T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NEEM' İN 5. EVRE *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) LARVALARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Emine GÜNER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
Konya, 2009

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**NEEM' in 5. EVRE *Galleria mellonella* L.
(Lepidoptera:Pyralidae) LARVALARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Emine GÜNER

**Selçuk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı**

Danışman: Yrd. Doç.Dr. Sadettin ÜNSAL

**Jüri: Prof.Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK
Prof.Dr. Yusuf DURAK
Yrd.Doç.Dr. Sadettin ÜNSAL**

2009, 58 Sayfa

Bu çalışmada organik bir pestisit olan azadirachtin'in beşinci evre *Galleria mellonella* L. Larvalarının üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırmada kullanılan NEEM 'in *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki etkilerini gözlemlemek için öncelikle LC95 dozu hesaplanmıştır. Hesaplamada 10 ppm den başlayıp kademeli yükselen ppm değerlerinde tekrarlı deneyler yapılmıştır. Yapılan deneylerde 1500 ppm ve yukarısında repellent etki gözlemlenmiştir, 1500 ppm ve aşağısında ise paralize etki gözlemlenmiştir. Polo plus programından faydalanılarak azadiractin'in 5. evre *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki LC95 dozu 3991 ppm olarak tespit edilmiştir. Araştırmada etkileri daha iyi gözlemleyebilmek için bulunan LC95 dozun azalan değerleri kullanılmıştır. Larvalar 498, 997, 1995 ve 3991 ppm azadirachtin içeren yarı sentetik besinle beslendiği zaman azadiractin'in integüment üzerine birçok etkisi gözlenmiştir. Azadirachtin'in kütiküla kalınlığı üzerindeki inceltici etkisi olduğu tespit edilmiştir. Azadirachtin uygulanan larvalarda kütiküla kalınlığı kontrol gurubuna oranla azalmıştır, bunun yanı sıra doz yükseldikçe larvaların bir üst evreye geçiş süresi uzamış 1995 ve 3991 ppm lerde öldürücü etkileri gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Galleria mellonella*, büyük kovan güvesi, azadirachtin, integüment, kütiküla.

ABSTRACT

MS Thesis

THE EFFECT OF NEEM's 5th İNSTAR ON The Greater Wax Moth's *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera : Pyralidae) LARVAES

Emine GÜNER

Year: 2009, **Pages:** 58

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF SELÇUK

Supervisor: Assist.Prof.Dr. Sadettin ÜNSAL

Jury: Prof.Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK
Prof.Dr. Yusuf DURAK
Assist.Prof.Dr. Sadettin ÜNSAL

In this study the research made regarding the effect of the fifth instar of azatdiracthin which is a kind of pestisit on *Galleria mellonella* L. Larvae (The Greater Wax Moth). In the research amount of LC95 is mesaured to see effects of NEEM on the *Galleria mellonella* L. Larvae. Measurement started with 10 ppm's worth and repeatedly increased for each experiment. Absorved repellent effect 1500 ppm and above in the experiments and when 1500 ppm and lower amount used it observed paralyze effect . With help of POLO PLUS PROGRAM effect of the fifth instar of *Galleria mellonella* (The Greater Wax Moth) of azatdirachtin diagnosed with LC95 dose 3991 ppm, in the researched its used reducing worth of LC95 dose to see the better observation . on larvae's fed with half synthetic foods which contains 498, 997 , 1995 and 3991 ppm azatdiractin that showed many different effect on the top layer skin. Azadirachtin shows refine effect on cuticle .larvaes which applied with azadirachtin is reduced more comparing the control group, in the same time when amount of dose increased , larvae's takes longer time to pass to next stage. In 1995 and 3991 ppm it shows killing effects.

Key words: *Galleria mellonella*, greater wax moth, azadirachta, NEEM, integument, cuticle

ÖNSÖZ

S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde yürütülmüş olan bu yüksek lisans tez çalışmasında halk arasında kovan güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella* L. zararlısının beşinci evre larvaları üzerinde bir kitin sentezi inhibitörü olan azadirachtinin etkileri ışık mikroskobik düzeyde araştırılmaya çalışılmıştır.

Bana bu araştırma konusunu veren, çalışmayı yöneten ve her türlü desteğini esirgemeyen danışman hocam Yrd.Doç.Dr.Sadettin ÜNSAL 'a teşekkür ederim. Ayrıca böcek kültürü temininde ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Haluk ÖZPARLAK, Arş.Gör.Rahile ÖZTÜRK'e ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma, probit analizi tespitinde yardımcı olan Prof. Dr. Celal TUNCER'e, sonuçların istatiksel analizi ve yorumlanmasında yardımcı olan Arş.Gör. Neriman KARADAYI'ya ve tüm hayatım boyunca olduğu gibi çalışmalarım sırasında da bana maddi ve manevi olarak sürekli destek veren aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ……. 1

2.KAYNAK ARAŞTIRMASI……. 6

2.1. *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)……. 6

2.2. Böceklerde İntegümentin Yapısı……. 7

2.3. Azadirachtinin Böcekler Üzerindeki Etkileri…….. 9

2.4. *Galleria mellonella* L. Larvaları Üzerinde İnsektisitlerin Etkileri…….. 9

3. MATERYAL VE METOT…….. 11

3.1. Materyal…… 11

3.1.1. Azadirachtin…….. 11

3.1.2. *Galleria mellonella* L. Kültürü…….. 12

3.2. Metot……. 12

3.2.1. *Galleria mellonella* L. larvalarına Azadirachtin uygulanması…….. 12

3.2.2. Larvalardan blok hazırlanması, kesitlerin alınması ve boyanması…… 13

3.2.3. Kütiküla kalınlığının ölçümleri…… 14

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI…… 15

4.1. Kontrol Grubu, Beşinci evre *Galleria mellonella* L. Larvalarına Ait Gözlemler….. 15

4.1.1. İntegümente ait makroskobik ve histolojik gözlemler……. 15

4.1.2. Kütiküla kalınlık ölçümleri…….. 27

4.2. NEEM (Azadirachtin indica)'in 5. Evre *Galleria mellonella* L. Larvalarının İntegümenti Üzerindeki Makroskobik Ve Histolojik Etkileri……. 39

5. TARTIŞMA…… 44

6. SONUÇ……... 52

7. KAYNAKLAR……... 53

SİMGELER

A.O.	Aritmetik ortalama
bk	Boyuna kas
ç	çekirdek
ek	eski kütiküla
ekb	ekuviyal boşluk
ekk	ekzokütiküla
enk	endokütiküla
enl	endokütikülar lamel
eph	epidermal hücre
epk	epikütiküla
ept	epikütikülar tüberkül
et	epitel tabaka
ik	interzon kütiküla
k	kıl
kd	kas doku
kk	kıl kesesi
kt	kütiküla
LC_{95}	test hayvanlarının %95'ini öldürmek için gerekli konsantrasyon
pk	por kanalı
rh	rejeneratif hücre
S.D.	serbestlik derecesi
S.H.	standart hata
su	sitoplazmik uzantı
teh	termojen hücre
trh	trikojen hücre
v	vakuol
yd	yağ dokusu
ysk	yeni sentezlenen kütiküla

1.GİRİŞ

Beslenme insanın var oluşundan beri süregelen temel ihtiyaçlarından biridir. Gelişen teknoloji ve artan kimyasal madde kullanımının çoğalmasıyla insanların sağlıklarını koruyabilmeleri için sağlıklı ve doğal beslenmelerinin önemi gün geçtikçe daha çok ortaya çıkmaktadır. Bitkisel ve hayvansal gıdalar bizim doğal ihtiyaçlarımızı karşıladığı gibi aynı zamanda ilaç sanayisinde de kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra birçok ailenin geçim kaynağı durumundadır. Bu besin kaynaklarından biri olan bal son yıllarda gerek besin değeri gerekse ticari rant olarak önemi açısından üretimi vazgeçilmezler arasındadır. Geçmiş yıllarda sadece tadı için besin olarak tercih edilen bal; su, karbonhidrat, protein, B1 B2, B3 ve C vitaminlerinin yanı sıra Sodyum, Potasyum, Magnezyum, Manganez, Demir, Bakır, Fosfor, Kükürt ve Klor gibi mineral maddeler ihtiva eder (Özparlak 2003).

AB ile müzakere sürecimiz de Ekonomik değeri yüksek olan bal, balmumu ve polen üretiminin önemi daha da artmıştır. AB kriterleri devreye girince balın kalitesi ve organik bal konusunda hassasiyette ortaya çıkmıştır. AB "Doğal arı balı analiz belgesi"ni zorunlu kılmıştır (www.tarim.gov.tr).

Bal satışının büyük bölümünü AB ve Arap ülkelerine yapan Türkiye'de yılda 60-70 bin ton bal üretilmektedir. Yıllara göre değişmekle birlikte balın dışsatımı sonucu 20-40 milyon $ gelir elde edilmektedir. Sadece bal üretimi aracılığı ile arıcılık iç tüketimle birlikte milli gelire 100-150 milyon $ katkı sağlamaktadır. Türkiye'nin geniş arazisi, ılıman bir iklim kuşağında yer alması zengin bitki örtüsü ve koloni varlığı bakımından büyük bir arıcılık potansiyeline sahiptir. Yaklaşık 154 bin ailenin arıcılıkla uğraştığı ülkemizde 1996 verilerine göre 3.967.718 adet arı kovanı bulunmaktadır. Bu arı kovanı varlığı ile Türkiye, Rusya, A.B.D. ve Çin'den sonra dördüncü sırada yer almaktadır. Buna karşın 63 bin ton civarındaki yıllık bal üretimi ile Rusya, Çin, A.B.D.,Meksika, Kanada ve Arjantin'den sonra ancak yedinci sırada bulunmaktadır. Çünkü Türkiye'de kovan başına alınan bal verimi ortalama 16 kg gibi çok düşük bir düzeydedir. Diğer taraftan 250 bin ton dolayındaki dünya bal

dış satım pazarında Türkiye 2500 tonluk bal ihracatı ile 18. sırada yer almaktadır (Turut 2000).

Arı varlığı ile bal üretimi arasında görülen bu dengesizliğin Türkiye'deki arıcılık potansiyelinin yeterince değerlendirilmemesi, bilimsel üretim tekniklerinin yaygınlaştırılmamış olması, arı hastalık ve zararlarına karşı zamanında ve etkin mücadele yöntemlerinin uygulanmaması gibi sebeplerle açıklanması mümkündür.

Organik bal üretimi ve bal arısı zararlılarıyla kimyasallar kullanmadan doğal yollarla mücadele, AB'ye adaylık sürecinde olan ülkemizin güncel konularından biridir. Balın AB standartlarına uygun, ekonomik ve besin değeri yüksek olarak üretilmesi için balarısı zararlılarının doğru olarak belirlenmesi ve bunlara geçerli çözümler getirilmesi ile mümkündür. Arı akarı olarak *Varroa jacobsoni* Qudemans, bal üretimini olumsuz etkileyen hastalıkların başında gelen varroa hastalığına sebep olur. Arıların dış paraziti olan bu zararlı hızlı bir şekilde çoğalarak arıların hemolenfini emer. Böylece arıların zayıflamasına özürlü gelişmesine ve ölümlerine sebep olur (Selçukoğlu 1999). Arıcılık sektöründe varroa hastalığından sonra ekonomik açıdan en büyük zararı arı kovanlarında ve depolarda peteklere zarar veren birkaç güve türü yapar. Bunlar arasında *Galleria mellonella* L. (büyük petek güvesi) ve *Achroia grisella* (küçük petek güvesi) en tanınmış türlerdir. *G. mellonella* larvaları büyük zarara sebep olduğu için en tehlikeli olandır. Büyük balmumu güvesi (*G. mellonella*) bal arılarının (*A. mellifera*) ekonomik zararlılarından olup; arıcılık yapılan, özellikle düşük rakımlı, ılıman iklim bölgelerinde yaygın olarak bulunmakta (Allan 2000) ve tüm dünyada arıcıların peteklerini korumada sıkıntıya düştükleri önemli bir zararlı olarak tanınmaktadır (Sanford 2003). Büyük balmumu güvesinin ergin, pupa ve yumurta evresindeki bireyleri kabartılmış peteklerde tahribata neden olmazken, larvaları; uygun çevre şartlarında (sıcaklık, nem, besin) kolonilerin isçi arı varlığına bağlı olarak farklı seviyelerde zarar vermektedirler. Büyük balmumu güvesi ortam sıcaklığının 4 °C' nin üzerinde ve oransal neminin %70 civarında olduğu ortamda gelişmekte, genellikle depolanan kabartılmış peteklerin iç kısımlarında tüneller açarak peteğin tekrar kullanılma olasılığını ortadan kaldırmaktadır (Ritter ve ark, 1992, HaeWoon ve ark, 1995). Sağlıklı ve güçlü kolonilerde büyük balmumu

güvesi (*G. mellonella*) hasarı, işçi arıların zararlıyı baskılamaları sonucu arıcılar tarafından fark edilmezken, çeşitli nedenlerle ergin isçi arı sayısı azalmış ve zayıf kolonilerde önemli ekonomik kayıplar ile arıların kovanı terk etmesi gözlenebilmektedir (Sanford 2003). Büyük balmumu güvesine karşı kabartılmış peteklerin korunmasında çeşitli ülkelerde kimyasal [aluminyum fosfid, metil bromit, etil dibromid, paradiklorobenzen Naftalin, kükürt], fiziksel (soğuk-sıcak) uygulamaları ve biyolojik insektisitler (*Bacillus thuringiensis*) gibi mücadele yöntemleri farklı şekillerde kullanılmaktadır (Shieh 1981; Tutkun ve ark, 1987; Ritter ve ark, 1992; Ahmad 1994; Yacobson ve ar,. 1997; Delaware 2000; Kumova ve Korkmaz 2002). Ülkemizde 5 milyona yakın bal arısı kolonisinden yaklaşık 3.500–4.000 ton/yıl bal mumu üretilmekte (www.tarim.gov.tr) olup; kovanların değişik oranlarda büyük balmumu güvesi (*G. mellonella*) ile bulaşık olduğu bildirilmektedir (Çağlar ve ark, 2001). Arı kolonilerinde 1 kg balmumu üretimi için ortalama 8- 10 kg bala eşdeğer nektar tüketmeleri gerekmektedir (Whitcomb 1946). Dolayısıyla koloninin gereksinimi olan peteklerin yapımı sırasında, arılar bal üretimi için kullanılacak nektarı balmumu üretiminde kullanılmakta ve birim kovan basına bal üretimi azalmaktadır. Ayrıca arıcılar arazi şartlarında temel petek bağlama isleri ile uğraştıklarından is gücü kayıpları gözlenmektedir.

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 gerekse çevre sağlığı açısından problem oluşturmayacak insektisitlerle bu zararlıya karşı mücadelenin iyi organize edilerek larval dönemde yapılması gerekmektedir. Dumanla dezenfeksiyon arıcılar tarafından arı kovanlarında bu zararlıların kontrolü için kullanılan eski bir yöntemdir. Bu amaçla karbon disülfüt, sülfür, kalsiyum, siyanit, metil bromit, etil dibromit, etil oksit ve paradiklorbenzen gibi pek çok fumigant kullanılmıştır. Ancak bu fumigantlar tam etkili değildirler. Bunun yanı sıra bu tür fumigantlar insan ve bal arılarına karşı zararlıdır (Krebs 1957).

Arthropoda şubesine dahil olan böcekler, kas gücünün en faydalı şekilde kullanılabilmesine izin veren bir ekzoiskelet sistemine sahiptir (Reynolds 1987). Böceklerde larval devrede ekzoiskelet görevini yerine getiren integümentin, 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 fonksiyonları yanında; larvaların büyümesini sınırlandırdığı için periyodik olarak değiştirilme zorunluluğu vardır. Deri değiştirme olarak adlandırılan bir seri olaylar zinciri sonunda eski deri atılarak yerine yenisi meydana getirilir. Deri değiştirme olayının hemen hemen tüm evreleri boyunca, integümentin yapılacak olan kimyasal mücadelede çok önemli bir başlangıçtır.

Ancak çevre kirliliğine ve parasal açıdan büyük masraflara sebep olması, aynı zamanda organik üretime verdiği zarardan dolayı günümüzde kimyasal insektisitlerden uzaklaşma zorunluluğunu doğurmaktadır. Artık günümüzde zararlı böceklere karşı savaşımda biyolojik mücadele ve organik mücadele ile başarılı sonuçlara ulaşılmaktadır. Arı hastalıklarıyla ve zararlılarıyla mücadele yöntemleri tam olarak bilinemediği için zaman zaman yanlış uygulamalar yapılmaktadır.

Özellikle arı hastalıklarının teşhisi tam olarak konulamadığı durumlarda bilinçsiz ilaç kullanımı gündeme gelmektedir. Yanlış zamanda ve yanlış şekilde uygulandığı için ülkemizde üretilen ballarda bazen ilaç kalıntılarına rastlanmaktadır. Özellikle yurtdışına ihraç edilen ballarda bu tür kalıntılara rastlandığı için ballarımızın geri gönderildiği haberleri zaman zaman medyada çıkmaktadır (http://www.aricilik.gen.tr). Biyolojik mücadele bu açıdan oldukça önem kazanmaktadır. Bu sebeple çevre ve insan sağlığı için zararsız olduğu bilinen integüment üzerinde etkili ve aynı zamanda seçici bioinsektisitlerden biri olan Azadirachtin gibi insektisitlerin önemi daha da artmaktadır.

Son yıllarda, Grosscurt (1978), Nishioka ve ark.(1979), Mitsui ve ark. (1980, 1981 ve 1984), Abdelmonem ve Mumma (1981), Kitahara ve ark. (1983), Soltani ve ark. (1984), Osman (1985), Tada ve ark. (1986), Hassan ve Charnley (1987), Ren ve

ark.(1988), Hegazy ve ark. (1989 ve 1990), Hegazy ve Degheele Nakagawa ve ark. (1992), Vinula ve Budia (1994), Ker (1997), gibi İntegüment ve orta barsak üzerinde çalışan pek çok araştırmacı; zararlı böceklerin kütikülalarının önemli bir kısmını ve barsağı koruyan peritrofik zarın esasını meydana getiren kitin sayesinde kitin sentezi inhibitörleriyle zararlı böceklerin kontrol altına alınabileceklerini ifade etmektedirler. Prokütiküla ve orta barsak seçici insektisitler için iyi bir hedef oluşturmaktadır. Larval devrede kitin sentezi inhibe edildiğinde birçok fizyolojik olay sonucunda meydana gelen deri değiştirme gerçekleştirememekte ve beslenme düzensizliğinden dolayı larvalar ölüme sürüklenmektedir (Reynolds 1987).

Zararlı böceklerle yapılabilecek etkili bir mücadele için o türün biyolojisi, yayılışı ve zarar şeklinin yanında larval integümentinin ve larval gelişim sürecinin bilinmesinde yarar vardır. Çünkü kimyasal ve organik insektisitler, böcek organizmasında öncelikle İntegümenti ve buna bağlı olarak larval gelişim sürecini etkiler. Bu çalışmada sağlıklı G. *mellonella* beşinci evre larvalarının İntegüment ve larval gelişim sürecinin incelenmesinin yanı sıra kitin sentezi üzerinde de etkili olduğu bilinen Azadirachtinin değişik dozlarının G. *mellonella* beşinci evre larva üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Azadirachtin'nin integümentin büyümesini durdurması ya da azaltması ve larvayı bulunduğu evreye hapsetmesi bir biyolojik insektisit olarak Azadirachtin'nin etki mekanizmasını anlamamıza yardımcı olacaktır. Bu sayede ele geçen bulguların zararlı böcek mücadelesinde kullanılabilmesi umut edilmektedir.

2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

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

Büyük balmumu güvesi (*G. mellonella*) bal arılarının (*A. mellifera*) ekonomik zararlılarından olup; arıcılık yapılan, özellikle düşük rakımlı, ılıman iklim bölgelerinde yaygın olarak bulunmakta (Allan 2000), ve tüm dünyada arıcıların peteklerini korumada sıkıntıya düştükleri önemli bir zararlı olarak tanınmaktadır (Sanford 2003). Büyük balmumu güvesinin ergin, pupa ve yumurta evresindeki bireyleri kabartılmış peteklerde tahribata neden olmazken, larvaları; uygun çevre şartlarında (sıcaklık, nem, besin) kolonilerin işçi arı varlığına bağlı olarak farklı seviyelerde zarar vermektedirler. Büyük balmumu güvesi ortam sıcaklığının 4 °C' nin üzerinde ve oransal neminin %70 civarında olduğu ortamda gelişmekte, genellikle depolanan kabartılmış peteklerin iç kısımlarında tüneller açarak (Şekil 2.1.1., 2.1.2) peteğin tekrar kullanılma olasılığını ortadan kaldırmaktadır (HaeWoon ve ark. 1995, Ritter ve ark. 1992). Sağlıklı ve güçlü kolonilerde büyük balmumu güvesi (*G. mellonella*) hasarı, isçi arıların zararlıyı baskılamaları sonucu arıcılar tarafından fark edilmezken, çeşitli nedenlerle ergin isçi arı sayısı azalmış zayıf kolonilerde önemli ekonomik kayıplar ile arıların kovanı terk etmesi gözlenebilmektedir (Sanford 2003).



Şekil 2.1.1,Peteklerin içine tüneller açarak petekleri tahrip eden *Galleria mellonella* L. Larvalarının petekteki görünümü



Şekil 2.1.2, Peteklerin içine tüneller açarak petekleri tahrip eden *Galleria mellonella* L. Larvalarının petekteki farklı başka görünümü

2.2. Böceklerde İntegümentin Yapısı

Genel olarak omurgasız hayvanlarda, bazal membran üzerinde tek sıralı hücrelerden oluşan epidermis tabakası ile epidermis hücrelerinin salgısı ile oluşan kütiküla tabakası için İntegüment terimi kullanılır (Lower 1956).

Epidermis kütiküla tabakasının hemen altında epidermal hücrelerden meydana gelir ve kütikülayı salgılar. Bu epidermal tabaka böceklerde hipodermis olarak adlandırılır (Lower 1956). Larvanın gelişim durumuna göre epidermis geniş ve yassı şekilden, prizmatik şekle 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 tabakadan meydana gelmiştir. Bu tabakalar içte endokütiküla, dışta ekzokütiküla ve yüzeysel bir tabaka olan epikütiküla'dır.Bazı böceklerde ekzokütikülanın yerinde yada endokütikülanın ve ekzokütiküla arasında ilave bir tabaka bulunur.Kendine has bir boyanma ile belirlenen 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 düşünülebileceğini bildirmiştir (Wigglesworth 1974, Reynolds 1987).

Kitin ihtiva etmeyen epikütiküla tanenleşmiş lipoprotein tabakası olarak kabul edilir. Epikütikülanın lipit yapısı 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 endokütikülada 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, matriksi proteinden, fibrilleri ise kitinden yapılmış bileşik bir yapıdır. Kitin mikrofibrilleri 2-8 nm çapında olup boyları ise mikron ile ölçülebilecek kadar uzundur. Her bir mikrofibrilin 18-21 kitin molekülü ihtiva eder (Anderson 1979). Kitin mikrofibriller son derece organize olmuş helizoidal bir sırada düzenlenmiştir. Kütiküla mikrofibrilleri bir polisakkarit olan kitinden $(C8H13O5N)_x$ 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 moleküllerde 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'in böceklere karşı uzaklaştırıcı, beslenmeyi engelleyici, doğurganlığı azaltıcı, kısırlaştırıcı, öldürücü ve yumurta bırakmayı önleyici gibi etkileri tespit edilmiştir. Azadirachtin içeren ürünler fitofaj böcekler için orta ve geniş spekturumlu insektisitlerdir. Orthoptera, Homoptera, Heteroptera, Lepidoptera, Coleoptera, Diptera ve Hymenoptera takımına bağlı bir çok türü etkilemektedir. *Leptinotarsa decemlineata*, *Pieris brassicae, Plutella xylostella, Ostrinia nubilalis, Bemisia tabaci, Sitophilus granarius, Spodoptera littoralis'e* karşı başarılı sonuçlar alınmıştır (Kısmalı 1988).

2.4.*Galleria mellonella* L.Larvaları Üzerinde İnsektisitlerin Etkileri

Ali ve ark. (1973) üçüncü ve beşinci evre *G.mellonella* larvalarının orta bağırsağın üzerinde bakteriyel bir insektisit olan Thuricide-HP'nin (*Bacillus thuringiensis* Berliner) histopatolojik etkilerini çalışmışlardır. Aynı araştırmacılar *G. mellonella* larvaları üzerinde çeşitli kimyasal insektisitlerin etkisini suni diyete karıştırma ve petek parçalarını ilaç konsantrasyonlarına daldırma yöntemleri ile denemişler ve her iki metotta endosülfan-fenitrothion karışımının en toksik olduğunu tespit etmişlerdir (Ali ve ark. 1973). Aynı araştırmacılar başka bir çalışmalarında bal peteklerini cidial, dioxathion, endosülfan, endosülfan-fenitrothion, topaxhane ve trichlorfon gibi insektisitlerin bal arılarına hemen hemen toksik olmazken *G. mellonella* larvalarına karşı yüksek oranda toksisiteye sebep olduklarını görmüştür (Ali ve ark. 1974).

Altıncı ve yedinci evre *G. mellonella* larvalarının kütiküla ve epidermal hücreleri üzerinde DFB'un morfolojik etkileri elektron mikroskobik düzeyde incelenmiştir. Yedinci evre larvalarına DFB enjeksiyonunun büyük oranda anormal pupa oluşumuna sebep olduğu görülmüştür. Larvalara DFB enjeksiyonu, yeni kütikülinin depolanmasında etkili olmamış, protein epikütiküla etkilenmemiş ancak prokütikülada homojen madde birikimi ve kürecikler gözlenmiş, kitin lamellerin

oluşumu engellenmiş, prokütikülanın amorflaştığı tespit edilmiştir.Araştırmacılar bu çalışmalarında oral yolla, yaşlı evrelerin DFB'a genç olanlardan daha az duyarlı olduğunu belirterek; birinci, ikinci ve üçüncü evre *G. mellonella* larvaları için LC_{95} değerini 50 ppm , dördüncü evre için 100 ppm, beşinci ve altıncı evre için 1000 ppm, yedinci evre için 1000 ppm ve üzeri olarak bildirmiştir (Hegazy ve ark. 1980).

De Veire ve Degheele (1980), *G. mellonella, Pierris brassicae* L. ve S. *littoralis* larvalarında 14C-DFB'un akıbetini incelenmişlerdir. Barsaktan hemolenfe absorbe edilen DFB daha sonra dokulara transport edilmiştir. DFB'un vücuttan uzaklaştırılması *G. mellonella*'da diğer iki türden daha hızlıdır. Bu çalışma ile *P. brassicae'*nin DFB'na, karşı *G. mellonella* ve S. *littoralis*'den daha duyarlı olduğu sonucu çıkarılmıştır. Aynı araştırmacılar bir başka çalışmalarında *G. mellonella* ve S. *littoralis*'in son evre larvaları üzerinde 14C-DFB kullanılarak DFB'un hemolenfte transportunu ve hemolenf proteinlerine bağlanışını incelemişlerdir. Bu iki türün farklı duyarlılıklarını açıklamaya çalışmışlardır (Van De Veire ve ark. 1982).

Sato ve Fukami (1984) carbaryl, fenitrothion ve diazon'un topikal uygulamayla *Spodoptera littoralis* (Fab.) larvalarına toksik etkili ancak *G. mellonella larvalarına* penetrasyon, özelliklede diazon'un penetrasyonunun çok az olduğunu görmüşlerdir. Aynı araştırmacılar bu böcekler üzerinde aynı insektisitlerle yaptıkları bir başka çalışmada şu önemli sonucu çıkarmışlardır. ''Uygulanan yüksek dozlar larval vücuda penetrasyonda küçük bir etkiye sahiptir. Bu nedenle bir böceğin kimyasal mücadelesinde yüksek insektisidal doz uygulaması gereksizdir. Önemli olan böcek vücuduna penetre olacak ve hedef organa ulaşacak dozun tespiti ve kullanılmasıdır'' (Sato ve Fukami 1985).

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 en etkili bir bileşen ve primer bir toksik maddedir. Birikimsiz kısa devamlılığı, hedef olamayan organizmalar karşı düşük zehirliliği ve özgünlük gibi niteliklere sahip Azadirachtin yapısal olarak yedi tane tetranortriperpernoidin karışımından meydana gelir ve bunlar A'dan G'ye kadar adlandırılmıştır. Yedi izomerik bileşenden oluşmaktadır. Yapısal olarak birbirinin aynı olan Azadirachtinler arasında miktar olarak en fazla Azadirachtin A (% 85) bir böcek (insekt) kovucu, beslenmeyi engelleyici ve büyüme düzenleyici bir maddedir. Azadirachtin E ise en etkili üreme düzenleyicisi olarak görülür (Rembold ve ark. 1984). Onun başlıca hareket şekli, ecdysone'ya karşı etkili olarak, böcek epitelyum hücrelerini parçalamaktır ve mide zehiri görevini de görmektedir.

NeemAZAL T/S, Trifolio M GmbH isimli Alman şirketi tarafından geliştirilmiş eken maddesi azadirachtin olan ruhsatlı doğal bir böcek ilacıdır. NeemAZAL T/S, 10.000 ppm azadirachtin içermektedir. NeemAZAL T/S ilacının böcek öldürme etkisi ilacın böcek gelişimini düzenleyici (IGR) etkisinden ileri gelmektedir. Etkilenen böcekler yaşam evrelerini tamamlayamamakta ve metamorfozdan önce ölmektedirler. Bu çalışmada ticari preparat olan NeemAZAL T/S kullanılmıştır.

3.1.2.*Galleria mellonella* L. kültürü

Denemelerde kullanılan *G. mellonella* larvaları Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü araştırma laboratuvarındaki stok kültürden çoğaltılarak elde edilmiştir. *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) beslenmiştir (Hegazy ve ark. 1980).

3.2.Metot

3.2.1.*Galleria mellonella* L. larvalarına Azadirachtin uygulanması

Araştırmada kullanılan Azadirachtin'in öncelikle *G. mellonella* beşinci evre larvaları için LC_{95} dozu hesaplanmıştır. Bu aşamada toplam 1500 adet yeni deri değiştirmiş beşinci evre *G. mellonella* larvaları kullanılmış ve larvalar 16 denemede yükselen ppm değerleri içeren yarı sentetik besinle beslenmiştir. Hesaplama Probit Analizi tekniğiyle dört tekerrürlü olarak yapılmıştır. *G. mellonella* beşinci evre larvaları için Azadirachtin'nin LC_{95} dozu 3991 olarak bulunmuştur. *G. mellonella* larvalarına yarı sentetik besine karıştırma yoluyla uygulanan Azadirachtin'in 5. evre larvalarına etkilerini gözlemlemek için LC_{95} 3991 ppm dozu ve azalan değerleri LC_{95}'in yarısı 1995 ppm, LC_{95}'in dörtte biri 997 ppm, LC_{95}'in sekizde biri 498 ppm olarak dört doz üzerinde iki tekrarlı olarak denenmiştir. Bu aşama da kontrolle birlikte 500 adet larva kullanılmış dördüncü evre derisini yeni değiştirmiş beşinci evrenin ilk saatlerindeki koyulaşmamış (tanenleşmemiş) *G. mellonella* larvaları seçilmiştir. Azadirachtin uygulanmasında önce ayrı bir yere alınan bu larvalar besini aynı derecede yemelerinin sağlanması için 18 saat boyunca aç bırakılmıştır (Clarke ve Jewess 1990).

Teknik Azadirachtin suda çözülmüş, suda çözülen Azadirachtin süspansiyonları 3991 ppm, 1995 ppm, 997ppm ve 498 ppm konsantrasyonlarında 20 g yarı sentetik besin ile iyice karıştırılmıştır. Kontrol grubunun besinine ise sadece su karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımlar cam kavanozlara konulmuş, her kavanoza 50 adet larva yerleştirilmiştir. Bu kavanozlar % 78 bağıl nem ve tamamen karanlık ortamda 28 ± 2 0C'da inkübe edilmiştir. Azadirachtin ihtiva eden ve ihtiva etmeyen besin larvalara verilmeden önce Azadirachtin'in olabilecek repellent etkisinin ortadan kalkması için larvalara 1 saat sonra verilmiştir (Erinç ve Ayvalı 1989).

Uygulamadan sonra 12.,24.,36.,48.,60.,72.,84.,96. saatlerde özellikle Azadirachtin'den etkilenmiş (renk koyulaşması meydana gelen) birer adet larva numune olarak alınmıştır. Ölümden dolayı meydana gelebilecek histopatolojik değişikliklerden sakınmak için ölen larvalar dikkate alınmamıştır. Pens ucuyla yapılan dokunmalarda uyarılara cevap vermeyen larvalar ölü olarak kabul edilmiştir. Yukarıda belirtilen her saat için alınan deneme materyali yanında kontrol numunesi de alınarak histolojik preparatlar hazırlanmıştır. Denemelerden sonra canlı kalan *G. mellonella* larvalarının gelişimleri izlenmeye devam edilmiştir.

3.2.2.Larvalardan blok hazırlanması, kesitlerin alınması ve boyanması

Numune olarak alınan larvalar eterle bayıltıldıktan sonra baş ve son kısımları kesilmiştir. Tespit çözeltisi olarak nötr formol kullanılmıştır. Numuneler 12- 24 saat formolde tespit edilmiştir (Ali ve ark. 1973). Daha sonra numuneler bir gece akarsuda yıkamaya bırakılmış ve yükselen alkol serilerinden (%50, %70, %80, %90, %100) geçirilerek dehidrasyon işlemi yapılmıştır. Tüm numuneler dehidrasyon işlemlerinden sonra ksilolde saydamlaştırılarak 1 gün yumuşak parafinde bekletilmiş ve sert parafine aktarılmıştır (Ali ve ark, 1973). Numuneler sert parafinde vakumlandıktan sonra blokları hazırlanmıştır.

Bloklardaki numunelerden 6-7 μ kalınlığındaki seri kesitler alınmış , kesitler Haris'in hematoksilen-eozini, Heiden Hein'in demir hematoksilen-eozini, Crossman

modifikasyonu üçlü boyama ve anilin mavisi-luxol fast mavisi ile boyanmıştır (Culling ve ark, 1985).

3.2.3. Kütiküla kalınlık ölçümleri

Abdomen bölgesine ait kütiküla kalınlığı ölçümleri ışık mikroskobunda 10x40'lık büyütmede mikrometrik oküler ve objektif yardımıyla yapılmıştır. Daha önce belirtilen saatlerde alınan numunelerden hazırlanan histolojik kesitlerden her numunenin integümentinden en az 10 adet olmak üzere kütiküla kalınlık ölçüsü alınmıştır. Bu değerlerin aritmetik ortalamaları ve standart hataları hesaplanmıştır. Kontrol grubuna ve Azadirachtin uygulanan gruplara ait beşinci evre larvalarının kütiküla kalınlık ölçülerine ait ortalamaların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi uygulanmıştır. Farklı grupların belirlenmesi için anova testi yapılmıştır. Bütün değerlendirmeler ışık mikroskobu düzeyinde gerçekleştirilmiştir.

4.ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Kontrol Grubu, Beşinci evre *Galleria mellonella* L. Larvalarına Ait Gözlemler

4.1.1. İntegümente ait makroskobik ve histolojik gözlemler

Dördüncü deriyi değiştirmiş beşinci evre başlangıcında larvalara çıplak gözle bakıldığı zaman yeni kütiküla beyazımsı açık sarı renkte, oldukça ince yumrulu ve çok ince bir zar olarak görülmüştür (Şekil 4.1.1.1). İntegümentin enine kesitleri incelendiğinde dorsal tarafta ince, ventralde daha kalın olduğu segmentler arasında kıvrımlar yaptığı gözlenmiştir.

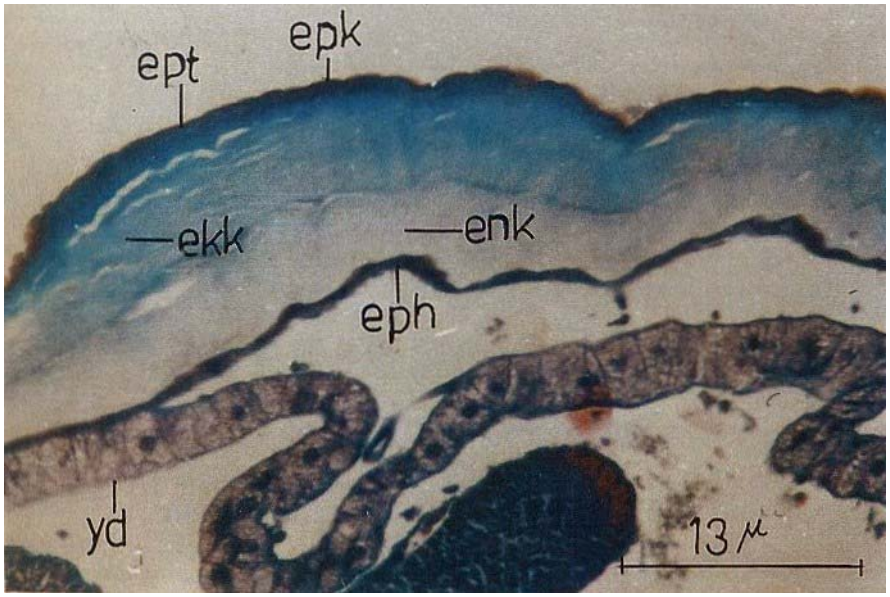
G. mellonella'da integüment, tek sıralı hücrelerde oluşan epidermis ile bu hücrelerin salgısından meydana gelen kütiküladan oluşmuştur. Kütiküla, epikütiküla ve prokütiküladan meydana gelirken, prokütikülada ekzokütiküla ve endokütiküla tabakaları ayırt edilmiştir (Şekil 4.1.1.2.).

Kütikülada, epikütiküla tabakası ışık mikroskobik düzeyde ince bir çizgi şeklinde görülmüştür. Epikütikülada kıl kanal boşlukları bulunmaktadır (Şekil 4.1.1.3.). Kıl kanalları trikojen hücre yüzeylerinden küçük filamentler halinde yükselirler. Her bir kıl geniş bir trikojen hücreden büyümüştür (Şekil 4.1.1.4). Histolojik kesitlerden özellikle yeni oluşmuş kütikülada bir dereceye kadar sivri, genelde kubbe şeklinde tüberküllere rastlanmıştır (Şekil 4.1.1.5.).

Ekzokütiküla sadece olgun kütikülada bariz olarak görülebilmiştir (Şekil 4.1.1.6.). Diğer zamanlarda sınırlarını ayırt etmek mümkün olmamıştır. Endokütiküla ekzokütikülanın altında horizantal lamellerden oluşmuş olarak görülmüştür (Şekil 4.1.1.7.).



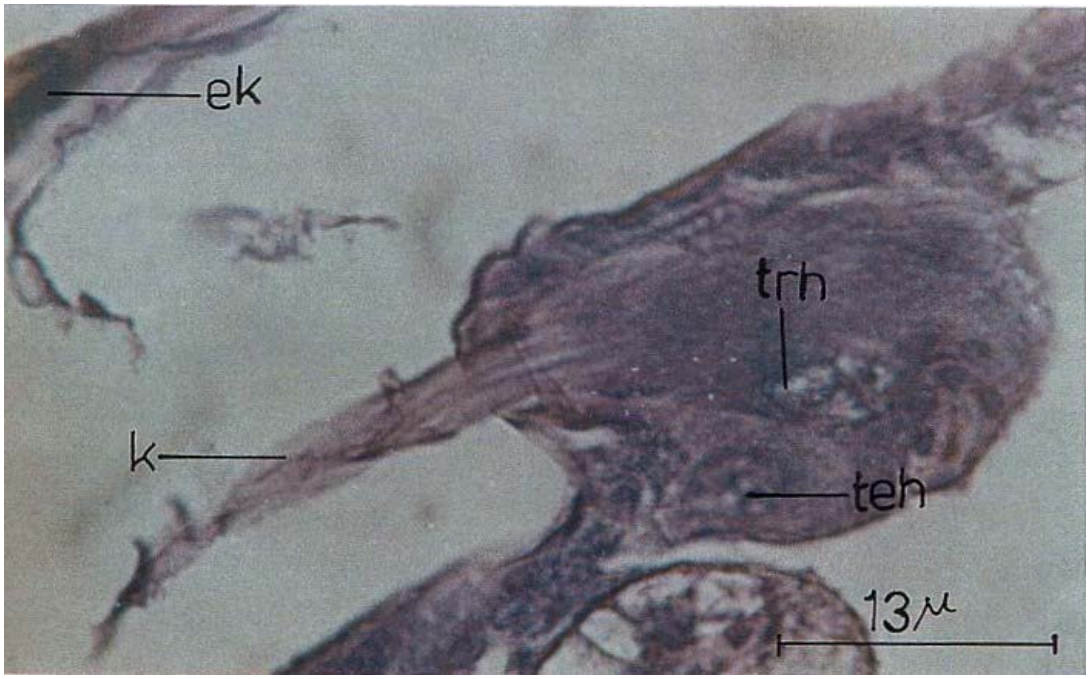
Şekil 4.1.1.1,Dördüncü deriyi değiştirmiş beşinci evrenin ilk saatleri içindeki sağlıklı *G. mellonella* larvası



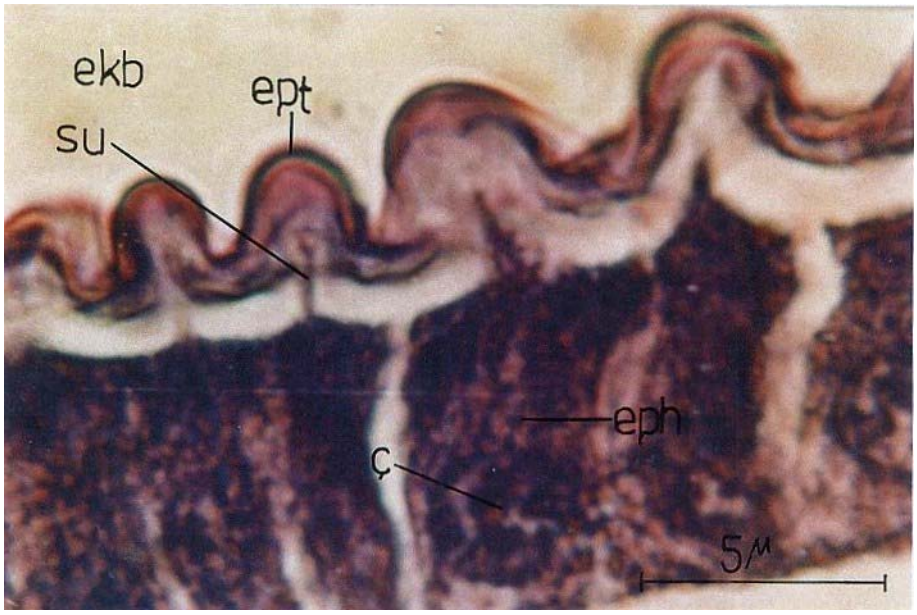
Şekil 4.1.1.2. Beşinci evre *G. mellonella* tarvasının karakteristik integüment yapısı (Luxol fast mavisi-anilin mavisi, x400)



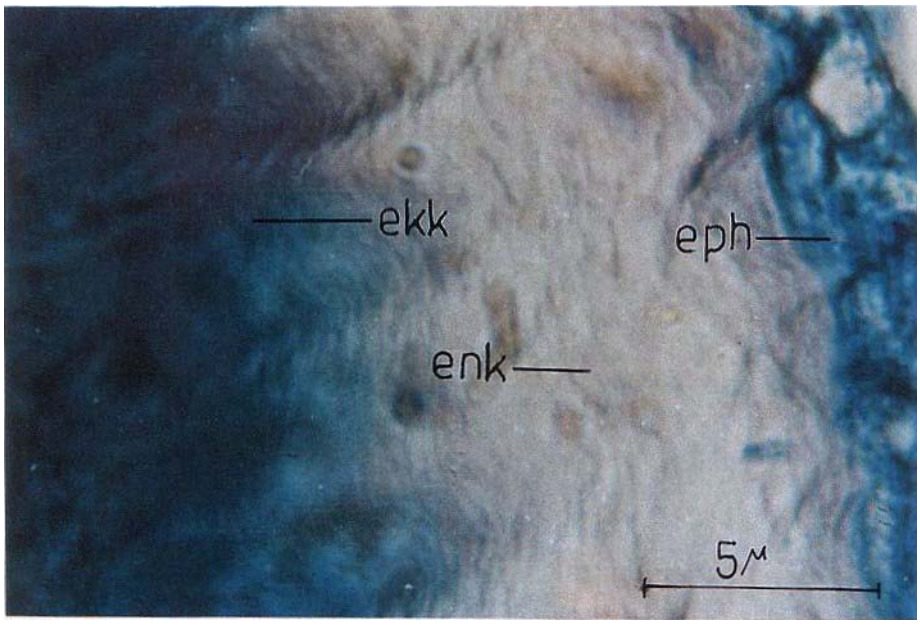
Şekil 4.1.1.3, Kütikuladaki kıl kesesinin genel görünüşü (Hemotoksilen- eozin, x400)



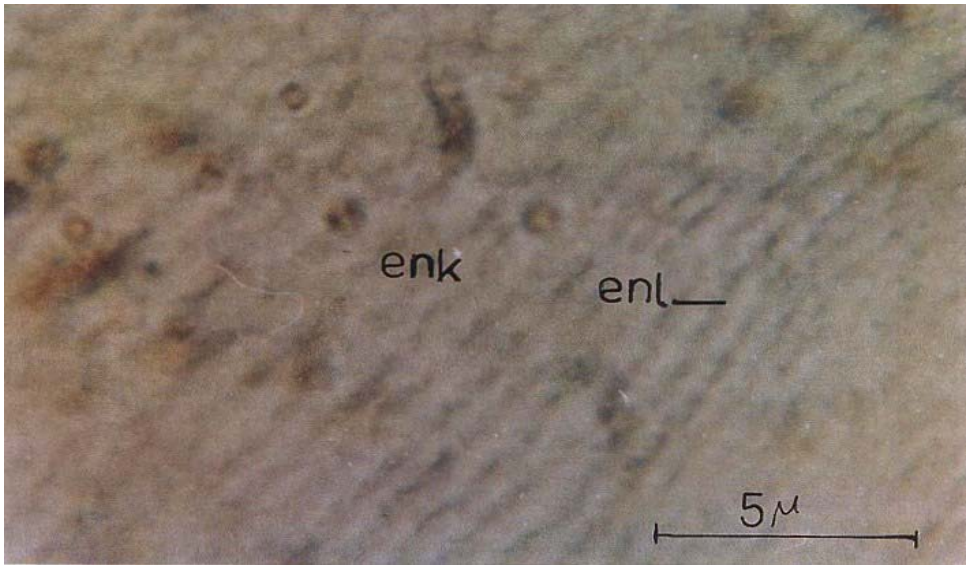
Şekil 4.1.1.4, Trikojen hücresi ve kıl (Hemotoksilen-eozin, x400)



Şekil 4.1.1.5. Tüberküllerin oluşumu ve sitoplazmik uzantılar (Hemotoksilen-eozin, x1000)

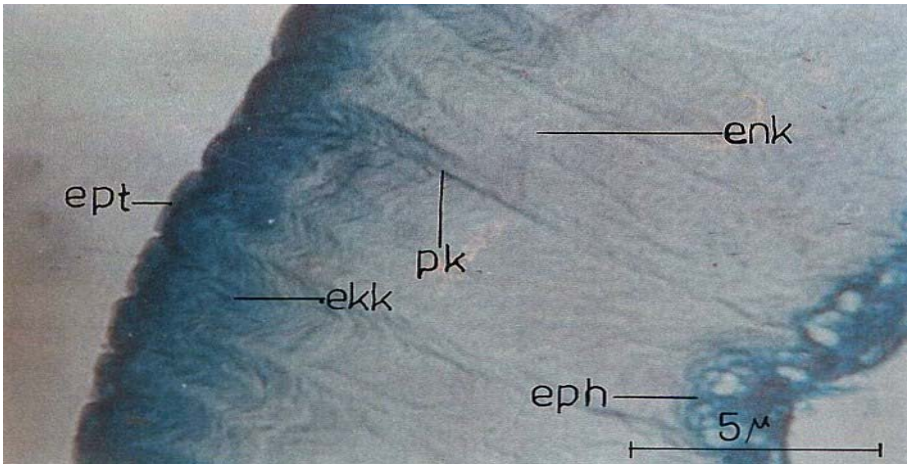


Şekil 4.1.1.6. Ekzo-endokütiküla farklılışması (Luxol fast mavisi-anilin mavisi, x1000)

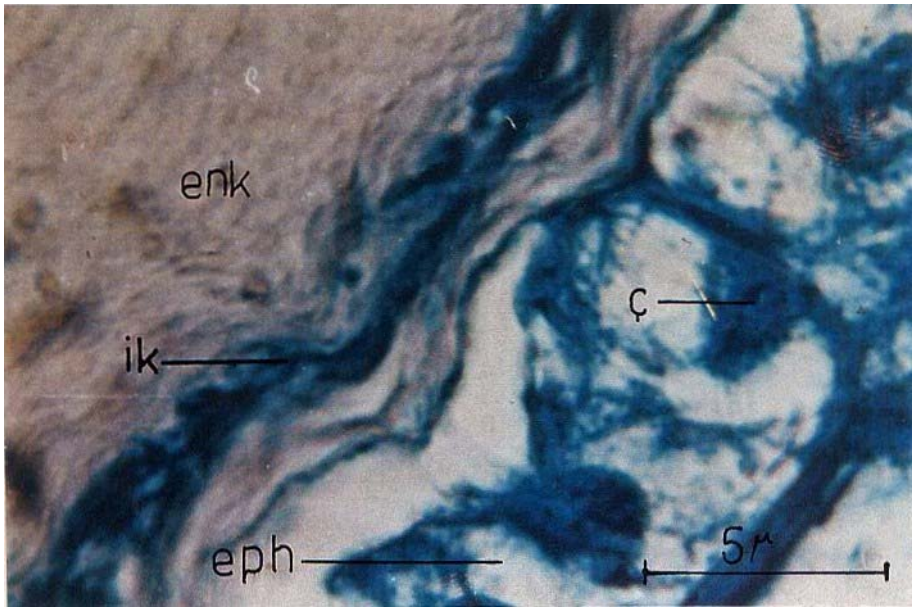


Şekil 4.1.1.7, Endokütiküladaki horizontal lamellerin görünüşü (Hemotoksilen-eozin, x1000)

Enine kesitlerde epidermis hücre yüzeylerinden başlayarak, endo ve ekzokütikülayı boyuna geçip her bir epikütikülar tüberkün altında dallanmalar yapan por kanalları görülmüştür. Por kanalları en iyi luxol fast mavisi-anilin mavisi boyamasıyla görülmüştür (Şekil 4.1.1.8.). Kütikülanın epidermisten ayrılmasında hemen önce, eski kütiküla ve epidermis hücreleri arasında interzon kütiküla denilen bir tabaka gözlenmiştir (Şekil 4.1.1.9.).

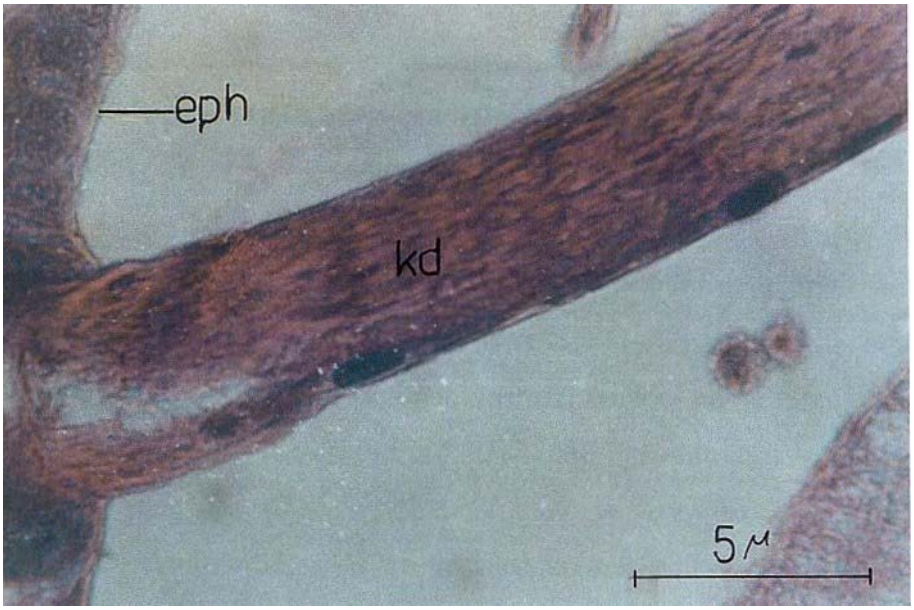


Şekil 4.1.1.8, Por kanallarının genel görünüşü (Luxol fast mavisi-anilin mavisi, x1000)

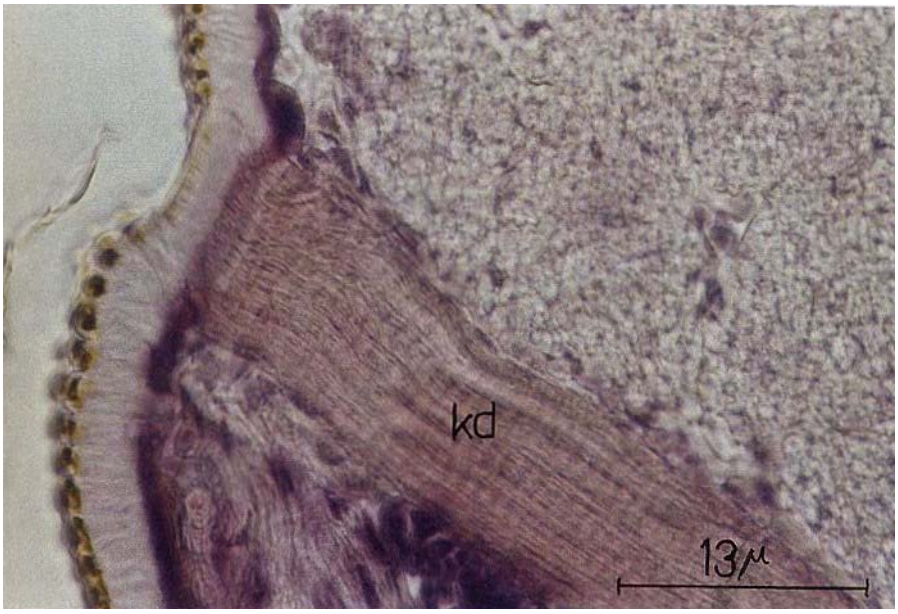


Şekil 4.1.1.9. İnterzonal kütiküla tabakasının görünüşü (Luxol fast mavisi-anilin mavisi, x1000)

Epidermis tabakası larvanın gelişim durumuna göre geniş ve yassı şekilden, kübik ve prizmatik şekle değişebilen hücrelerden oluşmuştur. Epidermis tabakası kas ve yağ doku ile kısmi bağlantılıdır. Özellikle intersegmental bölgelerde epidermis ile kas bağlantıları bariz şekilde görülmüştür (Şekil 4.1.1.10 ve 2.1.1.11.). Bazal membran epidermisin altında ince bir tabaka olarak gözlemiştir. Epidermis hücrelerinin alt tarafında kıl oluşumuna sebep olan kıl keseciklerine rastlanmıştır. Kıl kesesinin kütikülayı geçip epikütikülanın alt yüzeyine açıldıkları görülmüştür (Şekil 4.1.1.3.).



Şekil 4.1.1.10. Epidermis tabakası ile kas bağlantısı (Hemotoksilen-eozin, x1000)

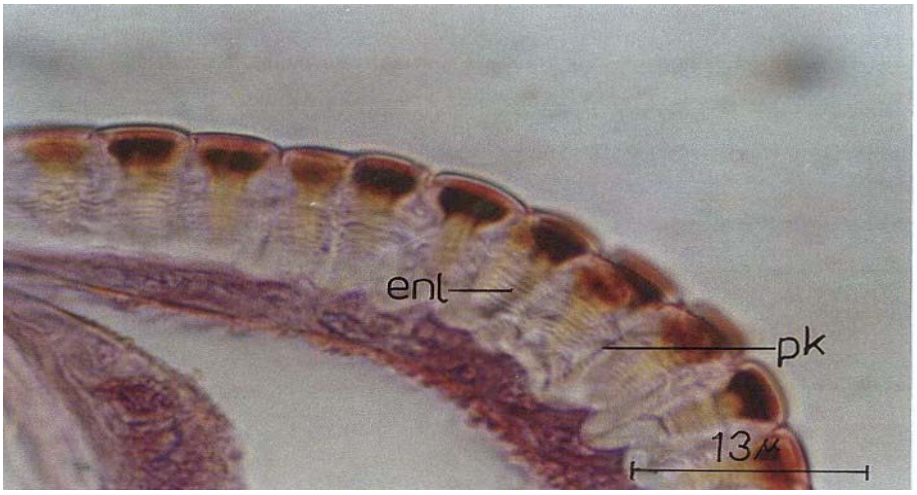


Şekil 4.1.1.11, Epidermis tabakası ile kas bağlantısına ait diğer bir görüntü (Hemotoksilen-eozin, x400)

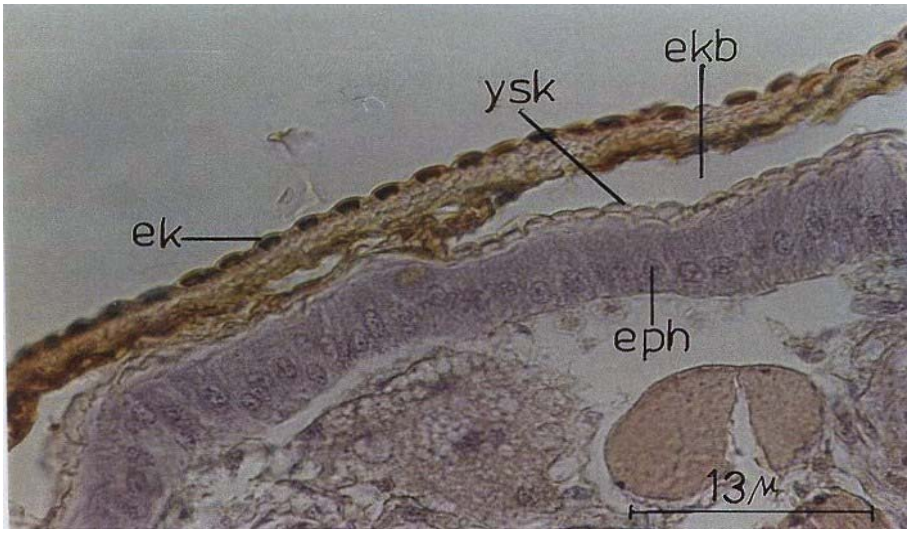
Kontrol gurubunda, dördüncü deriyi atmış larvalarda beşinci evreye ait yeni sentezlenen kütikülanın kalınlığında zamana bağlı olarak önemli artış gözlenmiştir. Kalınlık artışı esnasında ekzo-endokütiküla farklılaşması belirginleşmiştir (Şekil 4.1.1.2. ve Şekil 4.1.1.6.). Endokütiküladaki lameller ve por kanalları en iyi bu safhada gözlenmiştir (Şekil 4.1.1.12. bkz. Şekil 4.1.1.7 , 4.1.1.8.). Bu safhada epidermal hücreler yassı ve ince görülmüştür Şekil 4.1.1.2. Daha sonra apolysis safhasıyla epidermis tabakası eski kütiküladan ayrılmaya başlamış, hücreler kübik şekil almışlardır (bkz. Şekil 4.1.1.9.). Bu safhayı epitel hücrelerinin prizmatikleşmesi ve yeni kütikülanın sentezlenmesi takip etmiştir. Bu esnada eski kütikülaya ait endokütiküladа çözünme olayı da görülmektedir. Bu safhada integümentin eski ve yeni kütikülası iç içe görülmüştür (Şekil 4.1.1.13.). Eski kütikülanın atılmasıyla ve yeni kütikülanın sentezlenmeye devam edilmesiyle bir üst evre olan altıncı evre başlamıştır. Evre başlangıcında yeni sentezlenen kütikülada ekzo-endokütiküla farklılaşması belirgin olarak görülmemiştir (Şekil 4.1.1.14). Genel olarak böceklerde

eski kütiküla dorsalde toraks'dan başlayarak abdomene doğru çizgi boyunca yırtılmaya başlar ve böcek eski kütiküladan kurtulur.

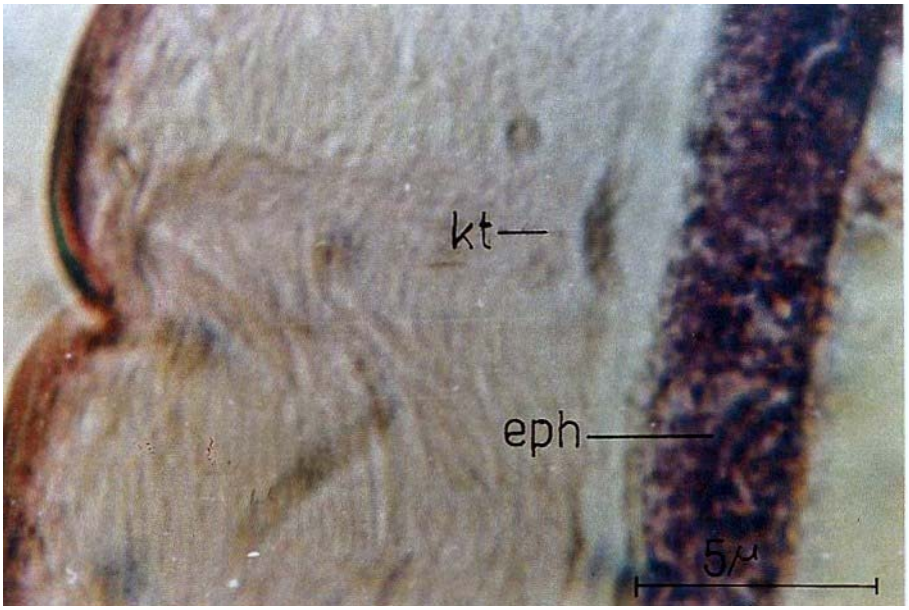
Denemelerde histolojik kesitler için numune olarak alınmayan kontrol gurubu larvaların gelişimi izlenmeye devam edilmiştir. Altıncı evreye geçen larvalar (Şekil 4.1.1.15) gelişimlerine devam ederek yedinci evreye ulaşmışlardır. Bu larvalardan ölen birkaç tanesi dışında tamamının pupa devresine ulaştığı ve ergin kelebeklere dönüştükleri gözlenmiştir (Şekil 4.1.1.16. ve Şekil 4.1.1.17.).



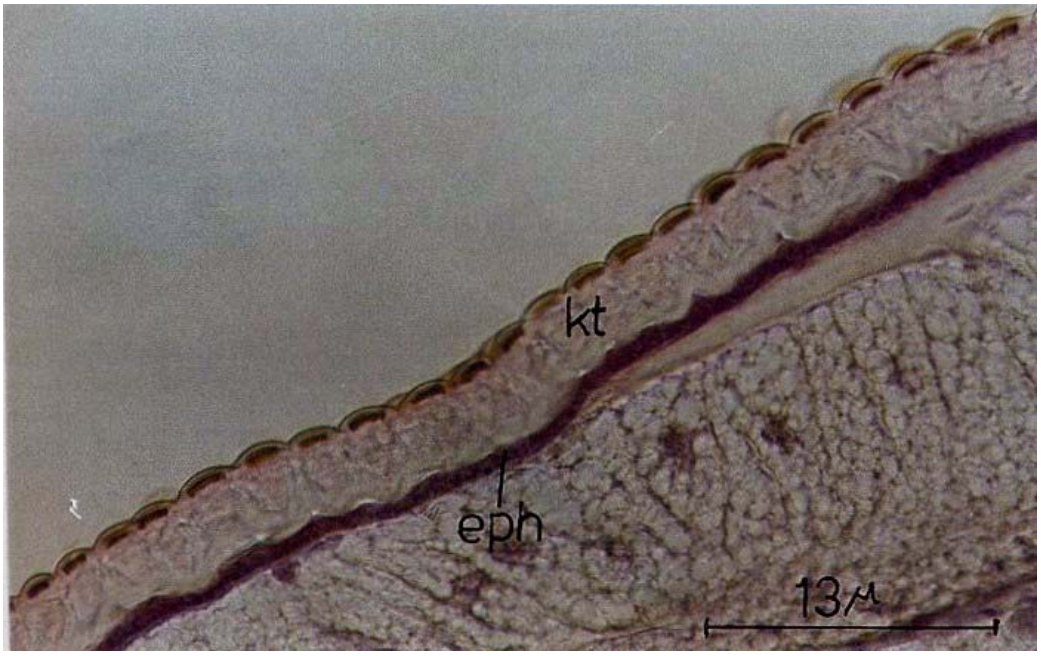
Şekil 4.1.1.12, Endo kütikuladaki lamellerin ve por kanallarının birlikte görünüşü (Hemotoksilen-eozin, x400)



Şekil 4.1.1.13, Epidermal hücrelerin prizmatikleşmesi ve yeni kütikülanın sentezlenmeye başlaması (Hemotoksilen-eozin, x400)



Şekil 4.1.1.14, Yeni sentezlenen kütikülaya ait görünüş (Ekzo-endokütükila f arklılaşması belirgin değil) (Hemotoksilen-eozin, x1000)



Şekil 4.1.1.15, Epidermal hücrelerin yeniden yassı şekil alması (Hemotoksilen-eozini, x400)



Şekil 4.1.1.16, Beşinci deriyi değiştirmiş altıncı evrenin ilk saatleri içindeki sağlıklı *G. mellonella* larvası



Şekil 4.1.1.17, Karakteristik turuncu rengi ile görülen pupa devresindeki *G. mellonella*



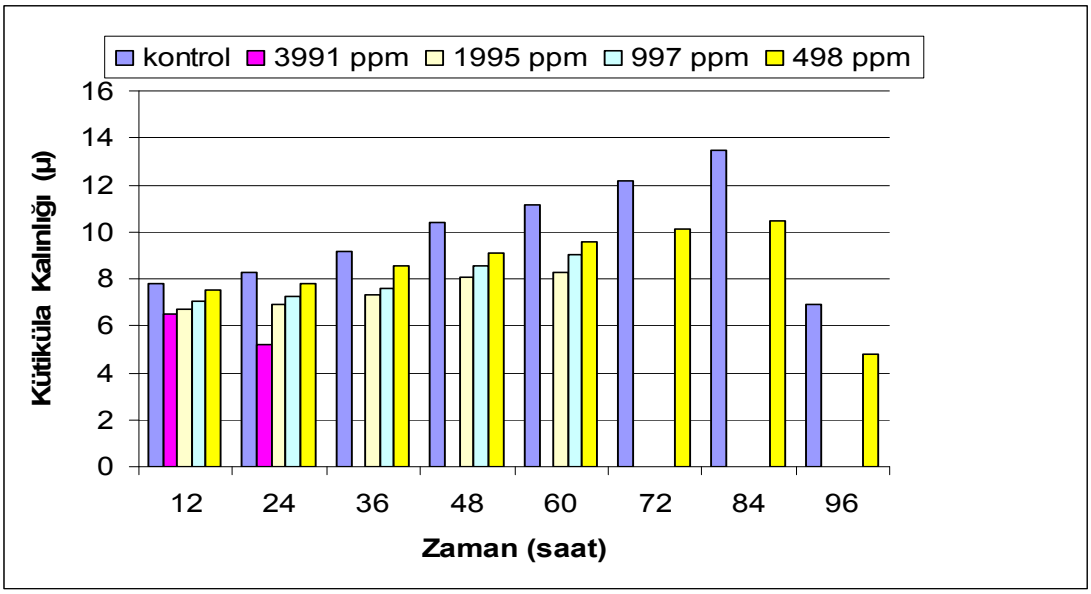
Şekil 4.1.1.18, Ergin devrede *G. mellonella* kelebeğinin görünüşü a) Üstten b) Alttan

4.1.2. Kütiküla kalınlık ölçümleri

Beşinci evre kontrol grubu larvalarının iki tekerrürlü denemelerine ait histolojik kesitlerden alınan kütiküla kalınlık ölçümleri tablo 4.1.2.1 ve 4.1.2.2'de, bu değerlere ait ortalama kütiküla kalınlık ölçüleri ise şekil 4.1.1.19'daki histogramda görülmektedir. Buna göre 12. saatte ortalama kütiküla kalınlığı 7,25 µm, 24. saatte 8,16 µm, 36. saatte 8,90 µm, 48. saatte 9,8125 µm, 60. saatte 10,91 µm , 72. saatte 11,00' tir. Şekil 4.1.1.19'da histogramda açıkça görülebileceği gibi kontrol grubu larvalarında kütiküla kalınlığı 12. saatten 60. saate kadar zamana bağlı olarak düzenli bir şekilde artmıştır.

Tablo 4.1.2.1, Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm Azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının kütiküla kalınlıklarına ait birinci tekerrür değerleri
ex: Deney grubundaki *G. mellonella* larvalarının hepsi ölmüştür.

Zaman (saat)	1.Tekerrür Dozlar(ppm)				
	KONTROL	3991	1995	997	498
	Kütikula Kalınlığı(**µm**)				
12	7,791	6,48	6,73	7,011	7,516
24	8,294	5,184	6,92	7,257	7,813
36	9,159	ex	7,287	7,562	8,57
48	10,368	ex	8,035	8,55	9,102
60	11,145	ex	8,278	9,016	9,59
72	12,182	ex	ex	ex	10,118
84	13,478	ex	ex	ex	10,483
96	6,91	ex	ex	ex	4,82

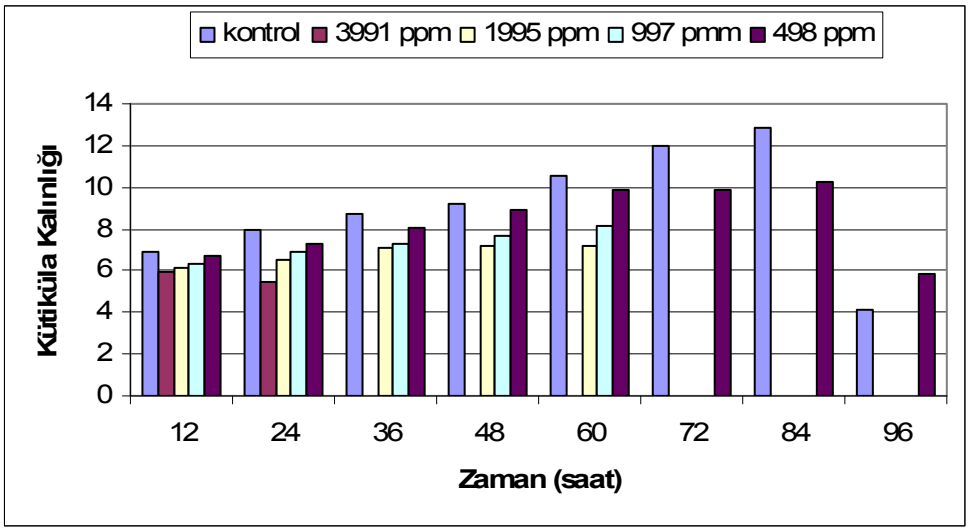


Şekil 4.1.2.1, Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm Azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının kütiküla kalınlıklarına ait birinci tekerrür değerlerini gösterir histogram

Tablo 4.1.2.2, Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının kütiküla kalınlıklarına ait ikinci tekerrür değerleri

ex: Deney grubundaki *G. mellonella* larvalarının hepsi ölmüştür.

Zaman (saat)	2.Tekerrür Dozlar(ppm)				
	KONTROL	3991	1995	997	498
	Kütikula Kalınlığı(**µm**)				
12	6,857	5,987	6,152	6,348	6,725
24	7,925	5,457	6,548	6,937	7,253
36	8,751	ex	7,051	7,293	8,015
48	9,243	ex	7,152	7,657	8,953
60	10,591	ex	7,193	8,143	9,917
72	11,987	ex	ex	ex	9,923
84	12,873	ex	ex	ex	10,271
96	4,15	ex	ex	ex	5,872



Şekil 4.1.2.2, Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm Azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının kütiküla kalınlıklarına ait ikinci tekerrür değerlerini gösterir histogram

12., 24., 36.,48.,60.,72.,84. ve 96 saatlerine ilişkin alınan kütiküla kalınlığı ölçümleri dozlara göre değişip değişmediğini belirlemek amacıyla tek yönlü Anova test istatistiği uygulanmıştır. Uygulama sonucunda her bir saat dilimine göre betimsel test istatistiği tabloları ve test istatistiği sonuçları aşağıdaki şekildedir.

İlk 12 saat sonunda elde edilen ölçümlere ilişkin ANOVA tablosu aşağıdaki şekildedir.

Tablo.4.1.2.3, Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm Azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının 12.saatte kütiküla kalınlıklarına ait betimsel istatistik test sonuçları

Betimsel istatistik : Kütiküla kalınlıklarına ait sayısal sonuçların toplanıp analiz yapılabilecek hale getirilmesi.

saat12

Betimsel İstatistik

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	% 95 Güven Aralığı		Minimum	Maximum
					Alt Sınır	Üst Sınır		
Kontrol	4	7,2525	,45103	,22551	6,5348	7,9702	6,86	7,79
doz1	4	6,1450	,32990	,16495	5,6201	6,6699	5,76	6,48
doz2	4	6,4575	,35018	,17509	5,9003	7,0147	6,15	6,79
doz3	4	6,7500	,37842	,18921	6,1479	7,3521	6,35	7,13
doz4	4	7,0675	,37907	,18953	6,4643	7,6707	6,73	7,52
Toplam	20	6,7345	,53213	,11899	6,4855	6,9835	5,76	7,79

ANOVA

saat12

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P Değeri
Gruplar Arası	3,215	4	,804	5,567	,006
Grup İçi	2,165	15	,144		
Toplam	5,380	19			

ANOVA tablosunda test istatistiği sonucuna bakıldığında p=0,087 > α = 0,05olduğundan dolayı uygulanan ile 498,997,1995 ve 3991ppm ilaç dozlarının ilk 12 saat sonunda kütiküla kalınlığı üzerine etkisi yoktur diğer bir ifadeyle kütiküla uzunlukları arasında fark görülmemiştir.

İkinci 12 saat sonunda yani 24. saat sonunda elde edilen ölçümlere ilişkin ANOVA tablosu aşağıdaki şekildedir.

Tablo4.2.2.4, Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm Azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının 24.saatte kütiküla kalınlıklarına ait betimsel istatistik test sonuçları

Betimsel İstatistik

saat24

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	% 95 Güven Aralığı		Minimum	Maximum
					Alt Sınır	Üst Sınır		
Kontrol	4	8,1600	,32650	,16325	7,6405	8,6795	7,86	8,56
doz1	4	5,5425	,39229	,19615	4,9183	6,1667	5,18	6,10
doz2	4	6,7275	,28791	,14395	6,2694	7,1856	6,42	7,02
doz3	4	7,2900	,46776	,23388	6,5457	8,0343	6,94	7,96
doz4	4	7,5400	,43290	,21645	6,8512	8,2288	7,10	8,00
Toplam	20	7,0520	,96992	,21688	6,5981	7,5059	5,18	8,56

ANOVA

saat24

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P Değeri
Gruplar Arası	15,625	4	3,906	26,057	,000
Grup İçi	2,249	15	,150		
Toplam	17,874	19			

ANOVA tablosunda test istatistiği sonucuna bakıldığında p= 0,002 < α=0,05 olduğundan dolayı uygulanan 498,997,1995 ve 3991ppm ilaç dozlarının 24. saat sonunda kütiküla kalınlığı üzerine etkisi vardır. Yani dozlara göre kütiküla kalınlıklarının ölçümleri farklıdır.

Hangi dozlar arasında fark olup olmadığının belirlenmesi amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden TUKEY HSD uygulanmıştır.

Çoklu Karşılaştırma Testleri

Tablo 4.1.2.5, Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm Azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının 24.saatte dozlara göre kütiküla kalınlık artışındaki çoklu karşılaştırma test sonuçları (*=seçilen doza göre farklılık gözlemlenmiştir)

Çoklu Karşılaştırma

24. saatteki değerlerin karşılaştırması

Tukey HSD

(I) dozlar	(J) dozlar	Ortalama Farkı (I-J)	Std.Hata	P Değeri	% 95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
Kontrol	doz1	2,61750*	,27379	,000	1,7721	3,4629
	doz2	1,43250*	,27379	,001	,5871	2,2779
	doz3	,87000*	,27379	,042	,0246	1,7154
	doz4	,62000	,27379	,210	-,2254	1,4654
doz1	Kontrol	-2,61750*	,27379	,000	-3,4629	-1,7721
	doz2	-1,18500*	,27379	,005	-2,0304	-,3396
	doz3	-1,74750*	,27379	,000	-2,5929	-,9021
	doz4	-1,99750*	,27379	,000	-2,8429	-1,1521
doz2	Kontrol	-1,43250*	,27379	,001	-2,2779	-,5871
	doz1	1,18500*	,27379	,005	,3396	2,0304
	doz3	-,56250	,27379	,289	-1,4079	,2829
	doz4	-,81250	,27379	,062	-1,6579	,0329
doz3	Kontrol	-,87000*	,27379	,042	-1,7154	-,0246
	doz1	1,74750*	,27379	,000	,9021	2,5929
	doz2	,56250	,27379	,289	-,2829	1,4079
	doz4	-,25000	,27379	,887	-1,0954	,5954
doz4	Kontrol	-,62000	,27379	,210	-1,4654	,2254
	doz1	1,99750*	,27379	,000	1,1521	2,8429
	doz2	,81250	,27379	,062	-,0329	1,6579
	doz3	,25000	,27379	,887	-,5954	1,0954

36.saat :

Tablo 4.1.2.6, Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm Azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının 36.saatte kütiküla kalınlıklarına ait betimsel istatistik test sonuçları

Betimsel İstatistik

saat36

	N	Ortalama	Std.Sapma	Std. Hata	% 95 Güven Aralığı		Minimum	Maximum
					Alt Sınır	Üst Sınır		
Kontrol	4	8,9050	,38232	,19116	8,2966	9,5134	8,44	9,27
doz2	4	7,3650	,52621	,26311	6,5277	8,2023	6,99	8,13
doz3	4	7,7450	,63961	,31980	6,7272	8,7628	7,29	8,69
doz4	4	8,4425	,48273	,24136	7,6744	9,2106	8,02	9,07
Toplam	16	8,1144	,77109	,19277	7,7035	8,5253	6,99	9,27

ANOVA

saat36

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P Değeri
Gruplar Arası	5,723	3	1,908	7,164	,005
Grup İçi	3,196	12	,266		
Toplam	8,919	15			

Çoklu karşılaştırma testleri

Tablo 4.1.2.7, Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm Azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının 36.saatte dozlara göre kütiküla kalınlık artışındaki çoklu karşılaştırma test sonuçları (*=seçilen doza göre farklılık gözlemlenmiştir)

Çoklu Karşılaştırma

36. Saatteki Değerler
Tukey HSD

(I) ydoz	(J) ydoz	Ortalama Farkı (I-J)	Std. Hata	P Değeri	% 95 Güven Aralığı Alt Sınır	% 95 Güven Aralığı Üst Sınır
Kontrol	doz2	1,54000*	,36490	,006	,4567	2,6233
	doz3	1,16000*	,36490	,035	,0767	2,2433
	doz4	,46250	,36490	,599	-,6208	1,5458
doz2	Kontrol	-1,54000*	,36490	,006	-2,6233	-,4567
	doz3	-,38000	,36490	,729	-1,4633	,7033
	doz4	-1,07750	,36490	,051	-2,1608	,0058
doz3	Kontrol	-1,16000*	,36490	,035	-2,2433	-,0767
	doz2	,38000	,36490	,729	-,7033	1,4633
	doz4	-,69750	,36490	,274	-1,7808	,3858
doz4	Kontrol	-,46250	,36490	,599	-1,5458	,6208
	doz2	1,07750	,36490	,051	-,0058	2,1608
	doz3	,69750	,36490	,274	-,3858	1,7808

48. saat

Tablo 4.1.2.8, Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm Azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının 48.saatte kütiküla kalınlıklarına ait betimsel istatistik test sonuçları

ANOVA

saat48

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P Değeri
Gruplar Arası	9,583	3	3,194	7,643	,004
Grup İçi	5,015	12	,418		
Toplam	14,598	15			

Betimsel İstatistik

saat48

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std.Hata	% 95 Güven Aralığı		Minimum	Maximun
					Alt Sınır	Üst Sınır		
Kontrol	4	9,8125	,54708	,27354	8,9420	10,6830	9,24	10,37
doz2	4	7,8400	,85685	,42843	6,4766	9,2034	7,15	8,97
doz3	4	8,2925	,65342	,32671	7,2528	9,3322	7,66	9,09
doz4	4	9,2375	,45959	,22980	8,5062	9,9688	8,95	9,92
Toplam	16	8,7956	,98650	,24662	8,2700	9,3213	7,15	10,37

Çoklu karşılaştırma testleri

Tablo 4.1.2.9,Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm Azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının 48.saatte dozlara göre kütiküla kalınlık artışındaki çoklu karşılaştırma test sonuçları (*=seçilen doza göre farklılık gözlemlenmiştir)

Çoklu Karşılaştırma

48. Saatteki Değerler

Tukey HSD

(I) ydoz	(J) ydoz	Ortalama Farkı (I-J)	Std. Hata	P Değeri	% 95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
Kontrol	doz2	1,97250*	,45712	,005	,6154	3,3296
	doz3	1,52000*	,45712	,027	,1629	2,8771
	doz4	,57500	,45712	,605	-,7821	1,9321
doz2	Kontrol	-1,97250*	,45712	,005	-3,3296	-,6154
	doz3	-,45250	,45712	,758	-1,8096	,9046
	doz4	-1,39750*	,45712	,043	-2,7546	-,0404
doz3	Kontrol	-1,52000*	,45712	,027	-2,8771	-,1629
	doz2	,45250	,45712	,758	-,9046	1,8096
	doz4	-,94500	,45712	,218	-2,3021	,4121
doz4	Kontrol	-,57500	,45712	,605	-1,9321	,7821
	doz2	1,39750*	,45712	,043	,0404	2,7546
	doz3	,94500	,45712	,218	-,4121	2,3021

ANOVA

saat60

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P Değeri
Gruplar Arası	19,353	3	6,451	14,322	,000
Grup İçi	5,405	12	,450		
Toplam	24,759	15			

Çoklu karşılaştırma testleri

Tablo 4.1.2.10, Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm Azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının 60.saatte dozlara göre kütiküla kalınlık artışındaki çoklu karşılaştırma test sonuçları (*=seçilen doza göre farklılık gözlemlenmiştir)

Çoklu Karşılaştırma

60. Saatteki Değerlendirmeler
Tukey HSD

(I) ydoz	(J) ydoz	Ortalama Farkı (I-J)	Std. Hata	P Değeri	% 95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
Kontrol	doz2	2,85250*	,47458	,000	1,4435	4,2615
	doz3	2,15750*	,47458	,003	,7485	3,5665
	doz4	,92750	,47458	,258	-,4815	2,3365
doz2	Kontrol	-2,85250*	,47458	,000	-4,2615	-1,4435
	doz3	-,69500	,47458	,487	-2,1040	,7140
	doz4	-1,92500*	,47458	,007	-3,3340	-,5160
doz3	Kontrol	-2,15750*	,47458	,003	-3,5665	-,7485
	doz2	,69500	,47458	,487	-,7140	2,1040
	doz4	-1,23000	,47458	,095	-2,6390	,1790
doz4	Kontrol	-,92750	,47458	,258	-2,3365	,4815
	doz2	1,92500*	,47458	,007	,5160	3,3340
	doz3	1,23000	,47458	,095	-,1790	2,6390

Tablo 4.1.2.11, Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm Azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının 72.saatte kütiküla kalınlıklarına ait betimsel istatistik test sonuçları

Betimsel İstatistik

saat72

	N	Ortalama	Std.Sapma	Std.Hata	% 95 Güven Aralığı		Minimum	Maximum
					Alt Sınır	Üst Sınır		
Kontrol	4	11,9950	,40894	,20447	11,3443	12,6457	11,43	12,38
doz2	2	8,8300	1,47078	1,04000	-4,3845	22,0445	7,79	9,87
doz3	2	9,1550	,92631	,65500	,8324	17,4776	8,50	9,81
doz4	4	10,1850	,30094	,15047	9,7061	10,6639	9,90	10,61
Toplam	12	10,3908	1,42013	,40996	9,4885	11,2931	7,79	12,38

ANOVA

saat72

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P Değeri
Gruplar Arası	18,390	3	6,130	12,923	,002
Grup İçi	3,795	8	,474		
Toplam	22,184	11			

Çoklu karşılaştırma testleri

Tablo 4.1.2.12, Kontrol grubu ile 498,997,1995 ve 3991ppm Azadirachtin uygulanan beşinci evre *G. mellonella* larvalarının 72.saatte dozlara göre kütiküla kalınlık artışındaki çoklu karşılaştırma test sonuçları (*=seçilen doza göre farklılık gözlemlenmiştir)

Çoklu Karşılaştırma

72. Saatteki Değerlendirmeler

Tukey HSD

(I) ydoz	(J) ydoz	Ortalama Farkı (I-J)	Std. Hata	P Değeri	% 95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
Kontrol	doz2	3,16500*	,59645	,003	1,2550	5,0750
	doz3	2,84000*	,59645	,006	,9300	4,7500
	doz4	1,81000*	,48700	,024	,2505	3,3695
doz2	Kontrol	-3,16500*	,59645	,003	-5,0750	-1,2550
	doz3	-,32500	,68872	,963	-2,5305	1,8805
	doz4	-1,35500	,59645	,184	-3,2650	,5550
doz3	Kontrol	-2,84000*	,59645	,006	-4,7500	-,9300
	doz2	,32500	,68872	,963	-1,8805	2,5305
	doz4	-1,03000	,59645	,371	-2,9400	,8800
doz4	Kontrol	-1,81000*	,48700	,024	-3,3695	-,2505
	doz2	1,35500	,59645	,184	-,5550	3,2650
	doz3	1,03000	,59645	,371	-,8800	2,9400

T-Test

Grup İstatistikleri

	grup	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalaması
saat84	kontrol	4	13,1000	,44234	,22117
	doz4	4	10,4050	,27331	,13666

Bağımsız Numune Testi

	Varyansların Kalitesi için Levene's Testi		Ortalama seviye için t-testi						
								% 95 Zamanlar arasındaki farklılığın güven aralığı	
saat 84	F	P Değeri	t	Serbestlik Derecesi	ig. (2-tailed	Ortalama Farkı	Std. Hata Farkı	Alt Sınır	Üst Sınır
Eşit kabul edilen varyanslar	3,527	,109	10,366	6	,000	2,69500	,25998	2,05884	3,33116
Eşit kabul edilmeyen varyanslar			10,366	4,999	,000	2,69500	,25998	2,02666	3,36334

T-Test

Grup İstatistikleri

	grup	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalaması
saat96	kontrol	4	13,4475	,42578	,21289
	doz4	4	10,4975	,24309	,12154

Bağımsız Numune Testi

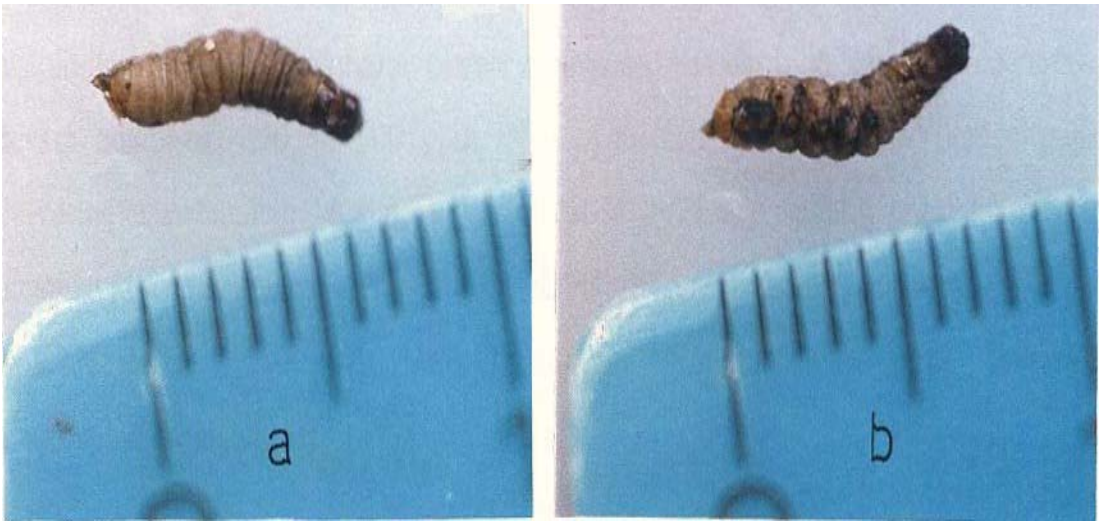
	Varyansların kalitesi için Levene's Testi		Ortalama seviye için t-testi						
								% 95 Zamanlar arasındaki farklığın güven aralığı	
	F	P Değeri	t	Serbestlik derecesi	ig. (2-tailed	Ortalama Farkı	Std. Hata Farkı	Alt Sınır	Üst Sınır
Eşit kabul edilen varyanslar	6,694	,041	12,034	6	,000	2,95000	,24514	,35015	,54985
Eşir kabul edilmeyen Varyanslar			12,034	4,768	,000	2,95000	,24514	,31050	,58950

4.2. Neem (*Azadirachtin indica*)'in 5. Evre *Galleria mellonella* L. Larvalarının İntegümenti Üzerindeki Makroskobik Ve Histolojik Etkileri

498 ppm uygulanan deney grubunda ilk 24 saatte makroskobik olarak değişiklik gözlenememiştir. Ancak tüm gruplarda gelişim inhibisyonu, hareketsizlik (paralize olma durumu) ve ilerleyen saatlerde kanama görülmüştür (Şekil 4.2.1.2.). 997 ve 1995 ppm Azadirachtin uygulanan deney gruplarındaki larvaların integümentinde 24. saatten itibaren renk değişimi (koyulaşma, kararma) gözlemlenmiştir. 3991 ppm uygulanan deney grubunda bu durum 12. saatten itibaren gözlemlenmiş olup renk değişiminin yanı sıra kanama gelişimsel inhibisyon ve paralize olma şeklinde etkileri de gözlemlenmiştir. Histolojik kesit hazırlamak için belirtilen saatlerde alınan numuneler özellikle bu şekilde etkilenmiş larvalardan seçilmiştir. Ancak bu numunelerin preparasyonu ve boyama işlemlerinde güçlük çekilmiştir. Bu durumun Azadirachtin'in yol açtığı patolojik etkilerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca Azadirachtin uygulanan numunelere ait histolojik preparatlarda kontrol grubunda görülen endokütikülar lameller belirgin olarak görülememiştir.

Azadirachtin'in *G. mellonella* larvaları üzerindeki bir diğer etkisi de deri değiştirme süresini uzatmasıdır. Kontrol grubu larvalarında 5. ve 6. evre kütikülalarının bir arada bulunduğu anı histolojik kesitlerde gözlemlemek çok zor olmuştur. Çünkü eksydsis olayının sağlıklı larvalarda birkaç saat süren hızlı bir olay olduğu bilinmektedir. Ancak Azadirachtin uygulanan larvalarda deri değiştirme engellendiği ve bu süre çok uzadığı için histolojik kesitlerde bu olay sadece 5. ve 6. evrenin gözlemlenebildiği 498 ppm uygulanan deney grubunda kolayca görülmüştür.

Ekdysis anı histolojik kesitlerde 498 ppm'lik dozda 96 saate kadar gözlemlenmiştir. 997, 1991 ve 3991 ppm'lik dozlarda ise canlı larva kalmamıştır. Dolayısıyla deri değiştirme süresi Azadirachtin'nin etkisiyle uzamış, hatta hiç gerçekleşememiştir.

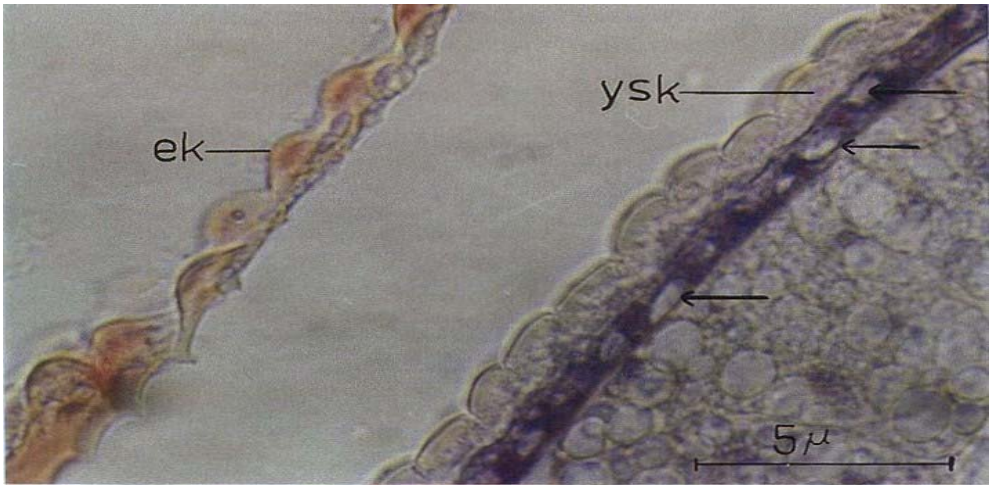


Şekil 4.2.1.2, Azadirachtin'in etkisiyle integümentinde aşırı koyulaşma ve kararma meydana gelen *G. mellonella* larvalarının a) Üstten, b) Alttan

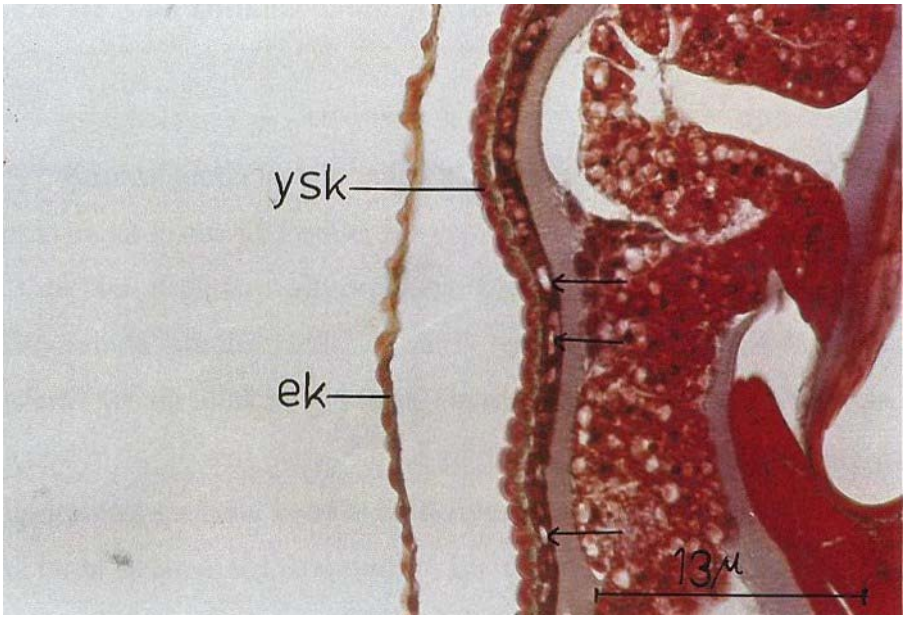
Kontrol grubu larvalarda olduğu gibi, Azadirachtin uygulanan ve denemelerde histolojik kesitler için numune olarak alınmayan larvaların gelişimi de izlenmeye devam edilmiştir. 498 ppm Azadirachtin uygulanan larvaların bir kısmı pupa devresine ulaşabilmiştir. Ancak bu pupaların hiçbirinden sağlıklı ergin kelebekler olmadığı gözlemlenmiştir. Kelebekler morfolojik olarak deformasyona uğramış (çatal kanat) ve yumurtlamamışlardır. Bu durum Azadirachtin'in uzun süreli insektisit etkisini ispatlamaktadır. 3991,1991 ppm ve 997 ppm Azadirachtin uygulanan larvaların hepsi pupa devresine ulaşmadan ölmüştür.

Kontrol grubu larvalarında olduğu gibi ; 498, 997, 1995 ve 3991 ppm Azadirachtin uygulanan larvalara ait histolojik kesitlerden yapılan kütikülar kalınlık ölçümleri Tablo 4.1.2.1., Tablo 4.1.2.2. , bu değere ait ortalama kütikülar kalınlık ölçüleri ise Şekil 2.19, Şekil 2.20 deki histogramda görülmektedir. Kontrol grubu larvalarının 84. saatten sonra altıncı evreye geçtiği dikkate alınarak, beşinci evre kütikülar kalınlığı için yapılacak ölçümler ilk 84 saat olarak kabul edilmiştir. Tablo.1.1' de görüleceği gibi kontrol grubunu kıyasla Azadirachtin uygulanan grupların kütikülar kalınlığında önemli miktarda düşüş tespit edilmiştir.

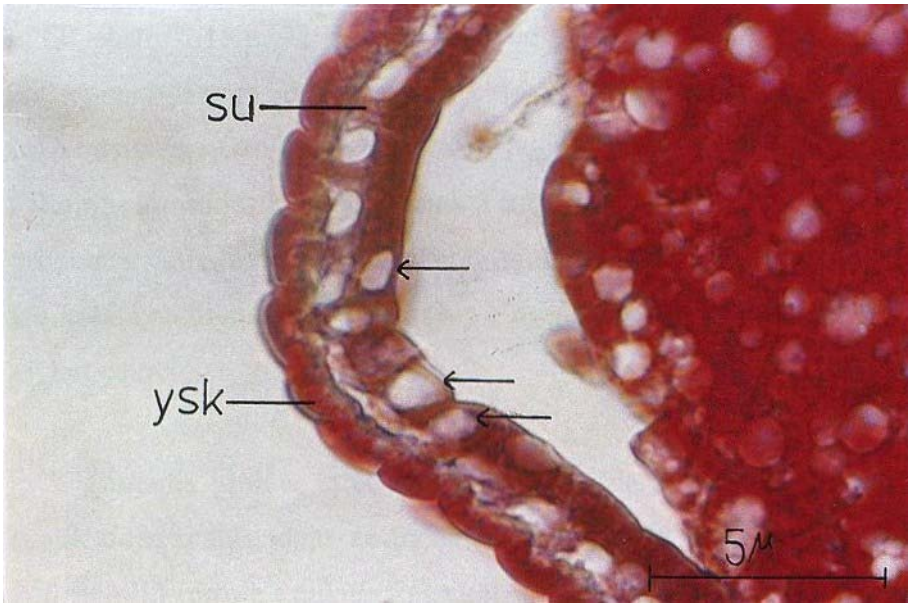
Azadirachtin'in integüment üzerindeki tek etkisi kütiküla üzerinde olmamıştır. Azadirachtin epidermis tabakasındaki epidermal hücrelerde kontrol grubunda görülmeyen irili ufaklı çok sayıda vakuolün oluşmasına sebep olmuştur. Bu vakuoller 498 ppm'lik dozda 72. saat, 1995 ppm'lik dozda 60.saatten sonraki histolojik kesitlerde gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.1.3. , 4.2.1.4.).



Şekil 4.2.1.2, 498 ppm Azadirachtin uygulanan *G. mellonella* larvalarının 72. saatte epidermal hücrelerinde görülen vakuoller (Vakuoller tek okla gösterilmiştir) (Hemotoksilen-eozini, x1000)



Şekil 4.2.1.3, 1995 ppm Azadirachtin uygulanan *G. mellonella* larvalarının 60. saatte epidermal hücrelerinde görülen vakuoller (Vakuoller tek okla gösterilmiştir) (Crossman modifikasyonu üçlü boyama, x400)



Şekil 4.2.1.4, 1997 ppm Azadirachtin uygulanan *G. mellonella* larvalarının 60. saatte epidermal hücrelerinde görülen vakuoller (Vakuoller tek okla gösterilmiştir) (Crossman modifikasyonu üçlü boyama, x400)

Elde edilen kütiküla kalınlıklılarına ait değerlerin belirtilen her saat için grup ortalamaları Anova testi ile karşılaştırılmış ve gruplar arasındaki fark çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir. Tablo. 4.1.2.3. de görüldüğü gibi tüm saatlerde kontrol grubu kütiküla kalınlığı ile 489,997,1995 ve 3991 ppm Azadirachtin uygulanan grupların kütiküla kalınlığı arasında önemli fark olduğu tespit edilmiştir. Kütiküla kalınlığı her üç dozda Azadirachtin'i etkisi ile önemli oranda incelmiştir. Sadece ilk 36 saatte kontrol grubu ile 498 ppm'lik doz arasındaki farkın önemli olmadığı görülmüştür.

Azadirachtin uygulanan ancak bir üst seviyeye geçmeyi başarabilen larvaların altıncı evre kütiküla kalınlıklarına bakıldığında kontrol grubuna kıyasla yine bariz bir azalma görülmüştür. Bu durum. Azadirachtin'in uzun süreli etkisinin devam ettiğini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

G. mellonella lavralarının kütiküla yapısı elektron mikroskobu düzeyinde Hegazy ve ark. (1980) tarafından incelenmiş; kütkülanın, epikütiküla ve prokütüladan meydana geldiği ifade edilmiştir. *G. mellonella* larvalarında epikütikülada sement ve mum tabakalarının bulunmadığı, bununla birlikte epikütikülanın dış tarafında kütikülün olmak üzere üç ince tabakadan meydana geldiği, iç epikütiküla ya da protein epikütikülanın amorf bir tabaka şeklinde olduğu ifade edilmiştir.

Bu çalışmada epikütiküla ince bir çizgi şeklinde gözlenmiş olup, ışık mikroskobu düzeyinde epikütiküla tabakalarını ayırt etmek mümkün olmamıştır. 5. evre başında prokütikülada, ekzokütiküla ve endokütiküla net bir şekilde henüz farklıklaşmamıştır. 5. evrenin ilerleyen saatlerinde kütiküladaki kalınlaşma ile bu tabakalar ve por kanalları görülebilmiştir. Wigglesworth (1974) ve Ronald ve Richards'ın (1965) çalışmalarında belirttiği mezokütiküla *G. mellonella* lavralarında görülmezken, Ronald ve Richards (1965) tarafından interzon kütiküla olarak adlandırılan tabaka görülmüştür. *G. mellonella* larvalarına ait histolojik kesitlerde por kanalları; epikütikülanın altında ve ekzo kütikülada dallanan, endokütikülada birleşerek tek bir kanal oluşturan yapıya sahiptir. Por kanallarının bu benzer yapısı *Diataraxia oleracea* (L.) larvalarının kütikülasında görülmüş ve bu yapının Lepidopter larvaları için karakteristik olduğu ifade edilmiştir (Way 1950). Histolojik kesitlerde gözlemlediğimiz tüberküllerin Way (1950) tarafından Lepidopter larvaları için karakteristik bir yapı olduğu bildirilmiştir. Tüberküllerin görevi epikütikülanın elastikiyetini kolaylaştırmak, endokütikülanın büyümesine ve uzamasına izin vermek olarak açıklanmıştır.

Bu çalışmada halk arasında kovan güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella* L. zararlısının beşinci evre larvaları üzerinde bir organik bir insektisit olan Azadirachtin'nin etkileri ışık mikroskobik düzeyde araştırılmaya çalışılmıştır.

Araştırmada kullanılan Neem ’in Galleria *mellonella* 5. evre larvaları üzerindeki LC_{95} dozu 3991 ppm olarak tespit edilmiştir.

498 ppm’lik dozda vakuollere rastlanılmamıştır fakat 997 ve 1995 ppm Neem uygulanan *G. mellonella* larvalarının 84. saatten sonraki integümente ait histolojik kesitlerinde epidermal hücrelerde irili ufaklı çok sayıda vakuol görülmüştür. Bu vakuollerin toksifikasyon sonucu oluşan yapılar olması muhtemeldir. Benzer şekilde DFB’in etkisi ile *M. domestica*’nın epidermisinde çok sayıda vakuoller ve artık kitleler gözlenmiştir (Hegazy ve ark. 1990). DFB’in etkisi ile *L. decemlineta* larvalarının epidermal hücreleri düzenli mikroviluus şekillerini ve membran plakalarını kaybetmiş, sitoplazmalarında çok sayıda büyük vakuoller göstermişlerdir (Hegazy ve ark. 1989). *T. molitor* ve *M. seperata*’da DFB’in uygulanması sonucunda epidermal hücrelerde anormallikler meydana getirdiği bildirilmiştir (Ren ve ark. 1988).

Denemelerle kullandığımız Azadirachtin her dört dozda, integümentte zamana bağlı olarak aşırı koyulaşmaya, kopmalara, kanamaya, üremede azalmaya, büyüme ve gelişme geriliğine sebep olmuştur. Benzer şekilde; (Jacobson 1989; Ascher 1993; Schmutterer 1995; Awad ve ark. 1998) ‘da Azadirachtin, böceklerde uzaklaştırıcı, beslenmeyi engelleyici, doğurganlığı azaltıcı, kısırlaştırıcı, öldürücü, yumurta bırakmayı önleyici, gelişme ve büyümeyi aksatıcı gibi etkileri olduğunu ifade etmişlerdir.

Kültür bitkilerine önemli zarar veren başta Lepidoptera ve Orthoptera olmak üzere Homoptera, Heteroptera, Lepidoptera, Coleoptera, Diptera ve Hymenoptera takımına bağlı birçok türde bu etkiler çok sayıda çalışmalarla araştırılmıştır (Kısmalı ve Madanlar 1988; Jacobson 1989; Koul ve ark. 1990; Schmutterer 1990; Ascher 1993; Durmuşoğlu ve ark. 2003). Benzer şekilde, Hegazy ve ark.’ da (1980), enjeksiyon yoluyla uygulanan ve kimyasal bir insektisit olan DFB’in *G. mellonella* larvalarının kütikülasında çatlamalara ve kararmaya sebep olduğu, larvaların hemolenfini kaybettiğini gözlemlemişlerdir. DFB’den etkilenen *G. mellonella* larvalarının eski kütikülalarını hatta baş kapsüllerini bile atmayı başaramadığı

açıklanmıştır. Leuscer (1972), *Antestiopsis orbitalis bechuana* Kirk.(Het.:Pen - tatomidea)'ın 5. Nimf dönemine metanolle hazırlanmış Neem ekstratı uygulamıştır. Bu nimflerden oluşmuş erginlerin pronotum ve kanatlarında anormallikler görülmüştür. Aynı şekilde *E. varivestis*'in 5. larva dönemine Neem türevleri uygulandığında kanatları zarar görmüş erginler elde edilmiştir. Uygulama, aynı böceğin ilk larva dönemlerinde yapıldığında bu durumda prepupa-pupa ve pupa-ergin arası dönemler ortaya çıkmıştır.

Azadirachtin indica bitkisinden elde edilen Azadirachtin son yıllarda üzerinde en çok çalışılan bitkisel kökenli bir insektisittir (Kısmalı ve Madanlar 1988; Schmutterer 1990). *A. indica*, yaprak veya kabuklarının kurutulmasıyla toz halinde, meyve veya tohumdan terpenoid yapıda olan azadirachtin ekstrakte edilerek, tohum veya tohum kabuğundan elde edilen yağ gibi çeşitli şekillerde zararlılarla mücadelede kullanılmaktadır (Schmutterer 1995).

Çok sayıda araştırma Azadirachtin'in böceklerde uzaklaştırıcı, beslenmeyi engelleyici, doğurganlığı azaltıcı, kısırlaştırıcı, yumurta bırakmayı engelleyici ve gelişmeyi düzenleyici gibi etkilere sahip olduğunu belirgin bir şekilde göstermiştir. AZ, AZA'dan AZG'ye kadar uzanan bir grup izomer içerir. AZA, *A. İndica*'nın tohumlarında bol olarak bulunur. AZE aynı zamanda çok etkili bir böcek gelişimi düzenleyicisidir (Rembold ve ark. 1984).

İnsektisitlerle yapılan çalışmalar, böceklerin insektisitlere karşı gösterdikleri direnç (Boiteau ve ark. 1985; Argentine ve Clark 1990; Wool ve Greenberg 1990; Bansal ve Singh 2004; Du ve ark. 2005), insektisitlerin enzim aktiviteleri üzerine olan etkileri (Terriere ve Yu 1974; Patil ve ark. 1980; Bughio ve Wilkins 2004), letal ve subletal dozların morfolojik ve fizyolojik etkileri (Hodjad 1971; Alford ve Holmes 1980; Overmyer ve Noblet 2003; Bondrenko ve ark. 2004) üzerine olup oral yolla alınan organik insektisitlerin kitin sentezi üzerine olan etkileri konusunda yapılan çalışmalar yetersiz kalmıştır.

Bu bakımdan, bu çalışmada *G.mellonella* larvalarının besin yolu ile aldıkları farklı konsantrasyonlardaki Azadirachtin'in kitin sentezi ve integüment üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yarı sentetik besine karıştırma yoluyla dört doz olarak uyguladığımız Azadirachtin'in *G.mellonella* larvalarının gelişimi, integümenti ve büyümesi üzerindeki etkileri gözlemlenmeye çalışılmıştır.

Novak (1975) *Rhodnius prolixus* larvalarının, Ünsal ve Ayvalı (1989) *A. segetum* larvalarının deri değiştirme siklusu boyunca sırasıyla; başlangıçta epidermal hücrelerinin yassı olduğunu, kütiküla kalınlığının artmasıyla, epidermal hücrelerin kübikleştiğini, kütikülanın apolysis safhasıyla epidermisten ayrıldığını, epidermal hücrelerin prizmatikleştiğini ve yeni kütiklanın sentezlenmeye başlandığını, eski prokütikülanın sindirildiğini, ekdysis safhasında eskilerinin sindirilmeyen kısmının atıldığını, epidermal hücrelerin yeniden kübik ve yassı şekle dönüştüğünü, yeni kütikülada kalınlık artışının devam ettiğini bildirmişlerdir. Bu durum beşinci evreden altıncı evreye geçen kontrol grubu *G. mellonella* larvalarının histolojik kesitlerindeki gözlemlerimizle aynıdır. Bastourous ve ark. (1971), *S. Littoralis* larvalarında larval gelişim boyunca integüment kalınlığının arttığını belirtmişlerdir. Lee ve ark. (1990) *S. littoralis* larvalarının integümentinde evre boyunca meydana gelen bu kalınlaşmayı endokütikülalardaki lamel miktarının artmasına bağlamışlardır. *A. ypsilon* ve *Agrotis tokionis Bulter* türlerinin kütiküla yapısını elektron mikroskobik düzeyde inceleyen Yin-Chang ve ark. (1990), deri değiştirmeden sonra prokütikülada lamel sayısının arttığını gözlemişlerdir. Böylece kütiküla kalınlığı artmıştır. Sağlıklı *G. mellonella* larvalarında zamana bağlı olarak kütiküladaki kalınlık artışı, ifade edilen türlerle benzer bulunmuştur.

Denemelerde kullanılan 3991 ppm'lik doz, Neem,' in *G. mellonella* larvaları için LC_{95} değeri olup 1995, 997 ve 498 ppm bu dozun azalan değerleridir. Kullanılan her doz beşinci evre kütiküla kalınlığında önemli incelmeye sebep olmuştur. Kontrol grubunda ortalama kütiküla kalınlığı maksimum 13.478 μm'ye ulaşırken, 3991 ppm'lik dozda 6.48 μm'ye, 1995 ppm'lik dozda 8.78 μm'ye, 997 ppm'lik 9,01

µm'ye 498 ppm'lik dozda ise 10.48 µm'ye kadar düşmüştür. Kütikülladaki bu incelme, Neem' in kütiküla sekresyonu üzerindeki etkisini gösterir. Bu durum Neem'in kitin sentezi inhibisyonuna sebep olması, bu sebeple kütikülaya prokütikülar lamel katılımının engellenmesi şeklinde açıklanabilir. Bununla birlikte dozlar arasında etki bakımından fark olmaması önemlidir. Bu durum her dört dozun eşit düzeyde kitin sentezi inhibisyonuna sebep olduğuna işaret eder ancak bir insektisit olarak Azadirachtin, beşinci evre *G. mellonella* larvaları üzerinde 3991 ppm'lik dozda %95 oranında, ilerleyen süreçte 1995 ppm ve 997 ppm 'lik dozlarda da %95 oranında ölüme sebep olurken, 498 ppm'lik dozda larvaların yaşamı sürerken gelişme, büyüme ve üremeye engel olabilmiştir.

Histolojik kesitlerde sağlıklı *G. mellonella* larvalarının en geç 96.saatte deri değiştirmiş olduğu ve bir üst evreye geçtiği gözlenmiştir. Sağlıklı böceklerde birkaç saatte gerçekleşen ekdysis olayı ve histolojik kesitlerde o anın yakalanarak gözlenmesi çok zordur. Azadirachtin uygulanan larvalarda ise 498 ppm'lik dozda 96. saatte gözlemlenmişken, 3991,1995 ve 997 ppm'lik dozlarda ise ekdysis olayı hiç gözlenememiştir. Bu durum aslında Azadirachtin uygulanan larvaların ekdysis başaramamalarına yani eski derilerini atmada zorluk çektiklerine, Azadirachtin etkisiyle yeni sentezlenen kütikülanın zayıflığına ve yetersizliğine işaret eder. Sağlıklı yeni bir kütiküla sentezlenmediği için larvalar eski kütikülalarını atamamaktadır. Dolayısıyla etkilenen larvalarda deri değiştirme süresi uzamaktadır. Benzer şekilde; Reynolds (1987), kimyasal bir insektisit olan DFB uygulanan böceklerin her zamanki gibi deri değiştirme siklusunu başlattığını ancak ekdysis zamanı geldiğinde zayıf düşen böceğin eski kütikülayı atmayı başaramadığını, çünkü yeni kütikülanın hem sertliğinin hemde sağlamlığının ciddi şekilde bozulduğunu belirtmiştir. *Lymantria dispar L.* (*Lep:Lymantriidae*), *Heliothis virescens (*F.*), S. frugiferda, Pectinophora gossypiella (Lep.: Gelechidae) ve Manduca sexta (*L.*) (Lep.: Sphingidae)* larvalarına Neem türevleri uygulandığında, gömlek değiştirmeyi engelleyici etkileri görülmüştür (Skatulla and Meisner 1975; Haasler 1984; Kubo ve ark. 1986). Benzer şekilde nohut bitkisine Neem yaprağı tozu uygulandığında söz konusu maddenin *H. Armigera*'nın gelişmesinde çok önemli etkiler yaptığı ve antifeedant özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bu maddenin ergin çıkışınıda

önlediği görülmüştür. *H. Armigera*'nın suni diyetine Neem yaprağı tozu eklendiğinde larva süresinin uzadığı, pupa oluşunun azaldığı, pupa boyutlarının küçüldüğü, ağırlığının azaldığı ve ergin meydana gelmediği de tespit edilmiştir (Jabbar ve ark. 1992). *S. littoralis*'e karşı Neem kökenli insektisitler uygulandığında düşük pupa olma oranı ve ergin çıkışında azalma gibi benzer sonuçlar elde edilmiştir (Cheng-Jen ve ark. 1995).

Neem türevleri değişik böceklerde büyümeyi düzenleme üzerindeki etkileri birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Quadri ve marsaiah (1978), *Periplenata americana* (L.) (Orth.: Blattidae)'nin son dönemde nimflerine azadirachtin'in enjekte edilmesi sonucunda birkaç gün içinde gömlek değiştirme olayında bir gecikmenin ortaya çıktığını bildirmiştir. Benzer sonuçlar, *Blatta orientalis* L. (Orth.: Blattidae), *Blattidae germanica* (L.) *ve Supella longipalpa* (F.) (Orth.: Blatellidae)' nin I. Nimf dönemlerinde Neem türevlerinin uygulanması sonucunda ölümler, V. nimf dönemlerine uygulanması halinde de gelişmede gecikme ve artan ölümler elde edilmiştir (Adler ve Uebel 1987),

Sieber ve Rembold (1983), Azadirachtin'in *Locusta migratoria migratoroides* (R-F) (Orth.: Acrididae) üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada IV. ve V. dönem nifmler Azadirachtin injekte edildiğinde ölümle birlikte gömlek değiştirmede durma görülmüştür.

Heyde ve ark. (1984), Neem yağı ve zengileştirilmiş Neem tohum kabuğu ekstraktı uygulanmış *S. furcifera*, *N. virescens* ve *N. lugens*'de çok değişik derecelerde ortaya çıkan gelişmeyi düzenleyici etkilerine dikkat çekilmiştir. Bu etkiler; gömlek değiştirmede düzensizlikler, gelişmede yavaşlama, nimf dönemlerinin süresinin uzaması doza bağlı ölümler şeklinde olmuştur.

Azadirachtin'in *G. mellonella* üzerinde gözlediğimiz diğer önemli etkileri, larvalarda uyuşukluk, hareketsizlik ve gelişim inhibisyonuna sebep olması, larvaların pupal devreye ulaşmasını engellemesi, pupal devreye ulaşan larvalardan ise sağlıklı ergin kelebeklerin oluşmasını önlenmesidir.

Neem kökenli bileşiklerin, böceklere toksisitesi ve ürün kayıplarını önlemedeki etkisini tespit etmek amacıyla küçük ölçekli tarla denemeleri yapılmıştır. Azadirachtin ve Neem Azal-F, lahana ve karnabahar gibi sebzeleri *Mamestra brassicae*, *Pieris rapae* (L.) (Lep.:Pieridae) ve *Plutella xylostella* (L.) (Lep.: Plutellidae) gibi Lepidoptera takımına bağlı zararlı türlerin zararından korumuştur. Bununla birlikte bu larvaların aniden ölmediği, bitki üzerinde çok az beslendiği veya hiç beslenmediği tespit edilmiştir (Mordue ve ark. 1995). Metanol ve kloroformun (9:1)'luk karışımıyla yapılan Neem tohumu ve yeşil yaprak ekstraksiyonu *H. armigera* üzerinde denenmiştir. Ekstraktın farklı dozları nohut, *C. cajan* ve pamuk bitkilerinin yapraklarına ve kozalarına uygulanmıştır. İlaçlanmış bitkiler, *H. armigera* larvalarına besin olarak verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, tüm biyolojik parametrelere olumsuz yönde etki yaptığını göstermiştir. Larva dönemlerinin gelişme süreleri, larva ölümleri, larvalarda kanama, kararma, prepupa süresi, prepupa ölümü ve pupa süresi ektraktın artan konsantrasyonuna bağlı olarak artmıştır. Değişik biyolojik dönemlerin gelişme sürelerinin uzaması ve artan ölüm oranları Neem ekstraktlarının insektisit ve antifeedant özelliklerini göstermektedir (Jaglan ve ark. 1997).

Kitin sentezi inhibisyonunda , *G. mellonella* larvalarında kitin sentezi inhibe etme ve dolayısıyla kütiküla kalınlık artışını engellemek için 498 ppm'lik doz yeterli olabilirken Neem'in insektisit olarak beşinci *G. mellonella* larvaları üzerinde LC_{95} değeri 3991 ppm olarak bulunmuştur. Diğer böcekler ve diğer insektisitlerle yapılan çalışmalar dikkate alındığında bu oldukça yüksek bir dozdur. AZT-VR-K, Neem Guard ve Neem Ark isimli üç Neem ürünü, *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hom.: Aphididae)' ye karşı yaprak yüzeyi ilaçlaması şeklinde denenmiştir. %1'lik konsantrasyonda AZT-VR-K ile ilaçlanmış yaprak diskleri üzerine salınmış 3. dönem nimflerde %98,3 oranında ölüm meydana gelmiştir. I. ve II. dönem nimflerin kullanılması halinde yüksek toksisite görülmüştür. Neem Guard ve Neem Ark'ın daha az etkili olduğu anlaşılmıştır.

Azadirachta indica dahil 8 bitki ekstratının ovisid etkisi laboratuar koşullarında *Corcyra cephalonica* staint. (Lep.:Galleriidae) yumurtlamaları üzerinde

incelenmiştir.*A. indica*'nın hem %1.5'luk petrol eteri ve hemde %2'lik metanol ekstraktı yumurta açılımını engellemiştir. Benzer sonuçlar aynı bitki ektraktının *Spilosoma obliqua* (Wlk.) (Lep.: Arctiidae) yumurtlamalarına uygulanmasıyla da elde edilmiştir. Bu türün yumurtalarına, *A. indican*'ın %1.5'luk petrol eteri ve %1.5'luk metanol ekstraktı uygulandığında hiçbir yumurta açılmamıştır (Ghatak ve Bhusan 1995).

Sentetik organik pestisitlerin yaygın şekilde kullanılması insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkilerken diğer taraftan birtakım çevre sorunlarına neden olmaktadır. Bu yüzden, bu pestisitlerin yerine geçecek olan doğal bileşikler gibi alternatiflerin aranmasına başlanılmıştır. Doğal bileşiklerden olan Neem ekstraktları, zararlılarla savaşta oldukça ümit var sonuçlar vermiştir. Neem ekstraktları zararlılara beslenme engelleyici, doğurganlığı azaltıcı, anormal gelişmeye neden olucu ve toksik etki gibi yollarla olumsuz etkileri de bulunmaktadır.

Neem ekstraktları üzerindeki çalışmalar, zararlılara karşı etkili oluşları, doğal yollarla dekompoze olmaları, dikkati çekecek derecede seçici olmaları ve bu nedenle yararlı ve hedef olmayan organizmalara zararsız olmaları gibi konularda yoğunlaşmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı, Neem türevleri IPM (INTEGRATED PEST MANAGEMENT: Entegre zararlı yönetimi) programları için çok uygun potansiyel aday durumundadır. Bu gün Türkiye'de özellikle seralarda IPM programlarında uygulanması konusunda iyimser bir yaklaşım söz konusudur.

Zararlılara karşı savaşta yeni ufuklar açan Neem türevlerinin elde edildiği Neem ağaçlarının Türkiye'nin sıcak yörelerinde yetiştirilmeye başlaması Türkiye için yaşamsal önemdedir.

6.SONUÇ

Büyük balmumu güvesine karsı kullanılan kimyasal maddelerden birçoğu balmumu ve balda kalıntı bırakarak ürünün pazar sansını düşürmekte veya yok etmektedir. Bu açıdan günümüzde, zararlıya karsı kullanılan ilaçların kalıntı durumu ve uygulanabilme kolaylığı göz önüne alınarak yeni arayışlara yönelmek kaçınılmaz olmuştur (Allan 2000).

Ülkemizde azadirachtin içeren Neem AZAL T/S isimli bir preparat ruhsatlıdır. Ülkemizde bitkisel kökenli etki maddeler hakkındaki çalışmaların sayısı oldukça azdır. Organik tarımın popüler olduğu son yıllarda bu insektisitlerin kullanımına gerek duyulmaktadır. Ayrıca gelecek yıllarda bu bitkisel kökenli doğal insektisitlerin üretimi sentetik insektisitlerin yerini alabileceği varsayılmakla birlikte, bu tür insektisitlerin hem kalitesinin hem de sayısının artacağı kesindir. Bu yüzden yukarıda anlatılan bitkisel kökenli doğal insektisitlerin ülkemizde de bir an önce ruhsatlandırılmasının ve bu tür insektisitlerin ülkemiz şartlarında üretilmesinin de önünün açılmasının hem ülke ekonomisine hem yeni bir sektör olması hem de önünün açık olması nedeniyle uygun olacağı düşünülmektedir.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar, Azadirachtin uygulamasının *G.mellonella* larvaları üzerinde gerek üremede, gerekse gelişme ve büyümesi üzerindeki etkinliği, uygulama kolaylığı, bal ve bal mumunda kalıntı bırakmaması, insan ve arı sağlığına zararlı olmaması gibi nedenlerle büyük balmumu güvesine karsı kullanılan diğer uygulamalara karşı alternatif bir mücadele yöntemi olabileceğini göstermektedir.

5. KAYNAKLAR

Ahmad, M. 1994. Biological Control of Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L. Journal of Apicultural Research (Pakistan). Vol. 32(3),319-323.

Allan, L. 2000. Wax Moth and its Control. Department of Agriculture Western Australia.http://www.agric.wa.gov.au/agency/pubns/farmnote/2000/f00697.htm.

Argentıne, J.A. and Clark, M., 1990. Selection for Abamectin in Colorado Potato Beetle (Coleoptera.Chrysomilidae). Pestic. Sci., 28; 17-24.

Alford, A.R., and Holmes, J.A., 1980. Sublethal Effects of Carbaryl, Aminocarb, Fenitrothion and Bacillus thuringiensis on the Development and Fecundity on the Sprace Budworm (Lepidoptera:tortricidae). J.Econ Entomol., 79; 31-34.

Ali, A. D., Bakry, N.M., Abdellatif,M.A., El-sawaf, S.K.1973. The caontrol of greater wax moth, Galleria mellonella L., by chemicals I. susceptibility of the wax moth larvae and honey-bee workers to certain chemicals. Z. Ang. Ent. 74: 170-177

Asif, G.A. and Ali, F.A., 1988. Effect of Malathion on the Total Glucose and Proteins in the Mangomealybug, Drosicha stebbingi (Coccidae: Homoptera)., Punj. Ab. Univ. J. Zool., 3 (0). 61-69.

Bailey, D.L., Lowe, R.E., Dame, D.A. and Seawright, J.A., 1980. Mass Rearing the Genetically Altered Macho Strain of Anopheles albimanus Wiedemann. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29: 141-149.

Bansal, S.K. and Singh, K. V., 2004. Efficacy of Different Organophosphate and Synthetic Pyrethroid Insectisides to the Larvae of Malaria vector Anopheles stephensi, Liston. Journal of Enviromental Biology, 25 (4), 485-488.

Boiteau, G., King, R.R. and Levesque, D., 1985. Lethal and Sublethal Effects of Aldicarb on two Potato Aphids (Homoptera:Aphidea): Myzus persicae (Sulner) and Macrosiphum euphorbiae (Thomas). J. Econ. Entomol., 78; 41-44.

Campion, D.G., 1972. Insect Chemosterilants: A Review. Bull. Ent. Res., 61, 577-635.

Chamber, H.W., 1992. Organophosphorus Compounds: An Overview. In Organophosphates: chemistry, Fate and effects; Chambers, J.E., Levi, P.E.,Eds; Academic San Diego, CA, pp 3-17

Cohen, E., Podoler, H. and Hamlauwi, M.E., 1988. Effect of Malathion-Bait Mixture on Two Parasitoids of the Florida Red Scale, Chrysomphams aonidum (L). Crop. Protection, 7, 91-95.

Ephrati, H. 1997. Control of Beeswax moths using carbondioxide in flexible plastic and metal structure. In: Proc. Int. Conf. Controlled atmosphere and fumigation in grain storages 21-26 April 1996, Nicosia Cyprus pp: 169-174.

Gallo, M. and Lawryk, N.J., 1991. Organic Phosporus Pesticides. In Handbook of Pesticide Toxicology; Hayes, W.J., Laws, E.R., Eds; Academic. San Diego, CA, Vol: 2, pp. 917-1123.

Godfray, H.C.J., 1994. Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology. Princeton University Pres, Princenton, N.J.

Gounari, S., Thrasyvoulou, A. 1995. Dibrachys cavus (Walker), A Parasite of The Greater Wax Moth (*Galleria mellonella* L.) and Honeybees (*Apis mellifera* L.). The XXXIVth International Apicultural Cong. of Apimondia. Lausanne, 510pp.

Haewoon, O., ManYoung, L., Young Duck, Chang. 1995. Developing Periods and Damage Patterns of Combs by The Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. Korean Journal of Apiculture 10: 1, 5-10.

Haynes, K.F., 1988. Sublethal Effects of Neurotoxic Insecticides on Insect Behavior. Ann. Rev. Entomol., 33, 149-168.

Hegazy, G., Degheele, D.1992. The effect of DFB on the ultrastructure of the integument during moult events of Musca domestica. Parasitica 48 (1) : 3-14

Hodjad, S. H., 1971. Effects of Sublethal Doses of Insectisides and of Diet and Crowding on Dysdercus fasciatus Sign (Hem:Pyrrhocoridae). Bull. Entomol.Res., 60; 367-378

Hoskins, W.M., 1940. Recent Contributions of Insect Physiology to Insect Toxicology and Control. Hilgardia, 13: 307-386

Kumova, U., Korkmaz, A. 2002. Peteklerin Büyük Bal Mumu Güvesi (*Galleria mellonella* L.) 'ne Karsı Korunması Üzerine Bir Arastırma. Türkiye 3. Arıcılık Kongresi. Adana.

Krell, R. 1996. Value-added Products from Beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin.No 124. Rome.

Novak,V.J.A. 1975. Insect Hormones. Chapman and Hall, London. Second English Edition. 208-219

Özparlak, H., 2003. Böceklerde Kutikulanın Yapısı, Deri Değiştirme ve Diflubenzuron'un (DFB) Etkileri. S.Ü. Fen-Edb. Fakültesi Fen Dergisi, 21: 7-19.

Pant. C.P., 1983. Space Aprays Used in Mosquito Control. pp. 37-48. In, Integrated Mosquito Control Methodologies, Vol. 1, Laird, M. and J.W.Miles, eds.. Academic Press, London, 369 pp.

Patil, B.V., B.S. Nandiphalli, H.Parameswar, B.R. Thimmanagonda and S. Lingappa. 1990. Role of plant and animal products in control of cotton whitefly, ***Bemisia tabaci***. Abstract No:14 in National Symposium on Problems and Prospects of Botanical Pesticides in IPM (21-22 Jan. 1990) C.T.R.I. Rajahmundry, India.

Patil, T. N.,Abdelfattah, A.S.A., Koch, R.B. and Plapp, F.W., 1980. ATPase and Dehidrogenase Activites From House Flies Susceptible and Resistantive Organochlorine Insectisides. Pesticide Biochemistry and Physiology, 13; 5-12.

Robert, L.L. and Olson, J.K., 1989. Effect of Sublethal Dosages of Insecticides on Culex quinquefasciatus. J.M. Mosq. Control Assoc., Vol 5, ISS 2, 239

Singh, P., 1977. Artificial Diets for Insects, Mites and Spiders. Plenum, Newyork 594 p.

Soderstrom, E.L. and Lovitt, A.E., 1970. Effect of Malathion on the Production and Viability of Eggs of Indian-Meal Moth. J. Econ. Entomol., 63;902-905.

Stark, J.D., Wong, T.T., Vargas, R.I. and Thalman, R.K., 1992. Survival, Longevity and reproduction of Tephritid Fruitfly Parasitoids Hymenoptera:Braconidae) Reared from Fruit Flies Exposed to Azadiractin. J.J. Econ. Entomol., 85; 4, 1125-1129

Sanford, M.T. 2003. Controlling Wax moth, one of a series of the Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension

SattigI, H. N., Lingappa, S., Kulkarni, K. A. 1993. Management of Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L. by Using Lime Sulphur. Journal of Agricultural Sciences 6(3): 301-303.

Schumutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from Neem tree ***Azadiarchta indica***. Annu. Rev. Entomol. 35:271-297.

Tutkun E., Çakmakçı, L., Bosgelmez A. 1987. BalArısı Kolonilerinde Bacillus thurugiensisPreparatlarının Büyük Mum Güvesi (*G. Mellonella*) Larvalarına Karsı Kullanım Olanakları Üzerinde Arastırmalar.

Tübitak, Tarım ve Ormancılık Arastırma Grubu, Tarımsal Mikrobiyoloji Ünitesi Proje no: Tarmik-8-34 s.

Terriere, L.C. and YU, S. J. 1974. The Induction of Detoxifying Enzymes in Insects. J. Agric. Food Chem., 22 (3); 366-373.30

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

Van De Veire, M., Deghhele , D. 1980. Fate of the chitin synthesis inhibitör DFB in larvae of the cihitin synthesis inhibitör DFB in *Galleria mellonella* L. And *Spodoptera littoralis* Boisd. Last evre Larvae. Parasitic 38 (2): 65-74

Whitcomb, W. J. 1946. Feding bees for comb production. Glean. Bee cult. 74: 198-202.

Way, J.M. 1950. The structure and development of the larval cuticle of Diataraxia oleracea (L). Quart.J.Micr.Sci.91 (2):145-179

Ware, G., 1989. The pesticide Book. Thompson, Fresno, CA, P. 336.

Wool, D. and Geenberg, S., 1990. Esterase Activity in Whiteflies (Bemisia tabaci) in Israel in Relation to Insecticide Resistance. Entomol. Exp. Appl.,57; 251-258.

Wright, J.E. and Spates, G.E., 1976. Reproductive Inhibition Activity of the Insect growth Regulator TH 6040 Against the Stable Fly and House Fly: Effects on HYİN-atchability. J. Econ. Entomol., 69: 365-368.

Yacobson, B., Navarro, S., Donahaye, E. J., Azrielli, A., Sloyevsky, Y. and 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.