepidoptera ve Orthoptera olmak üzere Homoptera, Heteroptera, Coleoptera, Diptera, ve Hymenoptera takımına bağlı bir çok türde bu etkiler, çok çalışmayla araştırılmıştır (Kısmalı ve Madanlar, 1988 ; Jacobson, 1989 ; Koul ve ark, 1990 ; Schmutterer, 1990 ; Ascher, 1993; Durmuşoğlu ve ark, 2003).

2.4. Azadirachtin İle İlgili Çalışmalar

Garcia ve Rembold (1984) azadirachtinin deri değiştirme üzerindeki etkilerini inceledikleri bir çalışmada, kanla beslenen *Rhodnius prolixus*'un dördüncü dönemdeki nimflerine, besin olarak verilen kanın her ml'sine 0.0004 µg azadirachtin ilave edildiğinde böceklerin % 50'sinde başkalaşımın engellendiğini, % 100 etkinin ise 1 µg/ml kandan daha yüksek dozlarda sağlandığı tespit etmişler aynı zamanda, azadirachtin bu böceğin beslenmesini engelleyici etkisinin olduğunu da gözlemişler ancak bu etkinin 10 µg/ml kandan daha yüksek dozlarda söz konusu olduğunu, bu dozun altında normal olarak larvaların beslenmesini sürdürdüğünü açıklamışlardır. Garcia ve Rembold'a (1984) göre beslenmenin engellenmesi, büyümenin engellenmesinin temel nedeni değildir. Çünkü azadirachtin, protorasik bezlerin salgıladığı deri değiştirme hormonu olan ekdizonun bloke edilmesiyle deri değiştirmeye engel olmaktadır.

Dorn ve ark. (1986) *Oncapeltus fasciatus* larvalarına azadirachtinin farklı dozlarını topikal yolla uyguladığında, azadirachtinin düşük, orta ve yüksek dozlarında artan doza bağlı olarak ekdizon salgılanmasının yavaşladığını, epidermal hücrelerden kütiküla sekresyonun azaldığını, düşük ve orta dozlarda apoliz görüldüğünü fakat yüksek dozlarda görülmediğini, düşük doz dışındaki dozlarda azadirachtin'in etkisiyle deri değişiminin engellendiğini ifade etmişlerdir.

Karnavar (1987) tarafından azadirachtinin böceklerde beslenmeye ve üremeye etkisinin incelediği çalışmada, azadirachtinin duyu sinirlerine ve bununla birlikte besin alımına engel olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca bu çalışmada, azadirachtinin endokrin sisteme, morfogeneze, yumurta gelişimine, verimliliğe, yumurta açılım süresine ve deri değiştirmesine olumsuz yönde etki yaptığını belirlemiştir.

Mark ve ark (1987) yaptıkları bir çalışmada tütün tomurcuk kurdu *Heliothis virescens* beşinci evre larvaları yapay diyet veya oral enjeksiyon yoluyla azadirachtin uygulamıştır. Oral enjeksiyon yoluyla 0.25 ve 0.5 mg azadirachtin enjekte edilen larvalarda deri değişimi gecikmiş, daha yüksek dozlarda (5.0 ve 10.0 mg) pupalarda ağırlık kaybı oluştuğu ve sonunda pupaların ergine dönüşümünün başarısızlıkla sonuçlandığını gözlemişlerdir.

Koul ve ark (1987) *Bombyx mori* 5. evre larvalarının gelişiminde azadirachtinin etkilerini araştırmışlardır. 0-6 günlük larvalara enjekte edilen azadirachtinin iki tip etkisini gözlemişlerdir. İlk üç günlük gözlemde gelişim bozukluğu ağırlık kaybı, ikinci etki olarakta protorasik bez tarafından salgılanan protoraskotropik (PTTH) hormon salınımını etkileyerek pupa oluşumunda gecikme ve yapısal bozukluklar, 12 günlüklerde ise başarısız pupa oluşumu ve ölümlerin gerçekleştiğini ifade etmişlerdir.

Malczewska ve ark (1988) azadirachtinin, gelişmede jüvenil ve ekdizon hormonlarının *G. mellonella* larvaları üzerindeki etkisini çalışmış, bu bitkisel insektisitin larvaların son evresinde, düşük sıcaklığın sebep olduğu hızlı deri değiştirme üzerine etkili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca azadirachtinin larval dönemde morfolojik bozukluklara, pupa evresinde ise ölümlere neden olduğunu gözlemişlerdir.

Adel ve Sehnal (2000) azadirachtinin ekdizon hormonuyla ilişkisine benzer özelliklere sahip olan RH-2485 ile ilgili olarak yaptıkları bir çalışmada, RH-2485'in *Spodoptera littarolis*'de 2. ve 4. larval evrede 0.001 ppm, 6. larval evrede 1 ppm konsantrasyonlarının besine eklendiğinde, deri değiştirme sırasında ölümlerin meydana geldiğini, 10 kez düşük dozda ise larvaların görünüşünde anormallik olmamasına rağmen gelişmenin sınırlandığını ve gereğinden fazla deri değiştirme meydana geldiğini gözlemişlerdir. Ayrıca çıkan erginlerde ise verimliliğin azalmasına neden olduğunu belirlemişlerdir. Yine aynı çalışmada, Adel ve Sehnal (2000) 10 ve 1000 ppm neem yağı ile beslenen larvalarda beslenmeden kesilme ya da azalma davranışları görülmüş, deri değiştirme gecikmiş, larva ve pupa evrelerinde ölümlere sebep olmuştur. Neem yağı ile RH-2485 birlikte verildiği zaman larva döneminde 3 kere fazla deri değiştirme meydana geldiği görülmüştür.

Luik ve Viidalepp (2001) *Pieris brassicae* larvalarını Neem Azal-T/S ile muamele etmişler, larvalar % 0.1'lik Neem Azal T/S'lik lahana yapraklarıyla beslendiğinde deri değiştirme süresinin kısaldığını, kalıcı larvaların oluşmadığını ve bütün larvaların yedi gün içerisinde öldüğünü açıklamışlardır.

Riba ve ark (2003) tarafından azadirachtinin böcek büyüme düzenleyici etkisi *Nezara viridula*'de 5. evredeki nimfe farklı dozlarda azadirachtin verilerek değerlendirilmiştir. Her böceğe 200-500 mg/ml doz uygulamalarından sonra ergin döneme geçerken deri değiştirme sırasında tüm bireylerin öldüğünü ve sağ kalanların ise değişik nimf karakterleri göstererek bir süre sonra öldüklerini gözlemişlerdir.

Huang ve ark (2004) *Spodoptera litura* pupalarında azadirachtinin protein metabolizması üzerine etkisini araştırmışlar, pupa evresine kadar 1 ppm azadirachtin ile muamele edilen besinle beslenen 48 günlük pupaların, total protein miktarında azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Weathersbee ve Mc Kenzie (2005) azadirachtin'in narenciye zararlısı olan *Diaphorina citri*'nin üzerinde yaptıkları çalışmalarında, 11.3 ppm, 22.5 ppm, 45 ppm, 90 ppm ve 180 ppm dozlarında azadirachtin'in erginlerde ölüm oranına etkili olmadığı, sadece uzaklaştırıcı etkisi olduğu tespitine karşın, azadirachtin'in nimflere düşük konsantrasyonlar da bile etkili olduğunu tesbit etmişlerdir. Aynı çalışmada Weathersbee ve Mc Kenzie (2005) 22.5 ppm konsantrasyonlarında, uygulamadan dört gün sonrasında dahi deri değiştirme gözlenmemiş ve yedi gün içinde bütün nimflerin öldüğünü tespit etmişlerdir.

Güncan ve ark (2005) seralarda etkili olan *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae)'un etkili parazitoiti olan *Encarsia formosa* (Gahan) (Hymenoptera: Aphelinidae)'ya karşı öldürücü etkisini araştırmışlardır. Bu amaçlı Neem Azal-T/S ile bulaşık domates yaprakları koparılarak önceden hazırlanmış preparatları direkt olarak uygulamışlardır. Neem Azal-T/S'nin 16 günlük pupalardaki öldürücü etkisinin % 18, 18 günlüklerdekini ise % 53 olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre Neem Azal-T/S'nin, 16 günlükler için düşük etkili 18 günlükler için ise daha yüksek etkili olduğunu bulmuşlardır.

Göçmen ve ark (2007) yaptıkları bir çalışmada, uygulanan azadirachtin dozlarından hiçbirinin *Bemisia tabaci*'nin yumurta açılımını etkilemediğini, buna karşın birinci dönem larvalara uygulanan 10, 20, 40 ve 60 ppm'lik azadirachtin dozlarının larvaların gelişimini olumsuz yönde etkilediğini ve bu larvalardan ergin çıkış oranını sırasıyla % 56.3, % 38.9, % 25.5 ve % 0 olarak tespit etmişlerdir.

Rharrabe ve ark (2008) azadirachtinin etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) 4. evre larvalarını 2 ve 4 ppm azadirachtin içeren diyetle besledikleri larvalarda ağırlık kaybı, gelişim geriliği ve ölümler gözlemişlerdir. Spektrofotometrik analizlerde azadirachtinle beslenen larvalarda 7 gün

sonunda protein, glikojen ve lipid içeriğinde ciddi bir azalmanın yol oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Ünal ve Akkuzu (2009) Neem ağacından elde edilen doğal ekstrakt olan azadirachtinin *Thaumetopoea pityocompa* (Schiff) larvalarının büyüme ve beslenme aktivitesi üzerine yaptıklar deneylerde azadirachtinin *T. pityocompa* larvalarında larval gelişimi önlediğini ve beslenme aktivitesini azalttığını gözlemişlerdir.

3.MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Azadirachtin

Etken Madde: Azadirachtin

Deneysel Formülü: C_{35} H_{44} O_{16}

Molekül Ağırlığı: -720

Kimyasal Ailesi: Tetranortriperpernoids

Azadirachta indica A. Juss bitkisinin tohumlarından ekstrakte edilen azadirachtin (AZ), elde edilen diğer bileşenler içinde en etkili olanı ve primer etkiye sahip toksik maddedir. Birikimsiz kısa devamlılığı, hedef olmayan organizmalara karşı düşük zehirliliği ve özgünlük gibi niteliklere sahip azadirachtinler yapısal olarak A'dan G'ye kadar isimlendirilmiş olan olarak yedi adet tetranortriperpernoidin izomerinden oluşur. Yedi izomerik bileşenden oluşmaktadır. Yapısal olarak birbirinin aynı olan azadirachtinler arasında miktar olarak en fazla olan azadirachtin A (% 85); böcek kovucu, beslenmeyi engelleyici ve büyüme düzenleyici bir maddedir. azadirachtin E ise en etkili üreme regülatörü olarak görülür (Rembold ve ark 1984). Bitkiden izole edilen bütün bu bileşenlerin içinden azadirachtin C en toksik olanıdır (Ascher 1981).

Neem ağacının yaprak veya kabuklarının kurutulmasıyla hazırlanan veya toz halinde meyva ve tohumundan ise terpenoid yapıda olan azadirachtin ekstrakte edilerek, tohum veya tohum kabuğundan elde edilen yağ, çeşitli şekillerde zararlılarla mücadelede kullanılmaktadır (Schmutterer, 1995). Ülkemizde ise 2000 yılından bu yana Neem Azal-T/S ticari ismiyle birçok bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır. Neem Azal-T/S, (10.000 ppm) azadirachtin içerir. Bu çalışmada azadirachtinin ticari preparatı olan Neem Azal-T/S (10.000 ppm) kullanıldı.

3.1.2.*Galleria mellonella* L. kültürü

Denemelerde kullanılan *G. mellonella* larvaları Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü araştırma laboratuvarındaki stok kültürden çoğaltılarak elde edildi. *G. mellonella* larvaları % 78 bağıl nem ve tamamen karanlık ortamda 28 ± 2 ^{0}C'deki bir inkübatör içerisinde cam kavanozlarda yetiştirilip yarı sentetik besinlerle (600 g bal + 492 g gliserol + 120 g bal peteği + 1200 g kepek) beslendi (Hegazy ve ark 1980).

3.2.Metot

3.2.1.*Galleria mellonella* L. larvalarına Neem Azal-T/S uygulanması

Araştırmada kullanılan Neem Azal-T/S'nin öncelikle *G. mellonella* altıncı evre larvaları için probit analizi (Finney, 1971) yöntemiyle LC_{95} değeri belirlendi. Bu değerin belirlenebilmesi için hesaplamalar 10000 ppm'lik ticari Neem Azal-T/S üzerinden yapıldı. İnsektisit seyreltik olduğu için yeniden suda çözülmedi. Bu solüsyondan seyreltilerek hazırlanan 100, 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 ve 10000 ppm oranındaki azadirachtin, larvaların yarı sentetik besinlerine karıştırılarak verildi ve 96 saatin sonunda canlı ve ölü larvaların sayıları tesbit edildi. Bu deney dört tekerürlü olarak gerçekleştirildi. Canlı kalan ve ölen larvaların sayısı polo plus programına uygulanarak LC_{95} değeri hesaplandı. *G. mellonella* altıncı evre larvaları için Neem Azal-T/S'nin LC_{95} dozu 4200 ppm olarak bulundu. *G. mellonella* larvalarının yarı sentetik besinine karıştırma yoluyla uygulanan Neem Azal-T/S'nin altıncı evre larval integümenti üzerine etkisini gözlemek için LC_{95} dozu olan 4200 ppm ve bunun azalan oranları olan 2100 ppm, 1050 ppm ve 525 ppm olmak üzere dört farklı konsantrasyonu üzerinden dört tekrarlı olarak denendi. Bu aşamada kontrol grubu ile birlikte 1000 adet larva kullanıldı. Beşinci evre derisini yeni değiştirmiş, altıncı evrenin ilk saatlerindeki rengi koyulaşmamış (tanenleşmemiş) *G. mellonella* larvaları seçildi. Neem Azal-T/S'nin uygulanmasından önce ayrı bir yere alınan bu larvalar besini aynı derecede yemelerinin sağlanması için 10 saat boyunca aç bırakıldı (Clarke ve Jewess, 1990).

Teknik azadirachtin suda çözülmüş, suda çözülen azadirachtin süspansiyonları 4200 ppm, 2100 ppm, 1050 ppm ve 525 ppm'lik konsantrasyonları 50 g yarı sentetik besin ile iyice karıştırıldı. Kontrol grubunun besinine ise sadece su karıştırıldı.

Hazırlanan karışımlar cam kavanozlara konulup, her kavanoza 50 adet larva yerleştirildi. Bu kavanozlar % 78 bağıl nem ve tamamen karanlık ortamda 28 ± 2 °C'e inkübe edildi. Neem Azal-T/S içeren ve içermeyen besin larvalara verilmeden önce, Neem Azal-T/S'nin olabilecek böcek kovucu (repellent) etkisinin ortadan kalkması için, larvalara bir saat sonra verildi (Erinç ve Ayvalı 1989).

Uygulamadan sonra 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 ve 96. saatlerde özellikle Neem Azal-T/S'den etkilenmiş (renk koyulaşması meydana gelen) ikişer adet larva numune olarak alındı. Ölümden dolayı meydana gelebilecek histopatolojik değişikliklerden sakınmak için ölen larvalar dikkate alınmadı. Pens ucuyla yapılan dokunmalarda uyarılara cevap vermeyen larvalar ölü olarak kabul edildi. Yukarıda belirtilen her saat için alınan deneme materyali yanında kontrol numunesi de alınarak histolojik preparatlar hazırlandı. Denemelerden sonra canlı kalan *G. mellonella* larvalarının gelişimleri izlenmeye devam edildi.

3.2.2. Larvalardan blok hazırlanması, kesitlerin alınması ve boyanması

Numune olarak alınan larvalar eterle bayıltıldıktan sonra baş ve abdomenin son kısımları kesildi. Tespit çözeltisi olarak nötral formaldehit kullanıldı. Numuneler 12- 24 saat nötral formoldehit'te tespit edildi (Ali ve ark 1973). Daha sonra numuneler bir gece akarsuda yıkamaya bırakılıp, yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon işlemi yapıldı. Tüm numuneler dehidrasyon işlemlerinden sonra ksilolde saydamlaştırılarak bir gün yumuşak parafinde bekletilip sert parafine aktarıldı (Ali ve ark 1973). Numuneler sert parafinde vakumlandıktan sonra blokları hazırlandı.

Bloklardan alınan 6-7 μm kalınlığındaki seri kesitler, Azaokarmin G ve Solvent Blue kombinasyonu, Weigert'in Hematoksilen Eozin'i, Crossman'ın üçlü boyama yöntemleriyle boyandı. Preparatlar Olympus (B51/B2-FBL3-000) ışık mikroskobu ile görüntülenip, ölçümleri yapıldı. Leica (DM 1000) ışık mikroskobu ile 400, 1000'lik büyütmede ise dijital görüntüleri kaydedildi.

3.2.3. Kütiküla kalınlık ölçümleri

Abdomen bölgesine ait kütiküla kalınlığı ölçümleri ışık mikroskobunda 40'lık büyütmede objektif mikrometre yardımıyla yapıldı. Daha önce belirtilen saatlerde alınan numunelerden hazırlanan histolojik preparatlarda her numunenin integümentinin

dorsal kısmından en az 10 farklı bölgede kütiküla kalınlıkları ölçüldü ve bu işlem dört tekerrürlü olarak gerçekleştirildi. Bu değerlerin aritmetik ortalamaları ve standart hataları hesaplandı. Kontrol grubuna ve Neem Azal-T/S uygulanan grupların, altıncı evre larvalarının kütiküla kalınlıklarına ait ortalamaların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi uygulandı. Grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem derecelerinin belirlenmesi için Duncan(1.1-8) testi yapıldı. Bütün değerlendirmeler ışık mikroskobu düzeyinde gerçekleştirildi.

4.ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Sonuçları

4.1.1. Kontrol grubu altıncı evre *Galleria mellonella* L. larvalarına ait gözlemler

4.1.1.1. Larval integümente ait makroskobik ve histolojik gözlemler

Altıncı evre başlangıcındaki larvalara çıplak gözle bakıldığı zaman integüment açık sarı renkte, ince yumrulu, parlak ve şeffaf bir yapı olarak görüldü (Şekil 4.1).

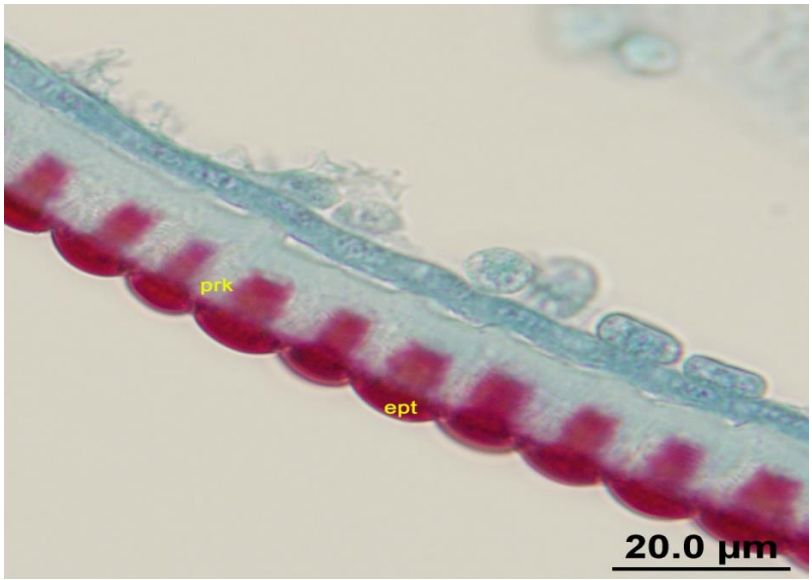
İntegümentin enine kesitleri incelendiğinde dorsalde ince, ventralde kalın, segmentler arasında ise kıvrımlar yaptığı görüldü. İntegümentin tek sıralı hücrelerden oluşan epidermis ile bu hücrelerin salgısından meydana gelen kütiküladan oluştuğu gözlendi. Histolojik kesitlerde altıncı evre kütikülasında bir dereceye kadar sivri ve kubbe tarzındaki tüberküllere rastlandı (Şekil 4.2). Bu yapıların larvaların hacimsel büyümelerinin parelelinde yayıldıkları gözlendi. Altıncı evre başlangıcındaki kütikülada ekzo ve endokütiküla tabakaları ayırt edilemedi (Şekil 4.3). Bu farklılık 60. saatten itibaren gözlenmeye başlandı (Şekil4.4). İntegümentin enine kesitlerindeki epikütiküla ayrıntısı ışık mikroskobuyla gözlenemedi ve ince çizgi şeklinde görüldü. Enine kesitlerde epidermal katman yüzeyinden başlayarak prokütikülayı dikine kateden ve epikütiküla tüberküllerinin altında dallanmalar gösteren por kanalları görüldü (Şekil 4.5). Altıcı evrenin sonlarına doğru, eski kütiküla ve epidermis hücreleri arasında interzon kütiküla olarak ifade edilen farklı bir tabaka gözlendi (Şekil 4.6). Altıncı evre integümentin gelişimi boyunca epidermis katmanının geniş yassı biçimden, prizmatiğe doğru değişebilen hücrelerden oluştuğu gözlendi.

4.1.1.2. İntegümental siklus

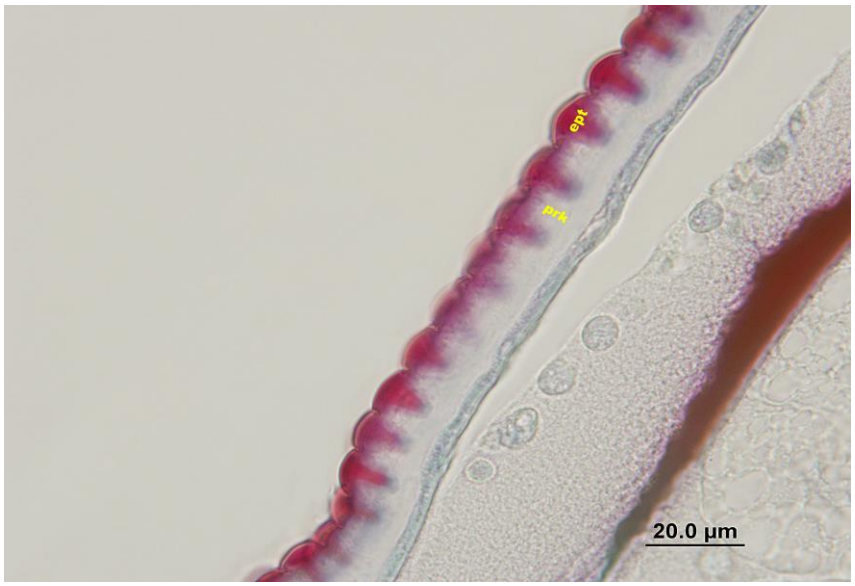
Kontrol grubunda 12. saatte altıncı evre başlangıcındaki larvaların integümentine ait enine kesitlerde, epidermal hücrelerin salgısıyla oluşmakta olan yeni kütiküla ve epikütikülar tüberküller gözlendi (Şekil 4.7). Bu evrede epidermal hücrelerin sahip olduğu kromatin maddesi yaygın, epidermal hücrelerle por kanalları ilişkisi açık olarak gözlendi. 24 ve 36. saatlerde yeni prokütikülanın oluşması epidermal hücrelerin prokütikülaya endokütikülanın lamel ilavesiyle devam etti (Şekil 4.8).



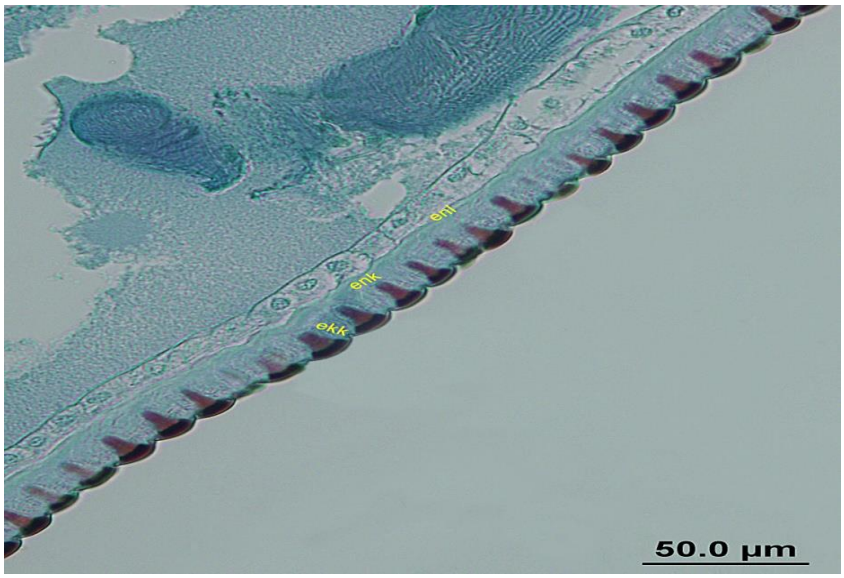
Şekil 4.1. Beşinci evre derisini yeni değiştirmiş altıncı evrenin ilk saatleri içerisindeki sağlıklı *G. mellonella* larvasının görünümü.



Şekil 4.2. Kontrol grubu larvalarında epikütiküler tüberküller görülmekte (Mallery'nin Azan boyası, >20 µm).



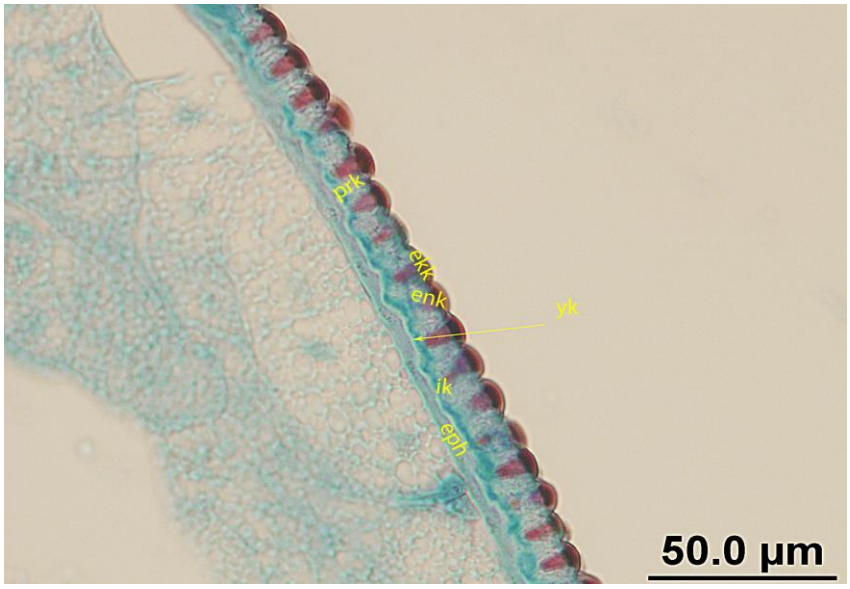
Şekil 4.3. Kontrol grubu larvalarında yeni sentezlenmiş kütiküla, epikütikülar tüberküller ve prokütiküla görülmekte (ekzo-endo kütikülar farklılaşması belirgin değil) (Azokarmin G-Anilin mavisi, >20 µm).



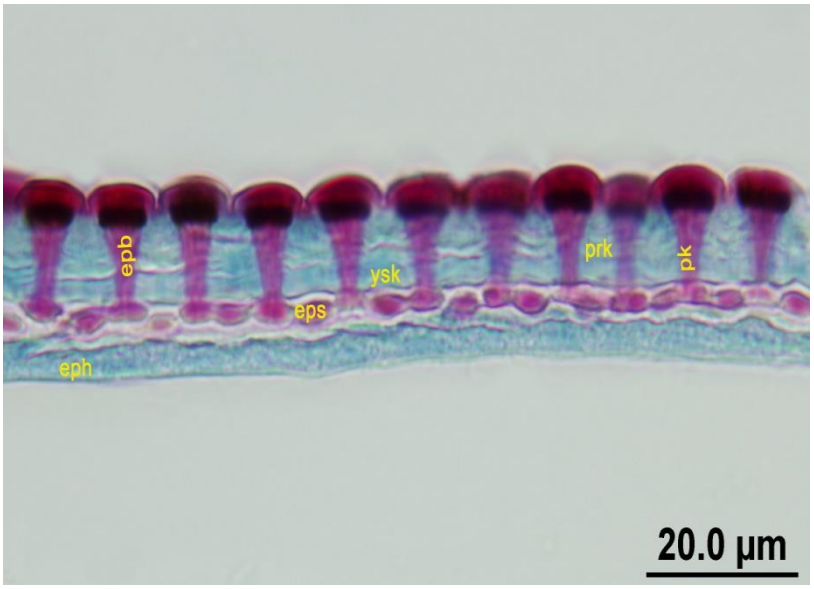
Şekil 4.4. Kontrol grubu larvalarda ekzo-endo kütiküla farklılaşması, endokütikülar lamellerin belirginleşmesi görüldü(Azokarmin G-Solvent blue kombinasyonu, > 50 µm).



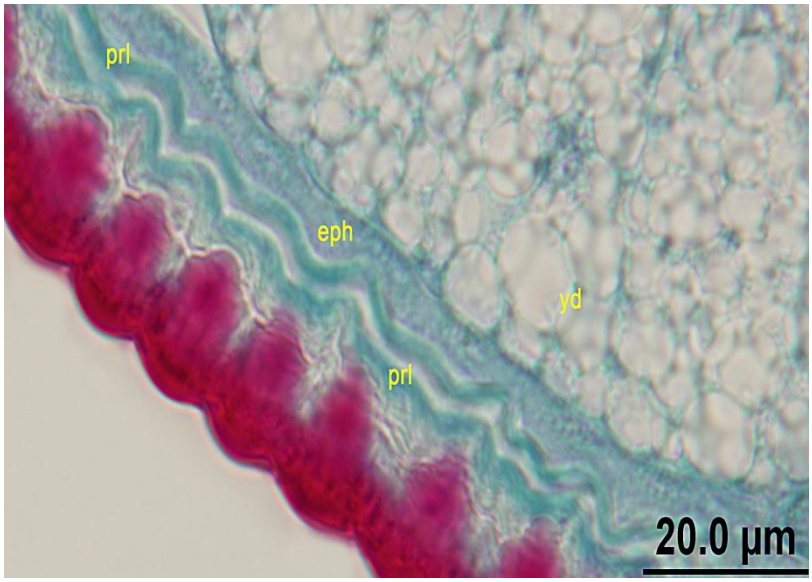
Şekil 4.5. Kontrol grubu larvalarının kütikülalarındaki por kanalları görülmekte (Hematoksilen Eozin, >50 µm).



Şekil 4.6. Kontrol grubu larvalarında altıncı evre derisini değiştirmeye hazırlanan larvada interzon kütiküla(Azokarmin G-Anilin mavisi, >50 µm).



Şekil 4.7. Kontrol grubu larvalarının kütikülalarında epidermal hücre-por kanalları ilişkisi, epidermal hücrelerin yeni kütikülayı kalınlaştıran salgılarını dışarıya verişleri görülmekte(Azokarmin G-Anilin mavisi, >20 µm).



Şekil 4.8. Kontrol grubu larvalarının yeni kütikülasındaki prokütikülar kalınlığın lamel ilavesiyle artmaya başlaması görülmekte (Azan boya, >20 µm).

48. saatte prokütiküladaki endokütiküla lamellerinin net bir şekilde gözlenmesinin yanında, birer katman olarak prokütikülanın yapısı epikütiküla, ekzokütiküla ve endokütiküla katmanları belirmeye başladı. Epidermal hücrelerin çekirdekleri belirginleşmeye başladı (Şekil 4.9). 60. saatte epikütiküla, ekzo-endokütiküla farklılaşması ve endokütiküla lamelleri belirginleşti. 72. saatte epidermal hücrelerin apikal yüzeyinde prokütikülanın altında farklı bir tabaka olan interzon kütiküla görüldü. 84. saatte apoliz olayı ile beraber eski kütikülanın sindirilmeye başladığı ve yedinci evre kütikülasının şekillenmeye başladığı görüldü (Şekil 4.10 ve 4.11). 96. saate ait kesitlerde altıncı evre kütikülanın tamamı atıldı ve yedinci evre kütikülası gözlenmeye başlandı.

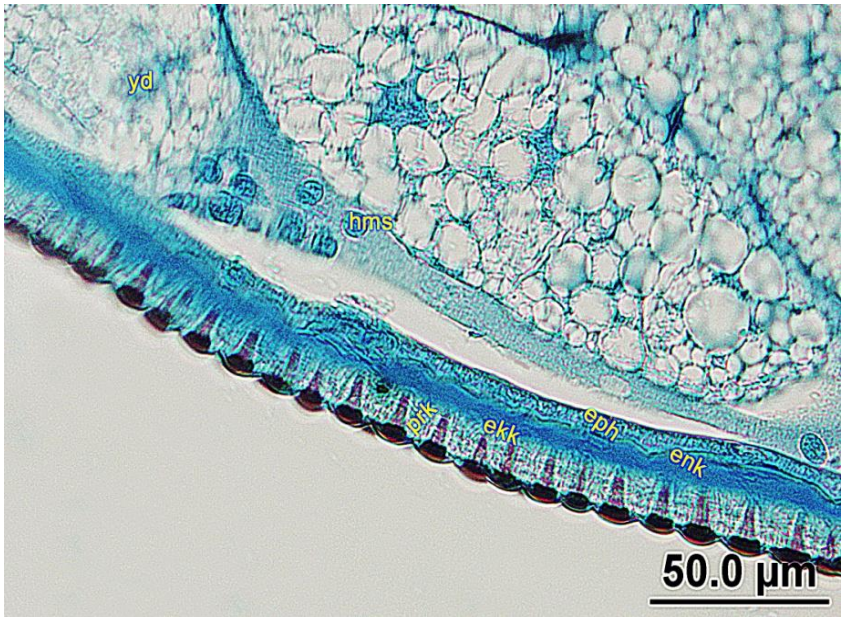
4.1.1.3. Larval kütiküla kalınlık ölçümleri

Altıncı evre kontrol grubu larvalarının dört tekerrürlü denemelerine ait histolojik kesitlerinden alınan kalınlık ölçümleri çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'de, bu değerlere ait ortalama kütiküla kalınlık verileri sonuçları çizelge 4.5 ve şekil 4.6'da görülmektedir. Buna göre kontrol grubunda ortalama kütiküla kalınlığının, zamana bağlı olarak 12. saatte 15.75 µm'den, 84. saatte 22.97 µm'ye ulaştığı görüldü. 96. saatte eski kütikülanın sindirilmeye başladığı, 108. saatte ise larvaların deri değiştirerek bir üst evreye geçtikleri gözlendi. Üst evreye geçen kontrol grubu larvalarına ait yedinci evre kütikülasındaki kalınlık artışının çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4' de görüldüğü gibi zamana bağlı olarak devam ettiği belirlendi.

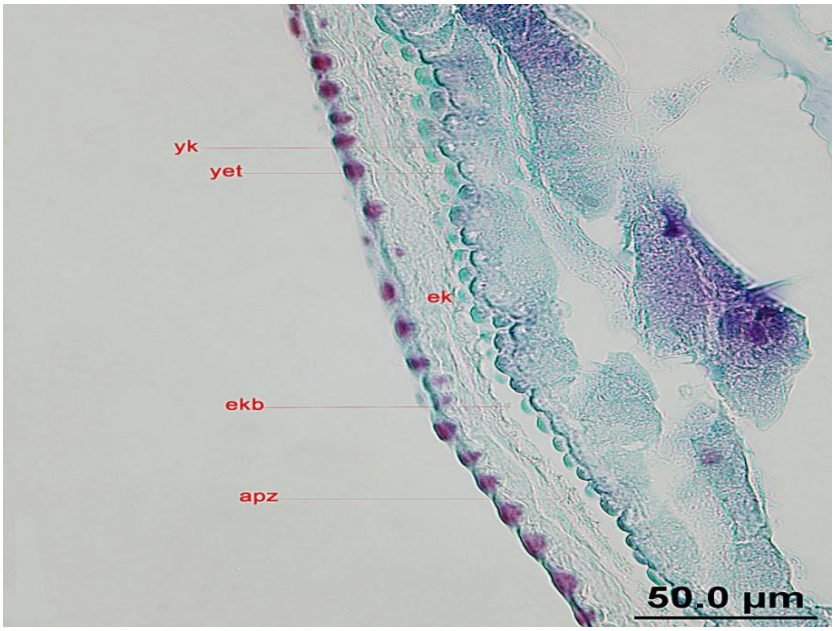
4.1.2. Neem Azal-T/S uygulanan altıncı evre *Galleria mellonella* larvalarına ait gözlemler

4.1.2.1. Neem Azal-T/S integümentin üzerindeki makroskobik etkileri

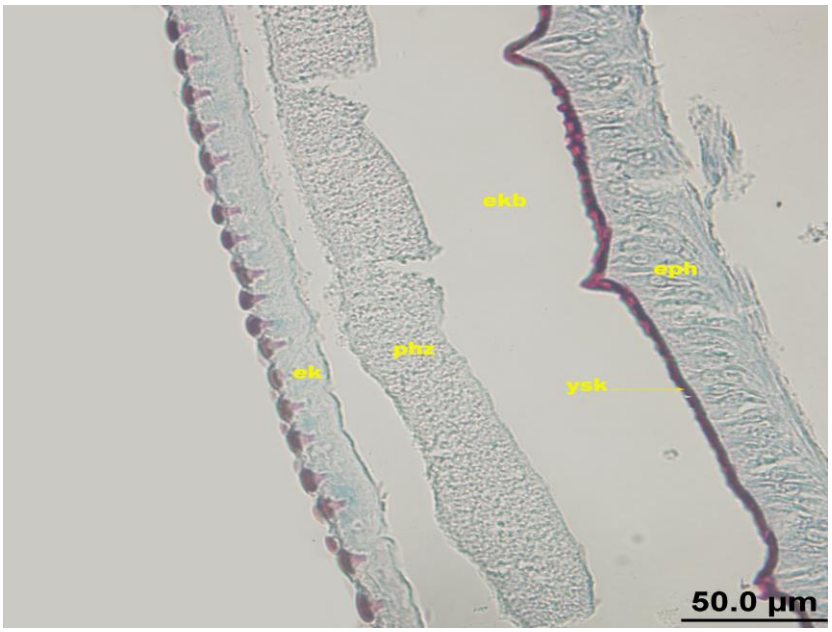
Neem Azal-T/S uygulanan deneme grubunda; 525 ppm'lik konsantrasyonda larvaların Neem Azal-T/S'den etkilenmesi 24. saatten itibaren başlarken, 1050, 2100 ve 4200 ppm'lik konsantrasyonlarda ise 12. saatten itibaren başladı (Şekil 4.12).



Şekil 4.9. Kontrol grubu larvalarında ekzo-endo kütikülanın belirginleşmeye başlaması görüldü (Azan boya, >50 µm).



Şekil 4.10. Kontrol grubu larvalarında apolizin oluşmasıyla eski kütikülanın ayrılması ve yedinci evreye ait kütikülanın sentezlenmeye başlaması görülmekte (Azorkarmin G- Anilin Blue, >50 µm).



Şekil 4. 11. Kontrol grubu larvalarından prokütiküladaki kitin içeriğin hidroliz edilmesi görülmekte(Azokarmin G-Anilin, >50 µm).

Çizelge 4.1. Kontrol grubu ve farklı Neem Azal-T/S dozları uygulanan altıncı evre *G. mellonella* L. larvalarının kütiküla kalınlıklarına ait birinci tekerrür değerleri (µm). (A.O. ± S.H.)

Zaman (saat) / Doz (ppm)	Kontrol kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	525 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	1050 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	2100 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	4200 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.
12	16.64±0.7*	16.24±0. 7*	15.51±0.6*	15.22±0.5*	14.81±0.5*
24	17.25±0.3*	16.90±0.6*	15.62±0. 8*	15.31±0.6*	14.89±0.4*
36	18.16±0.4*	17.42±0.9*	15.92±0.8*	15.47±0.6*	-
48	18.97±0.7*	17.75±0.6*	16.41±0.3*	15.56±0.6*	-
60	20.45±0.8*	18.12±0.7*	16.92±0.9*	15.60±0.3*	-
72	21.09±0.8*	18.78±0.5*	16.95±0.9*	-	-
84	23.41±0.7*	19.25±0.7*	-	-	-
96	14.68±0.3*#	9.25±0.3*#	-	-	-
108	16.74±1.1**	9.46±0.5**	-	-	-
120	18.74±0.9**	8.92±1.4**	-	-	-
132	19.74±1.2**	-	-	-	-

(*) Altıncı evre kütiküla kalınlığı
(*#) Altıncı evre ve yedinci evre kütikülası bir arada (eski kütiküla sindirilmeye çalışılmakta)
(**) Yedinci evre kütiküla kalınlığı
(-) Larval ölüm

Çizelge 4.2. Kontrol grubu ve farklı Neem Azal-T/S dozları uygulanan altıncı evre *G. mellonella* L. larvalarının kütiküla kalınlıklarına ait ikinci tekerrür değerleri (µm). (A.O. ± S.H.)

Zaman (saat) / Doz (ppm)	Kontrol kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	525 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	1050 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	2100 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	4200 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.
12	16.12±0.6*	15.87±0.4*	15.24±0.7*	15.06±0.5*	14.86±0.4*
24	17.24±0.3*	16.12±0.4*	15.59±0.4*	15.21±0.6*	14.94±0.4*
36	18.19±0.4*	16.77±0. 8*	15.87±0.9*	15.38±0.6*	-
48	19.24±0.6*	17.29±0.7*	16.23±0.9*	15.59±0.5*	-
60	21.01±0.6*	17.73±0.4*	16.67±0.8*	15.79±0.4*	-
72	23.71±0.9*	18.37±0.7*	16.65±0.5*	-	-
84	25.94±0.8*	18.99±0.4*	-	-	-
96	16.81±0.6*#	10.08±0.4*#	-	-	-
108	18.02±0.4**	10.61±0.8**	-	-	-
120	19.57±0.9**	10.73±1.4**	-	-	-
132	22.38±1.2**	-	-	-	-

(*) Altıncı evre kütiküla kalınlığı
(*#) Altıncı evre ve yedinci evre kütikülası bir arada (eski kütiküla sindirilmeye çalışılmakta)
(**) Yedinci evre kütiküla kalınlığı
(-) Larval ölüm

Çizelge 4.3 Kontrol grubu ve farklı Neem Azal-T/S dozları uygulanmış altıncı evre *G. mellonella* L. Larvalarının kütiküla kalınlıklarına ait üçüncü tekerrür değerleri (µm). (A.O. ± S.H.)

Zaman (saat) / Doz (ppm)	Kontrol kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	525 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	1050 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	2100 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	4200 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.
12	15.22±0.6*	14.71±0.7*	14.41±0.5*	14.31±0.4*	14.21±0.3*
24	16.13±0.2*	15.10±0.6*	14.86±0.3*	14.34±0.6*	14.29±0.3*
36	17.76±0.2*	15.40±0.7*	15.28±0.5*	14.40±0.6*	-
48	18.16±0.7*	15.78±0.7*	15.89±0.7*	14.72±0.4*	-
60	18.57±0.5*	16.01±0.6*	16.56±0.5*	14.99±0.8*	-
72	19.28±0.9*	16.49±0.8*	16.58±0.7*	-	-
84	21.31±0.7*	16.77±0.5*	-	-	-
96	14.79±0.4*#	10.17±1.8*#	-	-	-
108	16.18±0.1**	9.34±0.7**	-	-	-
120	17.22±0.6**	-	-	-	-
132	21.71±0.5**	-	-	-	-

(*) Altıncı evre kütiküla kalınlığı
(*#) Altıncı evre ve yedinci evre kütikülası bir arada (eski kütiküla sindirilmeye çalışılmakta)
(**) Yedinci evre kütiküla kalınlığı
(-) Larval ölüm

Çizelge 4.4. Kontrol grubu ve farklı Neem Azal-T/S dozları uygulanmış altıncı evre *G. mellonella* L. larvalarının kütiküla kalınlıklarına ait dördüncü tekerrür değerleri (µm). (A.O. ± S.H.)

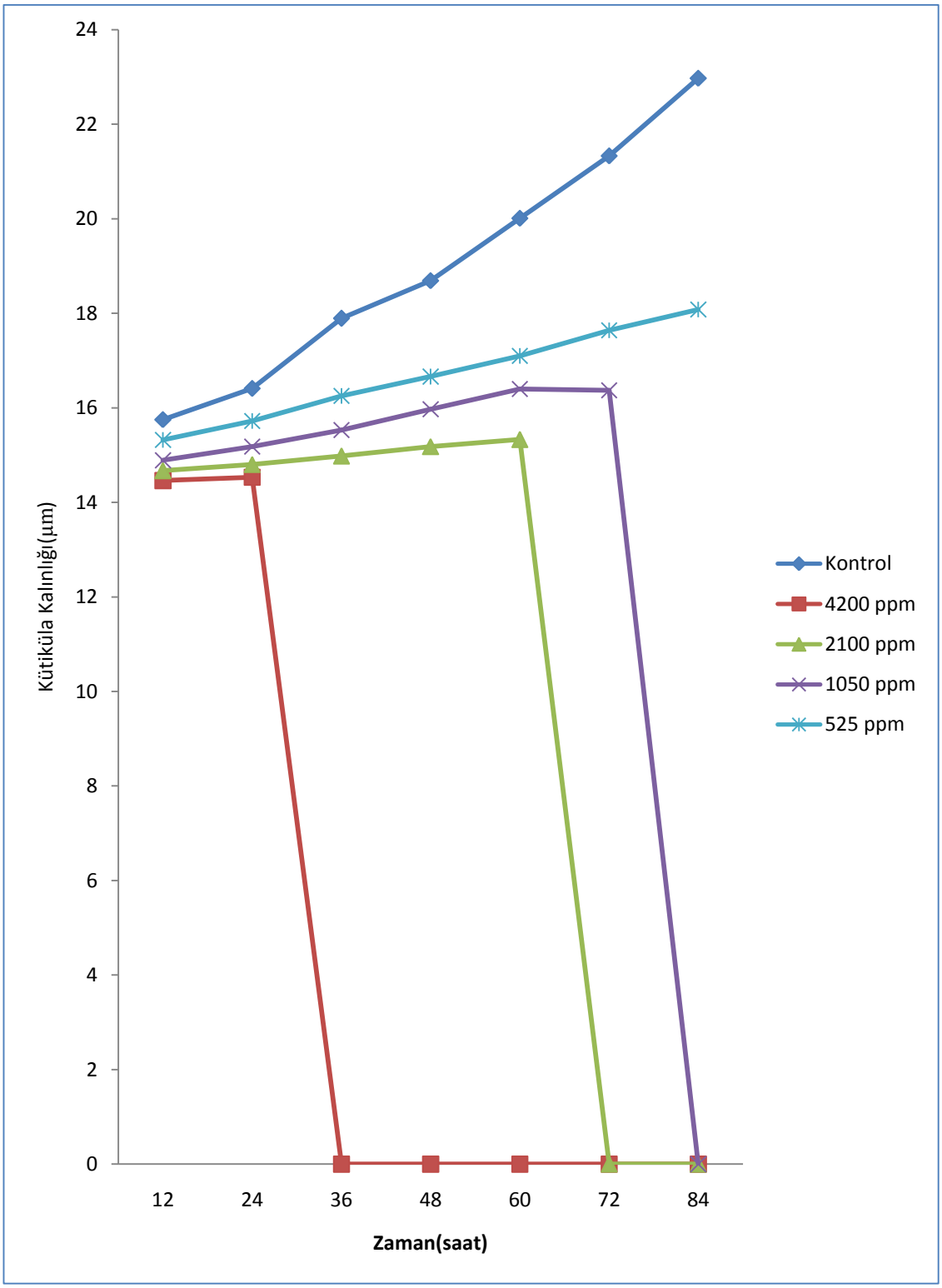
Zaman (saat) / Doz (ppm)	Kontrol kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	525 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	1050 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	2100 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.	4200 ppm kütiküla kalınlığı(µm) A.O.±S.H.
12	15.01±0.5*	14.47±0.5*	14.42±0.4*	14.10±0.4*	13.94±0.3*
24	16.16±0.3*	16.78±0.6*	14.67±0.2*	14.34±0.4*	14.01±0.3*
36	17.44±0.3*	15.40±0.4*	15.05±0.4*	14.68±0.3*	-
48	18.37±0.7*	15.83±0.6*	15.36±0.9*	14.86±0.7*	-
60	20.02±0.5*	16.48±0.5*	15.38±0.3*	14.94±0.2*	-
72	22.31±0.9*	16.98±0.5*	15.33±0.4*	-	-
84	23.46±0.6*	17.33±0.7*	-	-	-
96	14.93±0.2*#	10.08±0.3*#	-	-	-
108	16.29±0.7**	10.61±0.8**	-	-	-
120	18.67±1.6**	10.73±1.4**	-	-	-
132	21.33±0.6**	-	-	-	-

(*) Altıncı evre kütiküla kalınlığı
(*#) Altıncı evre ve yedinci evre kütikülası bir arada (eski kütiküla sindirilmeye çalışılmakta)
(**) Yedinci evre kütiküla kalınlığı
(-) Larval ölüm

Çizelge 4.5. Kontrol grubu ve farklı Neem Azal-T/S dozları uygulanmış altıncı evre *G. mellonella* L. larvalarının ortalama kütiküla kalınlıkları (µm). (A.O. ± S.H., on ölçümün dört tekrarı).

Zaman (saat) / Doz(ppm)	Kontrol	525 ppm	1050 ppm	2100 ppm	4200 ppm
12	15.75±0.4 [a]	15.32±0.4 [a]	14.89±0.3 [ab]	14.67±0.3 [bc]	14.46±0.2 [c]
24	16.41±0.3 [a]	15.72±0.5 [b]	15.18±0.3 [bc]	14.80±0.3 [c]	14.53±0.2 [d]
36	17.89±0.8 [a]	16.25±0.5 [ab]	15.53±0.2 [bc]	14.98±0.3 [c]	-
48	18.69±0.2 [a]	16.66±0.5 [ab]	15.97±0.2[bc]	15.18±0.2[c]	-
60	20.01±0.5 [a]	17.10±0.5 [a]	16.40±0.2 [b]	15.33±0.21[b]	-
72	21.33±0.7 [a]	17.64±0.5 [b]	16.37±0.2 [bc]	-	-
84	22.97±0.6 [a]	18.08±0.6 [b]	-	-	-

(a,b,c,d) Aynı satırda, aynı zaman diliminde, farklı dozların ortalama değerleri arasındaki frarkları önemlidir ($P<0.05$).



Çizelge 4. 6. Kontrol grubu ve farklı Neem Azal-T/S uygulanan altıncı evre *G. mellonella* larvalarının kütiküla kalınlıklarında tespit edilen doz/ cevap ilişkisi



Şekil 4.12. 1050 ppm dozunda Neem Azal-T/S uygulanmış altıncı evre *G. mellonella* larvasının integümentinde insektisitin etkisiyle 12. saatte meydan gelen kararma ve şişkinlik.

1050, 2100 ve 4200 ppm'lik konsantrasyonlarda ilerleyen saatlerde integümentte şişkinlikler, doku sıvısı kaybı, kanamalar ve kararmalar gözlendi.

525 ppm'lik konsantrasyon grubundaki larvaların gelişimleri kontrol grubuna parelel gitmekle beraber, bir kısmının altıncı evre derisini değiştirmede başarılı oldukları, diğerlerinin ise başarılı olamadıkları ancak her ikisininde zamana bağlı olarak 120-132. saatteler arasında ölümlerin gerçekleştiği gözlendi (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4).

Doz/cevap ilişkisine bağlı olarak; 1050 ppm'lik konsantrasyon grubundaki larvaların ölümü 72. saatte, 2100 ppm konsantrasyon grubundakilerin 60. saatte ve 4200 ppm konsantrasyon grubundaki larvaların ölümü ise 24. saatte gerçekleşti (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4). Uygulama yapılan tüm konsantrasyonlarda larval deri değiştirmeler başarısızlıkla sonuçlandı.

Uygulanan dört konsantrasyonda larvaların ölümlerinden önce, tüm larvalarda aynı oranda olmamakla beraber, hareketlerin yavaşladığı ve gelişimin inhibe olduğu gözlendi. Histolojik kesitler için alınan numuneler seçilirken, hareketlerinde yavaşlama ve integümentinde kararma olan larvalar tercih edildi.

4.1.2.2. Neem Azal-T/S'nin kütiküla kalınlığı üzerine etkileri

Kontrol grubu larvaları ile Neem Azal-T/S'nin altıncı evredeki larvalara uygulanan (525, 1050, 2100 ve 4200 ppm) konsantrasyonlarından elde edilen histolojik kesitlere ait kütiküla kalınlıkları 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'de, bu dozlara ait ortalama kütiküla kalınlıkları çizelge 4.5 ve görülmektedir. Kontrol gurubu larvaların dört tekerüründe de 84. saatte gelişimlerini tamamladıkları, 96. saatte eski kütikülanın hidrolize edildiği, 108. saatte bir üst evreye geçtikleri tespit edildiği için, altıncı evre kütiküla kalınlığına ait yapılacak ölçümlerde ilk 84. saat esas alındı (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3 4.4 ve 4.5).

Neem Azal-T/S'nin 525, 1050, 2100, ve 4200 ppm'lik bütün konsantrasyonları, kütiküla kalınlık artışında azalmaya sebep oldu ($P<0.05$).

Buna göre; 525 ppm'lik Neem Azal-T/S konsantrasyonunda 12 ve 60. saaatteki kütikülar kalınlık kontrol grubuna göre istatistiki düzeyde önemsiz olmasına rağmen ($P>0.05$), 84. saat sonunda bu konsantrasyonda oluşan kütikülar kalınlık (18.08 μm) kontrol grubunun değerine göre (22.97 μm) istatistiki olarak önemli düzeyde düşük idi ($P<0.05$) (Çizelge 4.5). Bu gruptaki tüm larvaların ölümü 132. saatte gerçekleşti.

1050 ppm'lik konsantrasyondaki kütikülar kalınlıkta ilk 12. saatteki etkilenme gerek kontrol, gerekse 525 ppm'lik konsantrasyonlardaki değerlere yakın olmasına rağmen; 24, 36, 48, 60 ve 72. saattlerde kütikülar kalınlıktaki azalma (16.37 μm) kontrol grubuna göre (21.33 μm) istatistiki düzeyde önemli bulundu ($P<0.05$). Doz/cevap ilişkisine bağlı olarak bu konsantrasyondaki larvaların tamamının 72. saatte ölümleri gerçekleşti.

2100 ppm'lik konsantrasyonda kütikülar kalınlıktaki etkilenme, ilk 12 ve son 60. saatte 1050 ppm'lik konsantrasyondaki etkilenmeye yakın değerde görüldü. Bununla beraber; 12-60. saatteki kütikülar kalınlıktaki azalma, kontrol grubuna göre önemliydi ($P<0.05$). 60 saat sonunda oluşan kütikülar kalınlık (15.33 μm) aynı saatteki kontrol grubuna göre (20.01 μm) istatistiki olarak önemli derecede düşük bulundu ($P<0.05$). Bu konsantrasyon grubunda bulunan larvaların hayat süreci, artan doz miktarına bağlı olarak 1050 ppm'lik konsantrasyondaki larvalardan daha kısaydı ve 60. saatte tüm larvaların ölümü gerçekleşti.

4200 ppm'lik konsantrasyondaki kütikülar kalınlıktaki etkilenme ilk 12 saatte 2100 ppm'le aynı idi. 24 saat sonunda ise, bulunan değer (14.53 μm) kontrol grubuna göre (16.41 μm) istatistiki olarak önemliydi ($P<0.05$). Bu gruptaki larvaların tamamının 24. saat sonunda ölümleri gerçekleşti.

Neem Azal-T/S uygulanan tüm konsantrasyonlarda kütiküla kalınlığına ait (525, 1050, 2100 ve 4200 ppm) bulunan değerler kontrol grubunkinden önemli derecede düşüktü ($P<0.05$). Artan doz/cevap ilişkisine bağlı olarak epidermal hücrelerin daha az sekresyon yapmasından dolayı 525 ppm'lik konsantrasyonda % 27, 1050 ppm'lik konsantrasyonda % 29, 2100 ppm'lik konsantrasyonda % 33 ve 4200 ppm'lik konsantrasyonda ise % 37'lik kütiküla sekresyonu azalmasına meydana geldi.

4.2. TARTIŞMA

Sağlıklı larvalarda altıncı evre *G. mellonella* larval integümentinin epidermal hücreler ve hücrelerin sekresyonuyla oluşan epikütiküka ile prokütiküladan ibaret olduğu gözlendi.

İntegümentin bu yapısı Lower (1956)'ın arthropodalar için yaptığı integüment tanımıyla, Hegazy ve ark (1980) *G. mellonella* larvalarının kütiküla yapısıyla ilgili elektron mikroskobik düzeyde çalışmalardan elde ettikleri sonuçlarla benzerdi. Sağlıklı larvalarda pre-ecdysial dönemde öncelikle epikütiküla, ekzokütiküla oluşumu; post-ecdysial dönemde ise endokütikülanın epidermal hücreler tarafından sentezlendiği yönündeki gözlemimiz Retnakaran (1985) gözlemleriyle aynı idi. Post-ecdysial dönemdeki endokütikülanın epidermal hücreler tarafından sentezlendiği, endokütikülar birikimin bir sonraki evreye kadar endokütikülar lamel birikimi şeklinde devam ettiği gözlemlerimizin benzerini Bastorus ve ark (1971) *Spodoptera littoralis* larvalarında, Lee ve ark (1990) *Spodoptera littoralis* larvalarında, Yin-Chang ve ark (1990) *Agrotis ypsilon* ve *Agrotis tokionis* (Bulter) larvalarında gözlemlemişler, endokütikülar lamellerin intermoult periyodu süresince prokütikülaya ilavesinin yapıldığını ifade etmişlerdir.

Böcek integümenti, böceklerin dış iskeletini oluşturmasının yanında kendisi ve çevresi arasında bir arayüz oluşturur. İntegümentin esasını kütiküla meydana getirir. Kütikülanın önemli bileşenlerinden birisi evrende sadece crustacea, mantar, protozoon, arthropoda ve böceklerde bulunan kitin maddesidir. Kitin, memeliler ve yüksek yapılı bitkilerde yoktur (Tunaz ve Uygun, 2004). Kitin, seçici insektisitler için hedef ve maruz kalan bölgedir (Hajjar, 1985).

1950'lerin sonlarında böcek zararlılarını kontrol amaçlı farklı nörotoksik insektisitler geliştirilmiştir. Geliştirilen bu bileşikler ekonomik olarak başarılı sonuçlar vermesine ve geniş spektrumlu olmalarına rağmen; hedef olmayan canlılara, çevreye, hem üretici hem de tüketicilere zararlı olmuşlar, buna ek olarak böcekler bu insektisitlere karşı direnç geliştirmişlerdir. Geleneksel insektisitlerin sonradan oluşan etkilerinden dolayı çevreye duyarlı, yiyecekler üzerinde güvenli olan IGR (Insect Grow Regulator)'ler ve bunun içerisinde önemli bir sınıf olan CSI (Chitin Synthesis Inhibitor)'ler geliştirilmiştir (Mommaerts, 2006).

IGR'ler seçici aktivasyon göstermeleri ve çevreye uyumlu olmalarıyla diğer insektisitlerden farklıdırlar. Böceğin hem embriyonik hem de postembriyonik gelişimini, üremesini engelleyerek onların ölümüne sebep olurlar ve böcekler üzerinde normal olmayan morfojenik oluşumlara yol açarak etki gösterirler (Mondial ve Parween, 2000).

IGR'lerin bir sınıfı olan CSI'ler böceklerde kitin biyosentezini engeller (Gijswist ve ark 1979), bu yüzden deri değişimine engel olurlar (Hommock ve Quistad, 1981). Bu bileşikler böceğin gelişmesi için gereken yaşam döngüsü üzerine baskılayıcı etki yaparlar (Verlloop ve Ferrel, 1977).

Bir IGR olarak azadirachtin ve azadirachtin türevi maddelerin (Mordue (Luntz) ve Blackwell, 1993; Tunaz ve Uygun, 2004) böcekler üzerindeki etki mekanizmaları acylurea grubuna giren kitin sentez inhibitörleriyle (Ascher, 1993), benzoylurea grubuna giren insektisitlerle benzerdir (Schumutterer, 1988) ve azadirachtin ecdysone antagonisti olmasının yanında aynı zamanda bir kitin sentez inhibitörüdür (Schumutterer, 1988; Cassier ve ark 1988).

Önceki çalışmalarda azadirachtin ve azadirachtin türevi bileşiklerin morfolojik, toksikolojik ve ekdizon hormonu rolüyle ilgili çalışmalara (Dorn ve ark, 1986; Mordue (Luntz) ve Blackwell, 1993; Riba ve ark, 2003) sıklıkla rastlanmasına rağmen, CSI rolüyle ilgili literatür kayıtlarına ender olarak rastlanmıştır. Bu yüzden bu çalışmada Neem Azal-T/S'nin etkileri bilinen CSI'lerle karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmada Neem Azal-T/S'nin probit analiz yöntemi ile altıncı evre *G. mellonella* larvaları için LC_{95} dozu 4200 ppm olarak tespit edildi. Aynı zamanda, bu maddenin 4200 ppm'lik dozlarıyla beraber bunun azalan konsantrasyonları olan 2100, 1050 ve 525 ppm'lik oranları kullanıldı. Bu dört farklı konsantrasyonun, altıncı evre *G. mellonella* larval integümenti üzerine farklı morfojenik ve histolojik etkileri gözlendi. Neem Azal-T/S uygulanan 525 ppm'lik konsantrasyonda larvaların insektisitten morfolojik olarak etkilenmesi 24. saatten; 1050, 2100 ve 4200 ppm'lik konsantrasyonda ise 12. saatten itibaren başladı. İnsektisitten etkilenen larvaların besin alma istekleri artan doz miktarına bağlı olarak azaldı. Yine uygulanan dört farklı konsantrasyonda larvaların ölümünden önce, tüm larvalarda aynı oranda olmamakla beraber gelişimlerinin inhibisyonu ve hareketlerinde yavaşlama gözlendi. Kullanılan konsatrasyona ve zamana bağlı olarak larval integümentte şişkinlikler, doku sıvısı kaybı, kanamalar ve kararmalarla beraber larva ölümleri gözlendi.

525 ppm'lik konsantrasyon gruubundaki larvaların ölümleri 132., 1050'de 72., 2100'de 60. ve 4200 ppm'lik konsantrasyon grubundakilerinse 24. saatte gerçekleşti.

Welling ve ark (1973), Fox (1990) CSI'lerin temelde mide zehiri olduğunu ve aynı zamanda holometabol böceklerin erken evrelerinde etkili olduklarını ifade etmişlerdir. Mitsui ve ark (1980) CSI uygulanan larvalarda beslenmenin azaldığını, büyümenin yavaşladığını, Retnakaran ve ark (1980) integümentteki toksik etkinin şiddetinin kullanılan insektisitin dozuna ve uygulama yapılan böceğin türüne bağlı olduğunu, Parween (1996) CSI'lerle muamele edilen böceklerin ağırlık kaybına uğradığını ve integümentlerinin gevşemeye başlayıp hareketlerinin durduğunu, integümentteki kararmayla beraber ölümlerinin gerçekleştiğini ifade etmişlerdir.

CSI'ler deri değiştirme sürecini bozduklarından dolayı, metamorfik hasarlara yol açmaktadır (Gujar ve Metrota, 1989). İnsektisitten etkilenen böcekler yeni kütiküla sentezini gerçekleştiremeyip eski deriyi atmayı başaramamaktadırlar (Reynolds, 1987). Ölüm sebebi ya eski deriyi atamamaktan (Olviatsu ve ark 1991), ya da eski deriyi atmaya çalışırken meydana gelen sıvı kaybından (Mulder ve Gijtswigt, 1973) olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ker (1978) bu olayı kütikülanın kitin yokluğundan dolayı ciddi bir şekilde zayıflamasına bağlamıştır.

Neem Azal-T/S'nin uygulanan farklı konsantrasyonlarının (525, 1050, 2100 ve 4200 ppm) tamamının prokütiküladaki endokütikülar lamellerin şekillenmesi üzerine etkili oldukları ($P<0,05$) ve buna bağlı olarak kütiküla kalınlığında, kontrol grubuna göre 525 ppm'lik konsantrasyonda % 27, 1050 ppm'lik konsantrasyonda % 29, 2100 ppm'lik konsantrasyonda % 33 ve 4200 ppm'lik konsantrasyonda ise % 37'lik oranda azalmaya sebeb oldukları gözlendi. Bu durumu, Neem Azal-T/S'den etkilenen epidermal hücrelerin kütiküla sekresyonunun bloke edilmesi sonucunda kitin sentezinin engellenmesiyle açıklamak mümkündür.

Bu sonuçlar üre tabanlı CSI'lerle yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla uyumludur. Bellinato ve ark (2009) *Manduca sexta* larvalarına triflumuron uygulamasında kitin mikrofibril oluşumunun tamamen engellendiğini, El-Shazly (2002) *Culex pipiens* larvalarına triflumuron uygulaması sonucunda, uygulama yapılan larvalarda oluşan kütikülanın endokütikülar lamellerden yoksun olduğunu, Deghele (1990) kitin biyosentezinin tamamen durdurduğunu açıklamışlardır.

Bu çalışmada elde edilen histolojik bulgular post-ecdysial kütikülada Neem Azal-T/S'nin farklı konsantrasyonlarının endokütikülar lamel birikimini engellediğini gösterdi. Endokütikülar lamellerin sentezlenmesinin baskılanmasına bağlı olarak

çalışmada kütiküla kalınlığında tespit edilen azalmayı, Rehimi ve Soltani (1999) *Culex pipiens* larvalarının prokütikülasında % 37-41, Soltani ve ark (1996) *Tenebrio molitor* pupalarında % 10-40, Tong ve Hui (2004) *Musca domestica* larvlarında % 22.6-46.3 oranında bulmuşlardır.

Azadirachtin türevli bir insektisit olan Neem Azal-T/S'nin altıncı evre *Galleria mellonella* larvalarının larval integümenti üzerindeki gerek morfolojik gereksede histolojik bulgular, bu maddenin bilinen klasik CSI'lerle benzer etki gösterdiğini ve etki şeklinin kitin biyosentezinin engellenmesi yoluyla gerçekleşebileceği sonucuna varılmıştır.

5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Dünya nüfusunun hızla artması, buna karşılık tarıma elverişli alanların sabit kalması; hatta iklim değişiklikleri ve çölleşmeyle beraber bu alanların kaybı, hasat öncesi ve sonrası % 30 oranında ürün kaybına sebep olan zararlılarla mücadeleyi zorunlu kılmaktadır. Pestisit uygulamalarında kullanılan miktarın % 0.1'lik bölümü hedef organizmaya ulaşırken, diğer bölümü ekosisteme karışmakta ve ekosistemde süregelen dengelerin bozulmasına neden olmaktadır. Bunun yanısıra sentetik insektisitler zamanla faydalı organizmalara ve memelilerde toksitiye, kanser riskine ve hatta öldürücü etkiye neden olmakla birlikte; hedef alınan zararlılarda direnç oluşmasına, önemli olmayan bazı zararlıların ana zararlı konumuna geçmesine, yararlıların ve doğal hayatın yok edilmesiyle doğal dengeninde bozulmasına ve bitkilerde fitotoksiteye sebep olmaktadır. Bu bağlamda üründen maksimum derecede verim elde etmek ve bunu yaparken de doğla dengeye zarar vermemenin ne kadar önemli olduğu görülmektedir.

Verimi artırmak adına yapılan kimyasal mücadele insan sağlığı ve doğal yaşama büyük zararlar verdiği artık bilinen bir gerçektir. Bu sebeple tarımsal zararlılarla savaş ta eğilim, alternatif maddelerin arayışına yönelmiştir. Bu da doğal yollarla dekompoze olabilen; çevreye, insanlara ve hayvanlara toksik etkisi bulunmayan bitkisel kökenli insektisitlere olan ilgiyi artırmış ve son yıllarda organik tarımla birlikte bu konudaki çalışmalar daha da yoğunluk kazanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan Neem Azal-T/S, Neem ağacı olarak bilinen *A. indica'*nın tohumundan çıkarılan azadirachtin ekstraktından elde edilmektedir. Böcekleri uzaklaştırıcı etkisinin fark edilmesiyle insektisit olarak ta kullanılmaya başlanmıştır. Bitkisel kökenli olmasından dolayı çevreye herhangi bir kalıntı bırakmamakta, insanlara ve diğer canlılara zarar verecek herhangi bir toksik madde içermemektedir. Yapılan çalışmalar da bunu doğrulamaktadır.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, farklı konsatrasyonlarda besine ilave edilen Neem Azal-T/S *G. mellonella* larvalarının gelişimi için gerekli olan kitin sentezini inhibe edip metamorfozunu engelleyerek onun yaşam döngüsünü kesintiye uğratmaktadır.

Sonuç olarak; Neem Azal-T/S uygulaması canlının gelişimi için gerekli olan kitin biyosentezini engelleyerek, onun deri değiştirmesini ve dolayısıyla gelişimini

olumsuz yönde etkilemektedir. Bu da azadirachtinin zararlı türlerle mücadelede ve biyolojik kontrol programlarında kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

Adel, M. M., Sehnal, F., 2000, Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*. *Journal of Insect Physiology* 46 (3), 267-274.

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. *Zoology Angew Entomolgy,* 74, 170-177.

Andersen, S. O., 1979, Biochemistry of insect cuticle. *Annual Review of Entomology* 24, 29-61.

Ascher, K.R.S., 1981, Some physical properties and biological effects of a dried methanolic neem seed kernel extract. In: Proceedings of 1st International Neem Conference. Rottach Eern, 63–74.

Ascher, K. R. S., 1993, Nonconventional insecticidal effects pesticides available from neem tree, *Azadirachta indica. Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 22, 433-449.

Awad, T. I., Onder, F., Kısmalı, Ş. 1998, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) ağacından elde edilen doğal pestisitler üzerinde bir inceleme. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 22 (3), 225-240.

Bastourous, M. W., Hammad, S., Abdellatif, M. A., 1971, Morphological and histological studies on some stages of *cotton leafworm*, *Spodeptera littoralis* (Boisd.) L. The integument and related structures. *Zoology Angew Entomology* 68, 423-426.

Belinato, T. A., Martins, A. J., Lima-Camara, T. N., Peixoto, A. A., Vale, D., 2009, Effect of the chitin systhesis inhibitor Triflumuron on the development, viability and reprodoction of *Aedes aegyoti*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 104 (1), 43-47.

Butterworth J.H., Morgan E. D., 1971, Investigation of the locust feeding inhibition of the seeds of the neem tree, *Azadirachtin indica. Journal of Insect Physiology*, 17 (6), 969–977.

Cassier P., Baghdassarian-Chalaye D., Besse N., Papilion M., Baldaia L, Porcheron P., 1988, Ecdysteroids and activation of epidermal cells in locust. *Journal Insect Physiology*, 34 (7), 669-677.

Clarke, B. S., Jewess, P. J., 1990, The inhibitior of chitin synthesis in *Spoodoptera littoralis* larvae by flufenoxuron, teflubenzuron and diflubenzuron. *Pesticide Science*, 28, 377-388.

Coats, J. R., 1994, Risks from natural versus synthetic insecticides. *Annual Review of Entomology*, 39, 489-515.

Cymborowski, B., 2000, Temperature-dependent regulatory mechanism of larval development of the wax moth (*Galleria mellonella*). *Acta Biochimica Polonica.* 47 (1), 215-221.

Degheele, D., 1990, Chitin synhesis inibitors: effect on cuticle structure and components, ın J. E. Casida (ed) Pesticides and Alternatives, 377-388.

Durmuşoğlu, E., Karsavuran, Y., Ozgen, L., Güncan, A., 2003, Effects of two different neem products on different stages of *Nezara viridula* (L.) (Hymenoptera: Pentatomidae). *Journal of Pesticide Science*, 76, 151-154.

Dorn, A. J. M., Redemacher, E., Sehen, 1986, Effecets of azadirachtin on the moulting cycle, endocrine system, and ovaries in last-instar larvae of the milkweed bug, *Oncapeltus fasciatus. Journal Insect physiol*ogy, 32 (3), 231-238.

El-Shazly, M. M., Rafaie, B., 2002, Larvicidal effect of chitin sythesis inhibitor Triflumuron on *Culex pipens*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18 (4), 321-328.

Erinç, M., Ayvalı, C., 1989, Histopathological effects of some insetcides on the midgut of *Agrotis segetum* (Denis and Schiff) (Lepidoptera :Noctuidae). *Seker dergisi*, 35 (124), 22.

Fox, P., 1990, Insect Growth regulators, PJB Publ. Ltd. Richmond. 102.

Garcia, E. S. Rembold, H., 1984, Effects of Azadirachtin on Ecdysis of *Rhodnius prolixus. Journal Insect Physiology*, 30 (12), 939-941.

Gijswijt, M. J., Deul, D. H., Dejong, B. J., 1979, Inhiibition of chitin synthesis by benzoyl-phenylurea insecticides, III. Similarity in action in *Pieris brassicia* (L.) with Polyoxin D. *Journal Pesticid Biochemistry Physiology*, 12(1), 87-94.

Göçmen, H., Topakçı, N., İtken C., 2007, Pamuk beyazsineği *Bemisia tabaci* (Germ) (Homoptera:Aleyrodidae)'ye karşı azadirachtin'in etkinliği üzerine bir araştırma. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20 (1), 119–126.

Gujar, G. T., Metrotra, K. N., 1989, Effect of the four chitin synthesis inhibitor on the red cotton bug, *Dysdercus koengii* fabricius, *Journal of Entomology*, 14 (1-2), 71-73.

Gülpınar, V., 2005, Bal arısı hastalık ve zararlıları. *Teknik Arıcılık*. 87, 2- 7.

Güncan, A., Durmuşoğlu E., Yoldaş Z., 2005, Bazı doğal organik insektisitlerin *Encarsia formosa* (Gahan) (Hymenoptera:Aphelinidae) pupalarına etkileri üzerinde araştırmalar. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 42 (2), 57-64.

Hajjar N. P., 1985, Insecticides. (Hutson, D. H., Roberts, T. R., Eds), John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, 275-310.

Hammock, B. D., Quıstad G. B., 1981, Metabolism and mode of action of juvenile hormone, juvenoids, and other insect growth regulators. In Progress in Pesticide Biochemistry (Ed). Hutson D. H. and Roberts T. R., 1, 1-82.

Hegazy, G., Degheele, D., 1980, Effect of the chitin systhesis inhibitor Diflubenzuron on the sixth and seventh instars of *G. Mellonella* L., Important of application time. *Medical Factor Landbouww Rijksuniv Gent*, 45 (3), 453-464.

Howatt, K., 1994, Azadirachta indica: One tree's arsenal against pests. www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers/howatt.html.

Huang, Z., Shi, P., Dai, J., Du, J., 2004, Protein metabolism in spodeptera litura (F.) is influenced by the botanical insectide azadirachtin. *Pesticide biochemestry and Physiology*, 80, 85-93.

Isman, M. B., 2006, Botanical insecticides, Deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51, 45-66.

Jacobson, M., 1989, Focus on phytochemical pesticides, Vol.1. The neem tree. Boca Raton. CRC Press, 178 .

Karnavar, M., 1987, Influence of azadirachtin on insect nutrition and reproduction. *Proceedings Indian Academic Science* 96, 341- 347

Ker, R. F., 1978, The effects of diflubnezuron on the growth of insect cuticle. *Pesticide Science*, 9, 259-265.

Kısmalı, Ş.N., Madanlar, N., 1988, *Azadirachta indica*; böceklere etkileri üzerinde bir inceleme. *Türk.Entomoloji Dergisi*, 12 (4), 239-249.

Koul, O., Amanai K., Ohtaki T., 1987, Effect of azadirachtin on the endocrine events of *Bombyx mori*. *Journal of insect physiology*, 33 (2), 103-108.

Koul, O., Isman B., Ketkar C. M., 1990, Properties and uses of neem *Azadirachta indica*. *Canadian Journal of Botany*, 68 (1) 1-11.

Lee, S. A., Clarke, B. S., Jenner, D. W., Williamson, F. A., 1990, Cytochemical demostration of the effects of the acylureas flufenoxuron and diflubenzuron on the incorporation of chitin into insect cuticle. *Pesticide Science*, 28 (4), 367-375.

Liu, S. Q., Shi, J. J., Cao, H., Jia, F. B., Liu, X. Q., Shi, G. L., 2000, Survey of pesticidal component in plant. In: Dianmo, L. (Ed.), Entomology in China in 21st Century. Proceedings of 2000 Conference of Chinese Entomological Society, *Science and Technique Press, Beijing*, China. 1098–1104.

Lower, H. F., 1956, Terminology of insect integument. *Nature*, 198, 1355-1356.

Luik, A., Viidalep, V., 2001, On different modes of action of Neem Azal T/S in *cabbage butterfly*. (In Metspalu, L., Mitt, Sceds). Practice oriented results on the use of plant exracts and pheromones in pest control. (Editors Metspalu L. And S. Mitt) Proc. Int. Workshop, Tartu, Estonia, January 24-25, 68-72.

Malczeewska, M., Gelman, D.B., Cymborowski, B., 1988, Effect of azadirachtin on development, juvenile hormone and ecdysteroid titres in 37 Chilled *Galleria mellonella* Larvae. *Journal of Insect Physiology*, 34 (7), 725-732.

Mark, A,, Barnby, James A. K., 1987, Effects of azadirachtin on the nutrition and development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabr.) (Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*, 33 (2), 69-75.

Mert, G., Yücel B., Köseoğlu M., 2007, Bal arısı hastalık ve zararlıları ile organik mücadele yöntemi. *Hasat Hayvancılık Dergisi*, 261-263.

Miller, F, Uetz, S., 1998, Evaluating biorational pesticides for controlling arthropod pests and their phytotoxic effects on greenhouse crops. *Hort Technology Journal* 8 (2), 185-192.

Mitsui, T., Nobusawa, C., Fukami, J., Colisns, J., Riddiford, L., M., 1980, Inhibition of chitin synthesis by diflubenzuron in Manduca larvae. *Journal Pesticide Science* 5, 335-341.

Mommaerts, V., Sterk, G., Smagghe, G., 2006, Hazards and uptaje of chitin synthesis inhibitor in bumble bee *Bombus terrestris*. *Pest Management Science*, 62, 752-785.

Mondial, K. A. M. S. H., Parween, S., 2000, Insect growth regulators and their potential in the management of stored-product insect pests. *Insect Pest Management Review*, 5, 255-295.

Mordue (Luntz), A. J., Blackwell, A., 1993, Azadirachtin: an Update. *Journal of insect physiology*, 39, 903-924.

Mulder, R., Gijstwigt, M. J., 1973, The laboratory evaluation of promising new insceticides which interfere with cuticle deposition. *Pesticide Science*, 4, 737-745.

Nesbitt, J. N., 1970, Structural aspects of penetration throught insect cuticles. *Pesticide Science*, 1, 204-208.

Olviatsu, M., Yoshida, K., Toki, T., 1991, Development of malformed larvae induced by a benzoylphenly urea insecticide, Triflumuron in the common cutworm *Spodoptera litura* (Fabricus). *Journal of Pesticide Science*, 16, 189-194.

Parween, S., 1996, The effect of Triflumuron on öalathion susceptible (FSS II) and malathion-resistant (CTC 12) strains of Tribolium castaneum Herbsst, 229, Ph.D. thesis, University of Newcastle upon Tyne, U.K., 229.

Plapp, F. W., 1984, The genetic basis of insecticide resistance in the housefly: Evidence that a single locus plays a major role in metabolic resistance to insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 22, 194.

Rehimi, N., Soltani, N., 1999, Laboratory evaluation of alysytin, a chitin synthesis inhibitor, aganist *Culex pipens* (Diptera: Culicidae) effects on development and cuticle secretion, *Journal Applied Entomology*, 123, 437-441.

Rembold H., 1984, Secondary plant products in insect control, withspecial reference to the azadirachtins. In: Engelsw (ed) Advances in invertebrate reproduction 3. Elsevier, Amsterdam, 481-491.

Rembold, H, Uhl M., Muller T., 1987, Effects of azadirachtin A on hormone titres during the gonadotrophic cycle of *Locusta migratoria*. In: H. Schmutterer H, Ascher KRS (eds), Proceedings of the 3rd International Neem Conference 10-15 July, GTZ Eschborn, 289-298.

Retnakaran, A., Granett, J., Enis, T., 1985, Insect growth regulators. In: Comphrehensive insect biochemistry, physiology and pharmacology, (ed) by Kerkut, G.A., Gilbery, L.I. Oxford, Pergamon Pres, 12, 530-601.

Reynolds, S. E., 1987, The cuticle, growht and moulting in insect, the essential background to the action of acylurea insectides. *Pesticide Science*, 20, 131-146.

Rharrabe, K., Amri, H., Bouayad N., Sayah F., 2008, Effects of azadirachtin on post-embryonic development, energy reserves and α-amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) *Journal of stored products research* 44 (3) , 290-294.

Riba, M., Marti, J., Sans, A., 2003, Influence of azadirachtin on development and reproduction of *Nezara viridula* L. *Journal of Applied Entomology*, 127 (1), 37–41.

Schneider, M. I., Smsgghe G., Pineda S., 2004, Action of insect growth regulator insecticides and spinosad on life history parameters and absorption in third-instar larvae of the endoparasitoid *Hyposoter didymator*. *Biological Control*, 31 (2), 189-198.

Schmutterer, H., 1988, Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. *Journal Insect Physiology*, 34, 713-719.

Schumutterer, H., 1990, Properties and potential of natural pesticides from Neem tree *Azadiarchta indica*. *Annual Review of Entomology*, 35, 271-297.

Schmutterer, H, Singh, R. P., 1995, List of insect pests susceptible to neem products. In: Schmutterer H (eds), The neem Tree *Azadirachta indica* A. Juss. and Other meliaceous Plants, VCH, Weinheim, 326-365.

Schmutterer, H., 1997, Side-effects of Neem (Azadirachta indica) Products on Insect Pathogens and Natural Enemies of Spider Mites and Insects. *Journal of Applied Entomology*, 121, 121-128.

Soltani, N., Delachambre., 1996, Evaulation of triflumuron, benzoylphenly urea derivative on *Tenebrio molitor* pupae (Coleoptera:Tenebrionidae): effects on cuticle. *Journal Applied Entomology*, 120 (10), 627-629.

Tang, Y. Q., Weathersbee A., A., Mayer R. T., 2002, Effects of neem seed extract on the Brown Citrus Aphid (Homoptera:Aphiididae). *Environmental Entomology,* 31 (1), 172-176.

Tong, Z., Hui, Y., 2004, Effecets of Trifumuron on the ingredients in the cuticle and hormone titers of housefly larvae. *Acta Parasit Medical Entomologica sinicia*, 11 (3), 174-178.

Tunaz, H., Uygun, N., 2004, Insect growth regulators for insect pest control. *Tübitak-Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 28, 377-387.

Tutkun, E., Çakmakçı, L., Boşgelmez A., 1987, Bal arısı kolonilerinde *Bacillus thuringiensis* preparatlarının büyük mum güvesi (*G. Mellonella*) larvalarına karşı kullanım olanakları üzerinde arastırmalar. TÜBTAK, Tarım ve Ormancılık Aratırma Grubu, Tarımsal Mikrobiyoloji Ünitesi Proje no: Tarmik-8–34 s.

Unal, S., Akkuzu E., 2009, Larvaecidal effects of azadirachtin on the pine processionary Moth. *African Journal of Biotechnology,* 8 (19), 5128-5131.

Ünsal, S., Ayvalı, C., 1989, *Agrotis segetum* larvasında integümentin histolojik yapısı üzerine araştırmalar. *S.Ü. Fen Dergisi*, 9, 51-76.

Verloop, A., C. D., Ferrell, 1977, Benzoylphenyl urcas - a new group of larvicides interferring with chitin deposition. American Chemical Society Symposium Series 37, 237-270.

Walter, J. F., 1999, Commercial experience with neem products. In: Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.), Method in Biotechnology 5: Biopesticides. Human Press, Totowa, NJ, 155–170.

Weathersbee A. A., Mc Kenzie, C. L., 2005, Effect of a neem biopesticide on repellency, mortality, oviposition, and development of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). *Florida Entomologist*, 88, 401–407.

Welling, E.C., 1973, A massive migration of Kricogonia (Pieridae) in Campeche, Mexico. *Journal of the Lepidopterists' Society*, 27 (2), 154-155.

Wigglesworth, V. B., 1974, The ppinciples of insect physiology. Chapman and Hall, Seventh edition London. 27-49, 61-83, 485-494.

Yin-Chang, W., Rong-sheng, C., Chang-Kun, C., Zi-Ping, Y., 1990, Studies cuticular structures in two species of cutworms. *Acta Entomologia Sinica*, 33 (3), 309-313.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Hakan SART
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Karaman 27.11.1980
Telefon	**:**	0332 223 6323
Faks	**:**	
e-mail	**:**	premolar_bjk@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	**Karaman lisesi, Merkez-Karaman**	**1997**
Üniversite	:	**Selçuk Üniversitesi Konya**	**2004**
Yüksek Lisans	:	**Selçuk Üniversitesi Konya**	**2014**
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
5	**N.E. Üni. Meram Tıp Fak. Hastanesi**	**Biyolog**

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER: ingilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR