ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DIFLUBENZURON'UN *Periplaneta americana* 'NIN ORTA BAĞIRSAĞINA VE KİTİN MİKTARINA ETKİSİ

Hakan ESKİZENGİN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2018

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hakan ESKİZENGİN tarafından hazırlanan "**Diflubenzuron'un *Periplaneta americana* 'nın Orta Bağırsağına ve Kitin Miktarına Etkisi**" adlı tez çalışması 19/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nursel GÜL
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Nuri YİĞİT
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Nursel GÜL
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Selami CANDAN
Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atilla YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

19.06.2018



Hakan ESKİZENGİN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DIFLUBENZURON'UN *Periplaneta americana* 'NIN ORTA BAĞIRSAĞINA VE KİTİN MİKTARINA ETKİSİ

Hakan ESKİZENGİN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nursel GÜL

Hücrelerin ölümüne sebep olan Diflubenzuron'un *Periplaneta americana* 'nın orta bağırsak (mide) hücrelerindeki çekirdek yapısını etkileyip etkilemediğini gözlemek amacıyla floresan mikroskopta inceleme yapıldı. Ayrıca böceğin kütikülasındaki kitin miktarına Diflubenzuron'un en etkili dozu ve uygulama süresi tespit edildi. Deneylerde *Periplaneta americana* 'nın 5. evre nimfleri iki takım halinde kullanıldı. Takımlardan birisi orta bağırsağın incelenmesi için diğeri ise kütiküladaki kitin miktarının ölçümünde kullanıldı. Her takımda bir kontrol grubu ve besinlerine beş farklı konsantrasyonda (10, 30, 50, 100 ve 300 ppm) Diflubenzuron uygulanan deney grupları oluşturuldu. Her deney grubunda 6 birey kullanıldı. Diflubenzuron uygulanmasından 24 saat, 48 saat, 72 saat, 1hafta ve 1 ay sonra sağ kalan bireylerden kütiküla dokusu böceklerin abdomeninden disekte edildi. Doku örnekleri floresan mikroskobu yöntemiyle, kitin miktarı ise spektrofotometrik yöntemle tespit edildi.

Elde edilen bulgulara göre 10, 30 ve 50 ppm'lik Diflubenzuron dozlarının deney sürelerinde kontrol grubuyla benzer orta bağırsak histolojisi gösterdiği ve buna bağlı olarak Diflubenzuron'un bu dozlarda etkili olmadığı anlaşıldı. Buna karşılık 100 ve 300 ppm'lik Diflubenzuron dozlarının bütün uygulama sürelerinde hamam böceklerinin orta bağırsağındaki villus yapısındaki hücrelerin düzensiz dizilmesine, anormal hücre ve nükleus şeklinin oluşmasına ve sitoplazmalarında materyal kaybına sebep olduğu gözlendi.

Kitin sentezine Diflubenzuron'un etkisini tespit etmek amacıyla yapılan testlerde 24 saatlik sürede 100 ve 300 ppm'lik dozların kitin miktarını azalttığı ortaya konuldu. Ayrıca 1 aylık sürede 300 ppm'lik dozun kitin miktarını bütün deneme dozları ve sürelerinden daha çok azalttığı anlaşıldı.

Yüksek Lisans Tez çalışması Diflubenzuron'un 100 ve 300 ppm'lik dozlarının orta bağırsak hücrelerinde yapısal hasara ve kitin miktarının azalmasına sebep olduğunu ortaya koydu.

Haziran 2018, 52 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Periplaneta americana***,** Diflubenzuron, kitin miktarı, hücre yapısı, doz cevabı

ABSTRACT

Master Thesis

THE EFFECTS OF DIFLUBENZURON ON MIDGUT AND CHITIN AMOUNT OF *Perıplaneta americana*

Hakan ESKİZENGİN

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Nursel GÜL

Fluorescence microscopy was performed to observe whether Diflubenzuron, which caused the death of the cells, affected the core structure of *Periplaneta americana* in the cells of the midgut (stomach) cells. In addition, the most effective dose and duration of diflubenzuron was determined for the amount of chitin in cockroaches. In the experiments, the 5th grade of *Periplaneta americana* was used in two sets. One of them was used for the examination of the middle intestine and the other was used for the measurement of the amount of chitin in the cuticle. In each set, experimental groups were administered with a control group and diflubenzuron at five different concentrations (10, 30, 50, 100 and 300 ppm) in their nutrients. Six individuals were used in each experimental group. Cuticular tissue was dissected from the abdomen of the insects from the surviving individuals 24 hours, 48 hours, 72 hours, 1 week and 1 month after administration of diflubenzuron. Tissue samples were detected by fluorescence microscopy and the amount of chitin was determined by spectrophotometric method.

According to the findings, it was understood that the doses of 10, 30 and 50 ppm Diflubenzuron showed similar midgut histology with the control group during the experimental period and accordingly, Diflubenzuron was not effective at these doses. On the other hand, it was observed that during the whole application period of 100 and 300 ppm doses of Diflubenzuron, irregular arrangement of cells in the villus structure of midgut of cockroaches, abnormal cell and nucleus shape formation and material loss in cytoplasm were observed.

Tests to detect the effect of Diflubenzuron on the synthesis of chitin showed that the doses of 100 and 300 ppm decreased the amount of chitin in 24 hours. It was also found that during the 1-month period, 300 ppm doses reduced the amount of chitin more than all test doses and times.

Master thesis study showed that doses of 100 and 300 ppm of Diflubenzuron caused structural damage in the midgut cells and decreased chitin content.

June 2018, 52 pages

Key Words: *Periplaneta americana*, Diflubenzuron, chitin amount, cell structure, dose response

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her aşamasında bana bilgi ve tecrübeleriyle katkı sağlayan, yardımlarını esirgemeyen, bana mesleğimi sevdiren, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, kendisini her zaman örnek aldığım danışman hocam Prof. Dr. Nursel GÜL'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), teori kurmamda bana yardımcı olan Prof. Dr. Nuri YİĞİT'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), bana yol gösteren Prof. Dr. Suna CEBESOY'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), Arş. Gör. Dr. Hatice MUTLU EYİSON'a ve Arş. Gör. Derya ÇETİNTÜRK'e çok teşekkür ederim. Her türlü histolojik çalışmada benden tecrübelerini esirgemeyen Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Zekiye SULUDERE ve Uzman Damla AMUTKAN hocalarıma çok teşekkür ederim.

Laboratuvarda birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve tez çalışmam boyunca bitmeyen kaprislerime katlanan, zorlu deney düzeneğini kurmamda yardımcı olan Burcu ÜNLER'e, Zeynep YAŞAR ARIKAN'a, Burcu BAYRAMLI' ya ve Ceren GÜLER'e çok teşekkür ederim. Yıllardır manevi ve maddi desteklerini benden esirgemeyen, bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan ve üzerimde çok büyük emekleri bulunan aileme çok teşekkür ederim.

Hakan ESKİZENGİN

Ankara, Haziran 2018

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. KURAMSAL TEMELLER **4**
2.1 *Periplaneta americana* **4**
2.2 Hamamböceğinin Kütikülası **6**
2.3 Kitin **7**
2.4 Hamamböceğinde Orta Bağırsak (Mide) Yapısı **8**
2.5Diflubenzuron **10**
3. MATERYAL ve YÖNTEM **12**
3.1 Böcek Kültürü **12**
3.2 Böceklere Diflubenzuron Uygulanması **12**
3.3 Floresan Mikroskobu Preparasyonu **14**
3.4 Spektrofotometrik İşlemler **15**
4. BULGULAR **16**
4.1 Diflubenzuron'un *Periplaneta americana*'nın Orta Bağırsak (mide) Epitel Hücrelerinin Yapısına Etkisi **16**
4.2 Diflubenzuron'un *Periplenata americana* 'nın Kütikülasındaki Kitin Miktarı Üzerine Etkileri **44**
5. TARTIŞMA ve SONUÇ **46**
KAYNAKLAR **48**
ÖZGEÇMİŞ **52**

KISALTMALAR DİZİNİ

DFB	Diflubenzuron
DMSO	Dimetilsülfoksit
$FeCl_3$-$6H_2O$	Demir(III) Klorid Hekzahidrat
HCl	Hidroklorik Asit
$KHSO_4$	Potasyum Bisülfat
KOH	Potasyum Hidroksit
$NaNO_2$	Sodyum Nitrit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PPM	Parts Per Million

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Periplaneta americana (L.)'nın yumurta paketi, nimf ve ergin dönemleri.....6
Şekil 2.2 Kitin molekülünün kimyasal yapısı 8
Şekil 2.3 Hamamböceğinde sindirim kanalı 9
Şekil 2.4 Diflubenzuron'un kimyasal yapısı.....10
Şekil 2.5 Deneylerde kullandığımız Diflubenzuron'un ticari şişesi 11
Şekil 3.1 Deneylerde kullanılan hayvan örnekleri 13
Şekil 4.1 Işık mikroskobunda kontrol grubu böceğin bağırsak villus yapısı (a) ve floresan mikroskobunda orta bağırsak görüntüsü(b)……...17
Şekil 4.2 Işık mikroskobunda 24 saat 10 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı. 18
Şekil 4.3 Işık mikroskobunda 24 saat 30 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı. 18
Şekil 4.4 Işık mikroskobunda 24 saat 50 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı. 19
Şekil 4.5 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 24 saat 100 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı. 20
Şekil 4.6 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 24 saat 300 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı. 21
Şekil 4.7 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 48 saat 10 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı. 22
Şekil 4.8 Işık mikroskobunda 48 saat 30 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı. 23
Şekil 4.9 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 48 saat 50 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı. 24
Şekil 4.10 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 48 saat 100 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı. 25
Şekil 4.11 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 48 saat 300 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı. 26
Şekil 4.12 Floresan mikroskobunda 72 saat 10 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 27
Şekil 4.13 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 72 saat 30 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı. 28
Şekil 4.14 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 72 saat 50 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 29
Şekil 4.15 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 72 saat 100 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 31

Şekil 4.16 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 72 saat 300 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 32
Şekil 4.17 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 1 hafta 10 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 33
Şekil 4.18 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 1 hafta 30 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 34
Şekil 4.19 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 1 hafta 50 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 35
Şekil 4.20 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 1 hafta 100 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 36
Şekil 4.21 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 1 hafta 300 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 37
Şekil 4.22 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 1 ay 10 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 39
Şekil 4.23 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 1 ay 30 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 40
Şekil 4.24 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 1 ay 50 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 41
Şekil 4.25 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 1 ay 100 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 42
Şekil 4.26 Işık mikroskobunda (a) ve floresan mikroskobunda (b) 1 ay 300 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı 43
Şekil 4.27 Spektrofotometrede kitin miktarı için yapılan optik dansite (OD) ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması 45

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 4.1 Spektrofotometrede kitin miktarı için yapılan optik dansite (OD) ölçüm sonuçları……...……44

1. GİRİŞ

Dünyadaki biyolojik çeşitliliğin büyük kısmını böcekler oluşturmaktadır. Çok çeşitli olan bu grubun üyeleri ekvatordan kutuplara, çöllerden ormanlık alanlara, dağlardan alçak düzlüklere, bataklıklardan mağaralara, soğuk su kaynaklarından sıcak su kaplıcalarına kadar hemen hemen her türlü ortama yayılmışlardır. Ülkemiz coğrafik konumu ve topografik yapısı sebebiyle birçok böcek türüne ev sahipliği yapmaktadır. Bu böcek türlerinden en önemli ve en yaygın olanlarından birisi de hamamböcekleridir.

Hamamböcekleri, insanlar tarafından iyi bilinen en eski türlerden birisidir. Bir hamamböceği türü olan *Blatella orientalis*'in Taş Devri'nde insanlarla birlikte yaşadığı fosillerle kanıtlanmıştır. O zamandan bugüne kadar gelen kalıntılara bakarak iç organlarının ve dış morfolojilerinin çok büyük değişimlere uğramadan bugünlere kadar gelebildiği görülmüştür. Hatta birçok fosil tür bugünkü familyalar içine alınmıştır (Demirsoy 2003).

Zararlılarla mücadelede biyosidal ürünler (eski adı: Pestisit) yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyosidal ürünler etki ettiği canlıya göre sınıflandırılırlar: insektisit, herbisit, fungusit, rodentisit, nematosit gibi (http.//www.who.int 2017). İnsektisitler, böceklerle yapılan mücadelede kullanılan kimyasal maddelerdir. Böceklerle mücadelede kullanılan insektisitler kimyasal özelliklerine göre organikklorlu insektisitler, organikfosfatlı insektisitler, pyretiroidler, karbamatlar, IGR (Böcek gelişim inhibitörü), bakteri kökenli insektisitler olarak gruplandırılırlar (Toros 1985).

Zararlı artropodlarla mücadelede kullanılan insektisitlerden en çok böcek gelişim düzenleyicileri (Insect Growth Regulators, IGRs) kullanılmaktadır. IGR'ler jüvenil hormon analogları ve kitin sentez engelleyiciler olmak üzere 2 tip olarak kullanılmaktadır (Koyoma vd. 1989). Kitin sentezini engelleyen böcek gelişim düzenleyicileri (IGRs) başkalaşım veya kütikülanın değişimi esnasında dış iskeletin oluşumunu sağlayan kitin sentezini engellerler ya da büyüme gelişme hormonu gibi görev yaparlar ve hormon dengesizliği sebebi ile başkalaşım evreleri (yumurta-larva-pupa-erişkin) arasında bireyin bir üst safhaya geçmesini engelleyerek etki ederler

(Koçak vd. 1997, Ware 2000, Salokhe vd. 2012, Mars 2012, Özkaya vd. 2013). Fathpour vd. (2007) bir hamam böceği türü olan *Blatella germanica* ile yaptıkları çalışmalarda, jüvenil hormon analoğu olan Pyriproxyfen uygulanan böcek yumurta kapsüllerinin kırışık, renksiz, kısmen gelişmiş olduğunu ve bazılarında nimf gelişmediğini gözlemlemişlerdir.

Takeshi vd. (1976), sivrisinek türlerinden *Culex pipiens quinquefasciatus* ve *Aedes taeniorhynchus* ile gerçekleştirdiği denemelerde, genç embriyoların Diflubenzuron'a daha duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucu Diflubenzuron uygulamasının yumurtanın genç döneminde yapılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Matolin ve Chudakova (1983), *Acheta domestica* yumurtalarıyla gerçekleştirdiği çalışmalarda, Diflubenzuron'un yumurta şekillerinde karakteristik değişikliklere neden olduğunu ve embriyo gelişiminde etkili olduğunu belirlemişlerdir. En yüksek etkinin embriyonik gelişimin hücre bölünmesi safhasında olduğunu, daha düşük bir etkinin de blastoderm safhasında olduğunu belirtmişlerdir.

Kitin sentezini engelleyici ajan olarak bilinen Diflubenzuron'un 4. evre *Manduca sexta* larvalarında post-ekdisiyal kütikülasının ultrastrüktürel yönden bozucu etki yaptığı rapor edilmiştir (Hassan ve Charnley 1987).

Zararlılara karşı kullanılan benzoylurea grubu bu bileşikler kitin sentezini engelleyerek böceğin bir sonraki döneme geçmesini önlemektedir. Bu gruptan Diflubenzuron, bireyin çoğalma ve gelişmesini engellemekte ve ölümüne neden olmaktadır. Zararlılara karşı oldukça spesifik etki göstermesine rağmen doğal düşmanlara karşı toleranslı olması sebebiyle, Coleoptera, Lepidoptera, ve Diptera ordosuna ait bazı türlerin mücadelesinde kullanılması önerilmektedir (Göktay ve Kısmalı 1990, Miyamoto vd. 1993). Wilson ve Cryan (1997), *Drosophila melanogaster* larvalarıyla yaptığı çalışmalarda yumurtalara Diflubenzuron analoğu olan Lufenuron'u uyguladıklarında bireylerin yumurtadan çıkamadığını belirtmişlerdir.

Diflubenzuron bilinen insektisitlerden farklı bir etki mekanizmasına sahiptir. Böceklerde kısırlaşmaya ve ölüme sebep olan Diflubenzuron aynı zamanda endokütiküladaki kitin sentezini engellediği için böceklerin deri değiştirmesini de engellemektedir (Göktay ve Kısmalı 1990).

Bugüne kadar yapılan araştırmaların rehberliğinde hazırlanan bu Yüksek Lisans Tez çalışmasında özellikle sivrisinek ve karasinek gibi haşerelerin larvalarında kitin sentezini engelleyen Diflubenzuron'un özellikle insanların yaşadığı mekanlarda insanlara zarar veren hamamböceğinin (*Periplaneta americana*) orta bağırsağındaki (mide) epitel hücrelerine etkisi yapısal yönden ve kütikülasındaki kitin sentezine etkisi biyokimyasal yönden incelendi.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 *Periplaneta americana*

En tanınmış iki hamam böceği türü *Blatella orientalis* ve *Periplaneta americana* ‘dır. Her iki tür de tüm dünyada yaygın olarak bulunmaktadır. *P.americana, B.orientalis ‘e* göre daha büyüktür ve kanatları abdomenden biraz daha uzundur. Bu büyük kanat boyutlarına rağmen uçabilme özellikleri yoktur. *P.americana* 23-32 mm arası uzunluğa sahipken *B.orientalis* 19-25 mm arası boy uzunluğundadır. *P. Americana* ’nın vücudu üstten basık ve oval şekillidir. Renkleri kahverengidir; siyah renkli olan *B.orientalis* ile karıştırılmamalıdır (Demirsoy 2003).

Bilinen tüm hamamböceği türleri arasında, Amerikan hamamböceği *P.americana* vücut boyu en büyük olan türdür; yaşam döngüsü boyunca yaklaşık 6-14 kez (çoğunlukla 13 kez) kabuk değiştirir; yaklaşık 700 güne kadar yaşayabilir (Li vd. 2018). Bağırsaklarındaki protozoa ve bakteriler sayesinde kendi türleri dahil birçok maddeyi sindirebilirler. Yarı başkalaşım gösteren hemimetabol böceklerdir. Yiyeceksiz 1 ay, susuz 1 hafta yaşayabilirler (Demirsoy 2003).

Hamamböceklerinin bu türünde baş, ‘pronotum’ yapısının altına gizlenmiş durumdadır. Başın her iki yanında böbrek şekilli, 2000-3000 basit gözden meydana gelmiş ‘petekgöz’ yapısı bulunmaktadır. Cisimleri şekil olarak değil ışık şiddeti algılayacak şekilde görürler. İki gözün arasında genellikle vücut boyundan uzun eşit segmentlerden oluşan bir çift anten yapısı bulunur. Karanlığa uyum sağlayan bu hayvanlarda anten uzunluğu daha fazladır. Ortamdaki nem ve negatif fototaksi bu antenler vasıtasıyla algılanır. Ağız yapıları ısırıcı çiğneyici tiptedir. Mandibulda çok gelişmiş çiğneme yapıları bulunur. Besinlerini ağız parçalarında bulunan tatma ve koklama almaçlarıyla bulurlar. Geniş bir diyete sahip olan bu tür genel olarak her şeyi yerler (Demirsoy 2003).

İnce ve uzun yapıda olan 3 çift bacakları vardır. Önden arkaya doğru gittikçe uzayan bacak yapılarının üzerinde farklı şekillerde dikenler bulunur. Bacakların 'koksa' kısımları iyi gelişmiştir. Sıçrayıcı ayak tipine sahip değillerdir fakat yine de uzun aralıklarla zıplama özelliğine sahiptirler. *P.americana* saniyede 74 cm hızla koşabilir. Genellikle kirli alanlarda yaşadıklarından antenleri kirlendiğinde ön ayaklar yardımıyla antenlerini ağızlarına götürerek temizlerler, ayaklarını da ağız parçaları ile yalayarak veya sıyırarak temizlik yaparlar.

Genel olarak karanlık ve nemli yerlerde, çürümüş organik maddelerin altında, ağaç ve yaprak döküntülerinin içinde ve buna benzer yerlerde yaşarlar. Doğada serbest yaşayanların bir zararı saptanmamıştır. Fakat ev ve işyerlerinde yaşayanlar büyük sorunlara sebep olabilmektedir. Gerek beslenmeleri sebebiyle ortaya çıkan tahribat, gerekse üzerinde dolaştıkları besinlere hastalık bulaştırmaları büyük sorun oluşturmaktadır (Demirsoy 2003).

Periplaneta americana 'nın sistematikteki yeri şu şekildedir;

Şube: Arthropoda (Eklembacaklılar)

Sınıf: Insecta (Böcekler)

Takım: Blattodea (Hamamböcekleri)

Familya: Blattidae

Cins: *Periplaneta*

Tür: *Periplaneta americana (L.)*



Şekil 2.1 *Periplaneta americana (L.)*'nın yumurta paketi, nimf ve ergin dönemleri

2.2 Hamamböceğinin Kütikülası

Eklembacaklıların dış iskeleti, epidermis tarafından salgılanan cansız bir örtü olan kütiküladır. Kütiküla, böceklerdeki gövde ve üyelerin, apodemlerin (iç destekler ve kas bağlantıları) ve kanatların güçlü dış iskeletini oluşturur. Aynı zamanda canlı dokularla dış çevre arasında koruyucu bir bariyer olarak görev yapar. Kütiküla iç kısımda trake kanallarını, bazı salgı kanallarını ve sindirim sisteminin ön ve arka bağırsaklarını astarlar. Pek çok ergin böcekte olduğu gibi sert ve zırh şeklinde olabilir. Çoğu larvada olduğu gibi ince ve esnek şekilde de olabilir. Kütikülanın su kaybını azaltma işlevi karada yaşayan hayvanlar için hayati bir önem taşır.

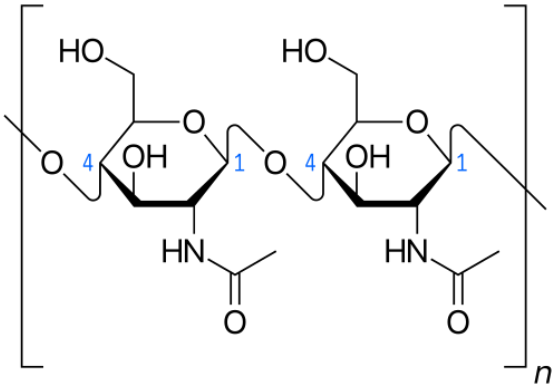
Kaslar, vücudun içlerine kadar uzanmış olan kütikulanın plakalar şeklindeki oluşumlarına bağlanmıştır. Kütikulanın % 30-50'si kitin adı verilen selüloza benzer bir polisakkaritten oluşmuştur. Kitin lifleri, protein yapısında bir matriks içerisine gömülerek, hem sağlam hem de esnek bir karışım oluşturur. Korumanın önemli olduğu yerlerde kütiküla, iskelet proteinleriyle çapraz bağlar yapan organik

bileşiklerin de katılımıyla sertleştirilir. Eklembacaklıların dış iskeleti, periyodik olarak atılır (deri değiştirme) ve hayvanın büyümesine izin verecek şekilde daha genişiyle değiştirilir (Campbell 2008).

Kütiküla ince olmasına rağmen karmaşık bir yapıdadır. Kütiküla dokusunun altında bulunan epidermisten kütiküla salgılaması yapılır. İnce bir **epikütiküla** ve daha kalın bir **prokütiküla,** esas kütikülayı meydana getirir. Epidermis ve kütiküla böceğin canlı dokularını örten integüment yapısını oluştururlar. Epidermis dokusu ekdizise (deri değiştirme) sebep olan olayları gerçekleştiren tabakadır. Birçok böcekte epikütikülanın üst tabakası mum tabakası ile kaplıdır. Epikütikülanın bu kimyasal yapısı su kaybının önlenmesinde oldukça önemlidir. Bu yapı hidrofobik yağlar ve hidrokarbonlardan oluşmaktadır. Mevsimsel olarak ya da kurak şartlar altında bu mumsu yapı kalınlaşabilir. Yüzey mumları suyu tutmasının yanı sıra böceğin av olmasını engellemeye de yardımcı olur; taklit ya da kamuflaj için desenli yapı oluşturur. En önemli özelliği güneş ışığı ve ultraviyole ışınların yansıtılmasında görev almasıdır (Gullan ve Cranston 2012).

2.3 Kitin

Kitin mantarların hücre duvarında ve eklembacaklıların dış iskeletinde destekleyici bir yapı olarak görev alır. Yüksek moleküler ağırlığa sahip olan kitin, dallanmamış bir polimerdir ve genellikle β–(1-4) glikozit bağlarıyla bağlanmış N-asetil-D-glukozamin birimlerinden oluşan bir amino-şeker polisakkaritidir.



Şekil 2.2 Kitin molekülünün kimyasal yapısı (Reynolds 1987)

Kitin molekülleri, demetler halinde gruplanarak esnek mikrofibriller halinde birleşmiş ve protein matriksinin içine sıkıca bağlanarak gömülmüştür. Bu yapı kitine büyük gerilme gücü sağlamaktadır. Kütikülanın sağlamlığı komşu kitin zincirleri arasındaki çok sayıda hidrojen bağından kaynaklanmaktadır. Sertleşme, diğer adıyla sklerotizasyon, proteinleri suda çözünmez hale getirir ve ekzokütikülayı sertleştirerek kütikülanın sağlamlaşmasında önemli bir rol oynar. Bazı böceklerdeki mandibul yapılarının kesici uçlarındaki aşırı sertlik, kütikülada çinko ve manganez bulunmasıyla alakalı bir durumdur.

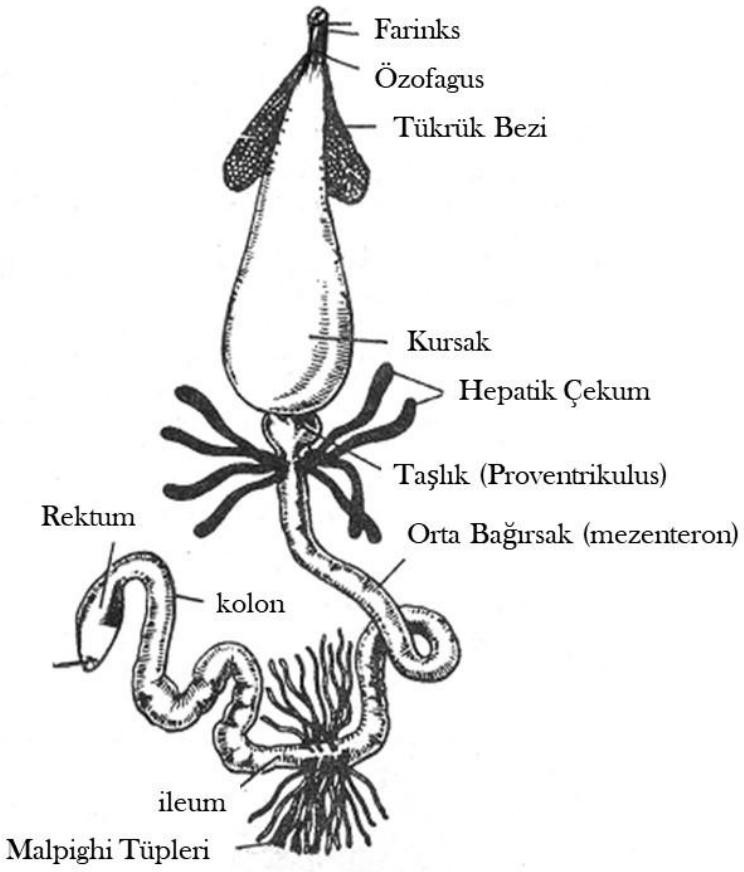
Yumuşak vücutlu larvalarda ve segmentler arası zarlarda kütiküla sert ama aynı zamanda esnek ve uzayabilen yapıda olmalıdır. Bu yumuşak kütiküla hamile dişilerde oldukça belirgindir (Özparlak 2003).

2.4 Hamamböceğinde Orta Bağırsak (Mide) Yapısı

Böceklerde sindirim kanalı ağızla başlar, sırasıyla farinks, özofagus, önbağırsak, orta bağırsak, ileum, kolon ile devam edip, rektumla son bulur (Yıkılmaz ve Deveci 2004) (Şekil 2.3)

Böceklerdeki orta bağırsak mide görevini yerine getirmektedir. Orta bağırsakta fizyolojik olarak, çeşitli metabolik olayları düzenlenir ve besinlerin sindirimi yapılır.

Orta bağırsak besinlerle birlikte mikroorganizmaların ve toksik maddelerin istilasına uğradığı bölgedir.



Şekil 2.3 Hamamböceğinde sindirim kanalı (https://scienceeasylearning.wordpress.com 2014)

Böceklerin orta bağırsak duvarı beş bölgeden oluşmaktadır. Bunlar lümenden dışarıya doğru peritrofik membran, tek tabakalı silsiz silindirik epitel, bazal membran, bağ dokusu ile halkasal ve boyuna çizgili kas tabakasıdır (Levy vd. 2004a, b). Peritrofik membran hücresiz yapıdan oluşur. Bu tabakada kitin fibrilleri mukopolisakkaritler, proteoglikanlar ve proteinlerin içinde bir yumak halinde gömülü olarak bulunur (Bolognesi vd. 2008). Peritrofik membran epitel tabakasını toksinlerin, patojenlerin ve zarar verici besinlerin mekanik hasarlarından korur (Merzendorfer ve Zimoch 2003). Böceklerin orta bağırsak epitelinde silsiz silindirik epitel hücreleri, kök hücreler, goblet hücreleri ve endokrin hücreler (Diffuz nöro-endokrin sistem hücreleri) bulunur (Rost-Roszkowska ve Undrul 2008). Orta bağırsağın kas tabakasındaki halkasal kaslar birkaç

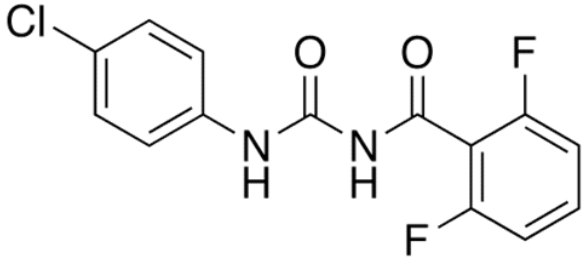
sıra halindedir. Bu çizgili kas tabakasındaki hücrelerde anizotrop ve izotrop bölgeler belirgin bir şekilde görülmektedir. Kas tabakası dıştan periton tabakası ile örtülmüştür.

2.5 Diflubenzuron

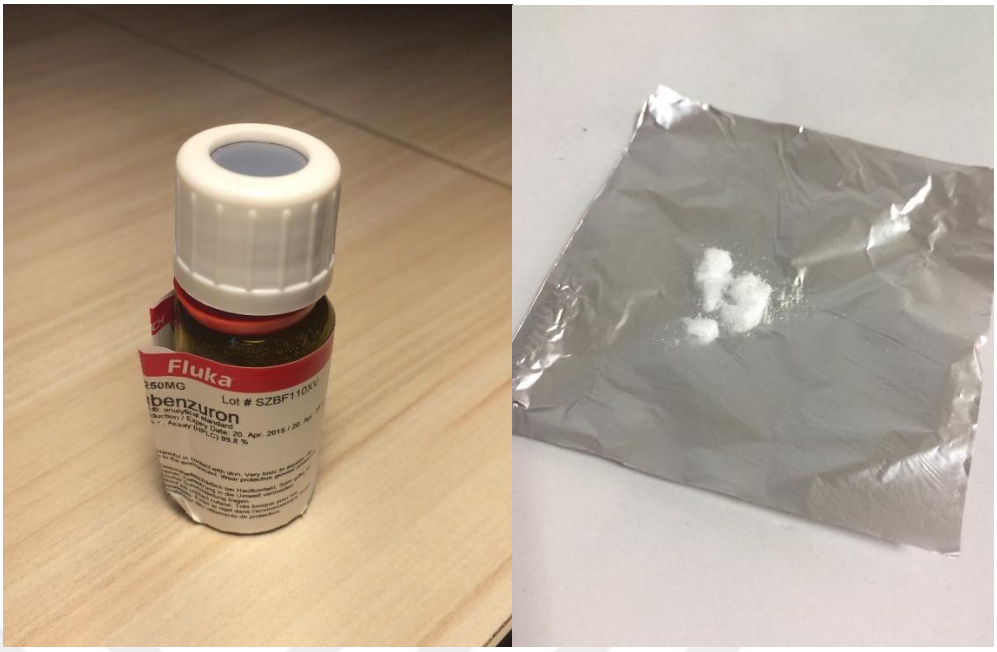
Diflubenzuron tarımda, seracılık ve ormancılık gibi alanlarda ve toplum sağlığına zararlı sivrisinek larvaları ve böcekler üzerinde kullanılan bir kimyasaldır. Böceklerde kısırlaşmaya ve ölüme sebep olan Diflubenzuron aynı zamanda endokütiküladaki kitin sentezini engellediği için böceklerin deri değiştirmesini de engellemektedir.

Diflubenzuron böcekler üzerinde ani bir etki oluşturmayıp fizyolojik yolla etki ederek böceğin değişim gösterdiği yumurtadan çıkma, deri değiştirme gibi dönemlerde esas etkisini ortaya koymaktadır. Diflubenzuron'un, larvaların endokütikülasında büyümeyi engellediği, biyokimyasal çalışmalarla da bunun kitin sentezinin engellenmesi yoluyla oluştuğu belirlenmiştir (Grosscurt 1977). Diflubenzuron'un etkisiyle, böceklerde endokütiküla tabakasındaki deri değişiminde kitin sentezi engellendiği için böceklerin yeterli desteği sağlayamayıp ya da oluşan iç baskıya dayanamayıp öldükleri bildirilmiştir (Göktay ve Kısmalı 1990).

Diflubenzuron [1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea] ile yapılan çalışmalar karasal, sucul zararlılara ve vektör (taşıyıcı) böceklere karşı mücadelede başarılı sonuçlar vermiştir (http://www.who.int/ 2017). WHO raporuna bakıldığında hamamböcekleri için uygulanabilir herhangi bir doz önerilmemiştir. Bu sebeple çalışmamızda Diflubenzuron'un çeşitli dozları denendi ve uygulamadan sonraki farklı süreler sonunda hamamböceğine ne gibi etkiler yaptığı tespit edildi.



Şekil 2.4 Diflubenzuron'un kimyasal yapısı



Şekil 2.5 Deneylerde kullandığımız Diflubenzuron‘un ticari şişesi

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Böcek Kültürü

Periplaneta americana türünün nimfleri uzun yıllardır Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Böcek Kültürü Laboratuvarında barındırılmaktadır. Deney öncesi laboratuvar koşullarına uyum sağlamaları amacıyla böcekler plastik kaplarda gruplara ayrılmıştır. Bu deney için deney hayvanlarının 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyotta, 25±2°C'lik oda sıcaklığında, % 72±3'lük nisbi nemde Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Böcek Kültürü Laboratuvarında kültürü yapıldı. Deneylerde kullanılan böcekler sıçan yemiyle (pellet halinde) beslendi (Fathpour vd. 2007). Deneylerde *Periplaneta americana* türünün 5. evre nimfleri kullanıldı.

3.2 Böceklere Diflubenzuron Uygulanması

Periplaneta americana' nın nimfleri iki deney grubu halinde deneylerde kullanıldı. Takımlardan birisi orta bağırsağın incelenmesi için diğeri ise kütiküladaki kitin miktarının ölçülmesinde kullanıldı. Her takımda bir kontrol grubu ve beş farklı deney grubu yer aldı. Deney hayvanı gruplarında n=6 birey kullanıldı. Diflubenzuron'un 10, 30, 50, 100 ve 300 ppm'lik konsantrasyonları dimetilsülfoksit (DMSO) ile hazırlandı (Mitsui vd. 1981) ve 0,1'er ml olarak enjeksiyonla böcek yemlerine enjekte edildi. Kontrol grubu bireylerin yemlerine katkısız DMSO enjekte edildi (Fathpur vd. 2007). Diflubenzuron uygulanmasından 24 saat, 48 saat, 72 saat, 1 hafta ve 1 ay sonra sağ kalan bireylerden disekte işlemi yapıldı.



Şekil 3.1 Deneylerde kullanılan hayvan örnekleri

Diflubenzuron'un uygulandığı deney takımları aşağıdaki gibidir:

TAKIM 1: ORTA BAĞIRSAK (MİDE) YAPISININ GÖZLEMİ

Grup 1: Kontrol (n=6)

Grup 2: Diflubenzuron 10 ppm (n=6)

Grup 3: Diflubenzuron 30 ppm (n=6)

Grup 4: Diflubenzuron 50 ppm (n=6)

Grup 5: Diflubenzuron 100 ppm (n=6)

Grup 6: Diflubenzuron 300 ppm (n=6)

TAKIM 2: KİTİN MİKTARININ TESPİTİ

Grup 1: Kontrol (n=6)

Grup 2: Diflubenzuron 10 ppm (n=6)

Grup 3: Diflubenzuron 30 ppm (n=6)

Grup 4: Diflubenzuron 50 ppm (n=6)

Grup 5: Diflubenzuron 100 ppm (n=6)

Grup 6: Diflubenzuron 300 ppm (n=6)

3.3 Floresan Mikroskobu Preparasyonu

Kontrol grubu ve Diflubenzuron uygulanan (24 saat, 48 saat, 72 saat, 1 hafta ve 30 gün) böceklerden alınan orta bağırsak dokusu örnekleri aşağıdaki işlemlerden geçirilerek, floresan mikroskobunda incelenmeye hazırlandı:

i. Çıkarılan doku örneklerinin % 10'luk Formaldehitte ilk tespiti yapıldı.

ii. Tespit işleminden sonra örnekler aynı tampon ile yıkandı (1 saatte 3 kez solüsyon değişimi yapılarak yıkandı).

iii. Fiksasyon işlemlerinden sonra, örnekler çeşitli derecelerdeki alkol serilerinde (% 80'lik, % 90'lık % 96'lık ve % 100'lük) bekletilerek dehidre edildi.

iv. Örnekler ksilolden geçirilerek parafin bloklarına gömüldü.

v. Parafin bloklarındaki örneklerden LEICA marka mikrotom ile 5µ kalınlığında kesitler alındı.

vi. DAPI floresan boyasıyla protokole uygun olarak boyandı.

3.4 Spektrofotometrik İşlemler

Bireylerden alınan abdominal kütiküla örnekleri homojenizatör ile parçalandı ve 3000 devirde (rpmde) santrifüj edildi. Daha sonra dokular sodyum lauril sülfat ile 100°C ‘de 15 dk kaynatılıp, santrifüj edilerek ve pellet distile suyla yıkandı. Üzerine KOH eklendi ve 130 °C ‘de 60 dk. bekletildi. Soğutma işlemi için buzluktan alınan etanol üzerinde 15 dk tutuldu. Karışımın üzerine Celite545 eklendi, santrifüj edildikten sonra pellet üzerine $NaNO_2$ ve $KHSO_4$ eklenerek 15 dk çalkalandı. Santrifüj sonrası üst faz amonyum sülfat ve 3-metil-2-tiazolon hidrazon HCl monohidrat ile 100°C ‘de 3 dk kaynatıldı. Son aşamada $FeCl_3$-$6H_2O$ (%0,83 [wt/vol]) eklendi ve renklenen karışımın spektrofotometre cihazında 650 nm’deki optik dansitesinin okunması sağlandı. Glukozamin (10 µg/ml) pozitif standart olarak kullanıldı (Kuştimur vd. 2008).

4. BULGULAR

Yapılan bu tez çalışmasında *Periplaneta americana* 'nın 5. evre nimflerinin orta bağırsağına Diflubenzuron'un etkisi floresan ve ışık mikroskobunda gözlendi. Bunun yanı sıra böceklerde kitin sentezini engelleyici ajan olan DFB' nin bütün uygulama dozlarının (10, 30, 50, 100 ve 300 ppm) 5.evre *P.americana* nimflerinin kütikülasındaki kitin miktarına etkisi spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

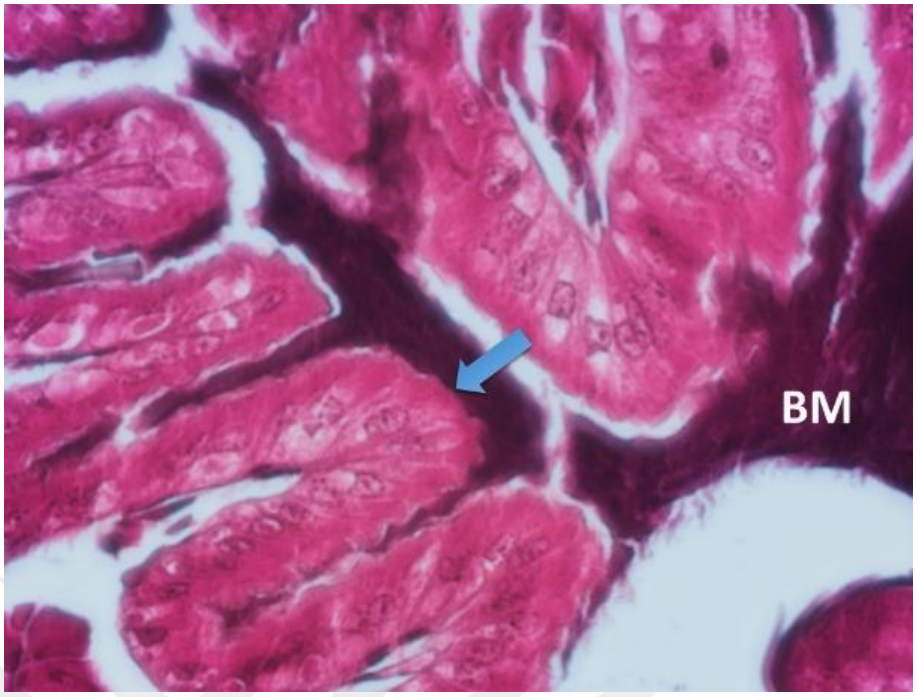
4.1 Diflubenzuron'un *Periplaneta americana*'nın Orta Bağırsak (mide) Epitel Hücrelerinin Yapısına Etkisi

Gözlemler sırasında kontrol grubuna ait orta bağırsak örneklerinde hem floresan mikroskobunda hem de ışık mikroskobunda oval şekilli çekirdeğe sahip, düzgün yerleşmiş silindirik epitel hücreleri gözlendi (Şekil 4.1).

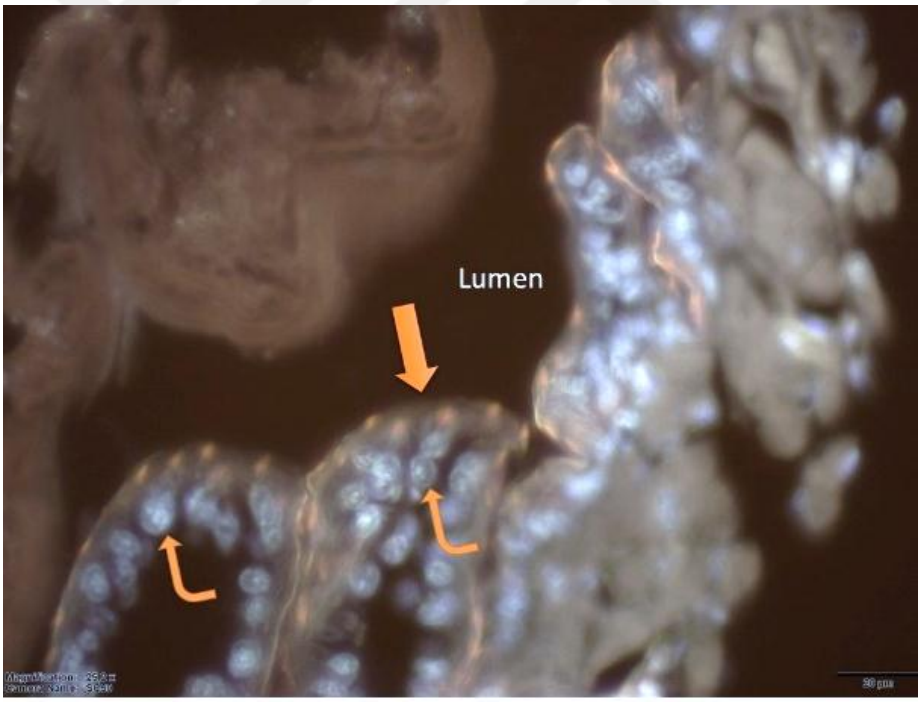
Deney gruplarındaki 24 saat 10 ppm DFB uygulanmış hamam böceklerinin orta bağırsağında kontrol grubuyla benzerlik gösteren bir histolojik yapı gözlendi (Şekil 4.2).

Deneylerde 24 saat 30 ppm DFB uygulanmış hamam böceklerinin orta bağırsağında herhangi bir histolojik değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.3).

Diğer 10 ve 30 ppm'lik DFB dozlarında olduğu gibi 50 ppm'lik grupta da histolojik yapıda önemli bir değişikliğe rastlanmadı (Şekil 4.4).



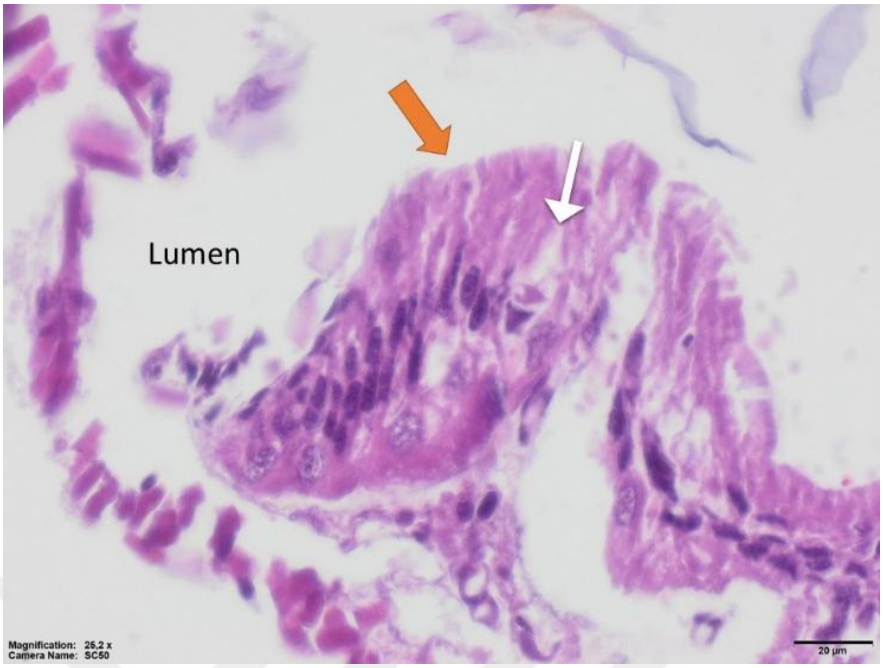
(a)



(b)

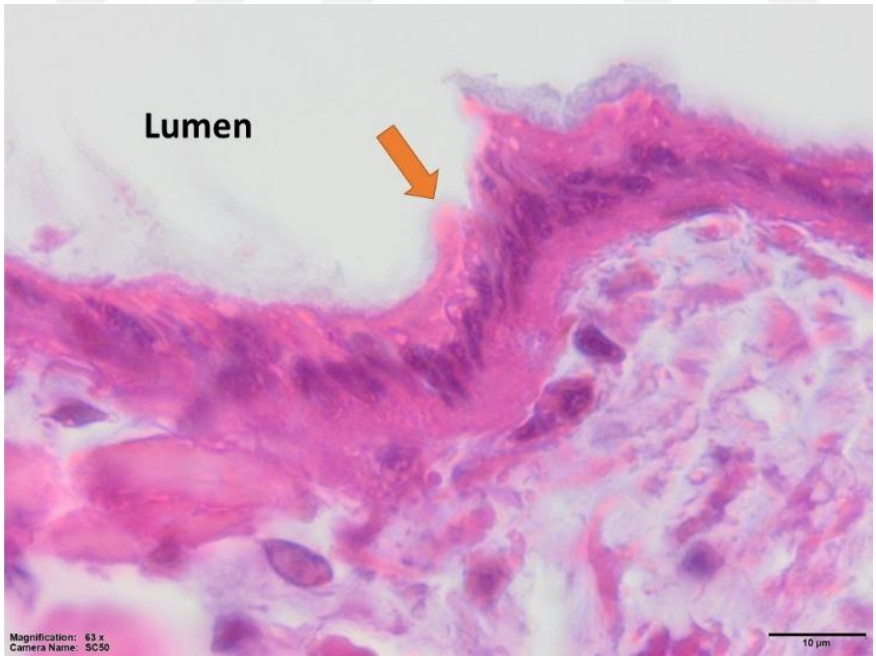
Şekil 4.1 Işık mikroskobunda kontrol grubu böceğin bağırsak villus yapısı

a. floresan mikroskobunda orta bağırsak görüntüsü, b. Bağırsaktaki villus (ok), besin maddesi (BM), lümen, silindirik epitel hücre çekirdeği (kıvrık ok). x400



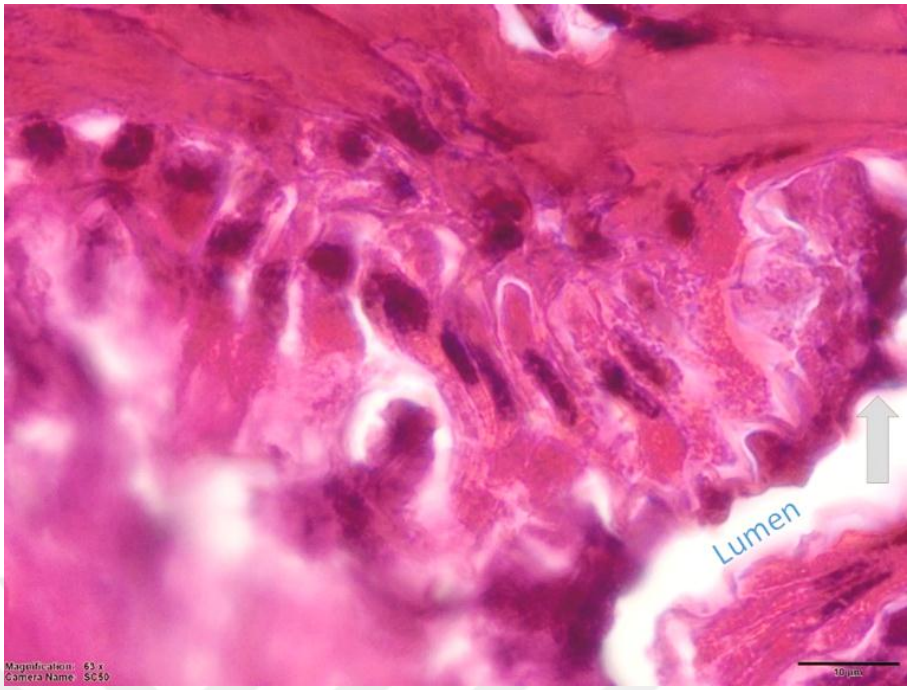
Şekil 4.2 Işık mikroskobunda 24 saat 10 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Bağırsaktaki villus (kalın ok), Goblet hücresi (beyaz ok), lümen. x400



Şekil 4.3 Işık mikroskobunda 24 saat 30 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Bağırsaktaki villus (ok), lümen. x1000



Şekil 4.4 Işık mikroskobunda 24 saat 50 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Besin maddesi (ok), lümen. x1000

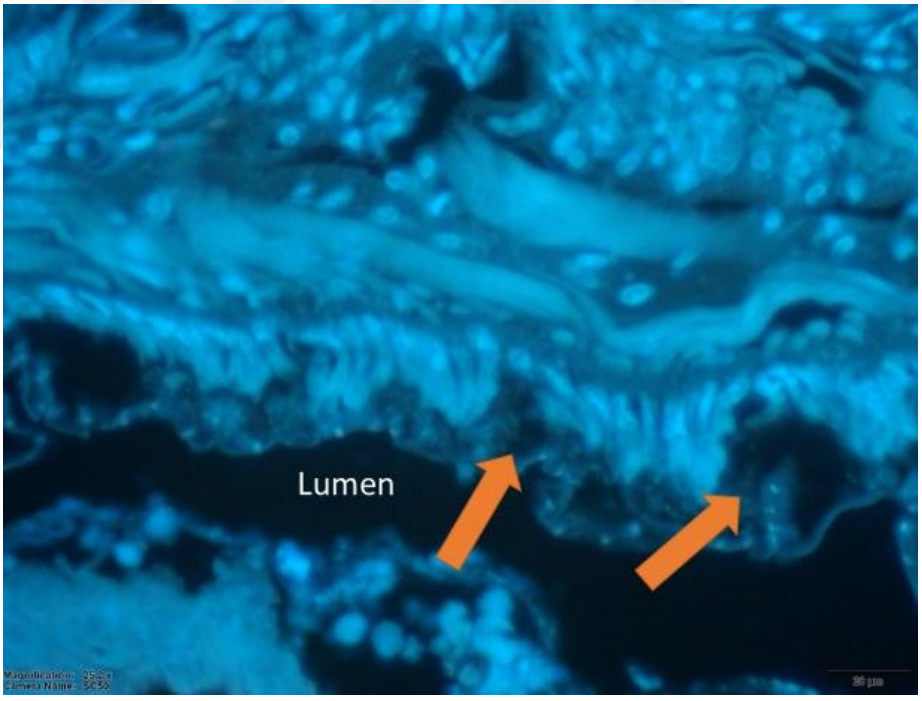
Yapılan 24 saatlik 100 ppm DFB uygulanmış hamam böceği deneylerinde bağırsak villuslarındaki hücrelerde çekirdek etrafında sitoplazmik hiyalinleşmenin olduğu hem ışık hem de floresan mikroskobunda gözlendi (Şekil 4.5).

Hamam böceklerine 300 ppm DFB uygulandıktan 24 saat sonra bağırsak örneklerinde kontrol grubuna göre villuslardaki hücrelerde çekirdek etrafında sitoplazmik materyal kaybı olduğu hem ışık hem de floresan mikroskobunda gözlendi (Şekil 4.6).

Diflubenzuron'un 10 ppm'lik dozu uygulandıktan 48 saat sonra hamam böceklerinin bağırsağında kontrol grubunun benzeri histolojik yapı hem ışık hem de floresan mikroskobunda gözlendi (Şekil 4.7).



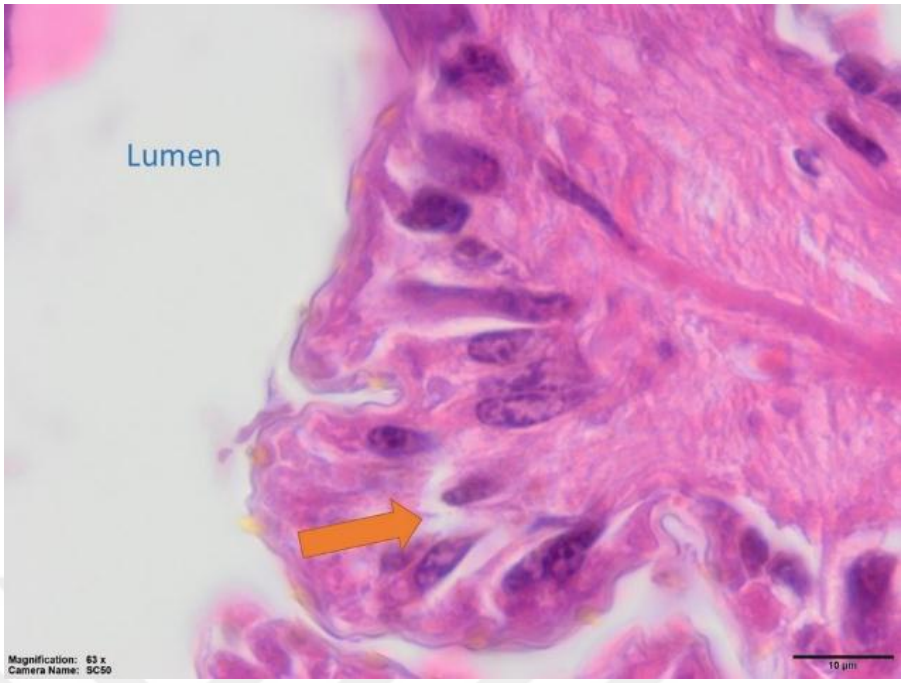
(a)



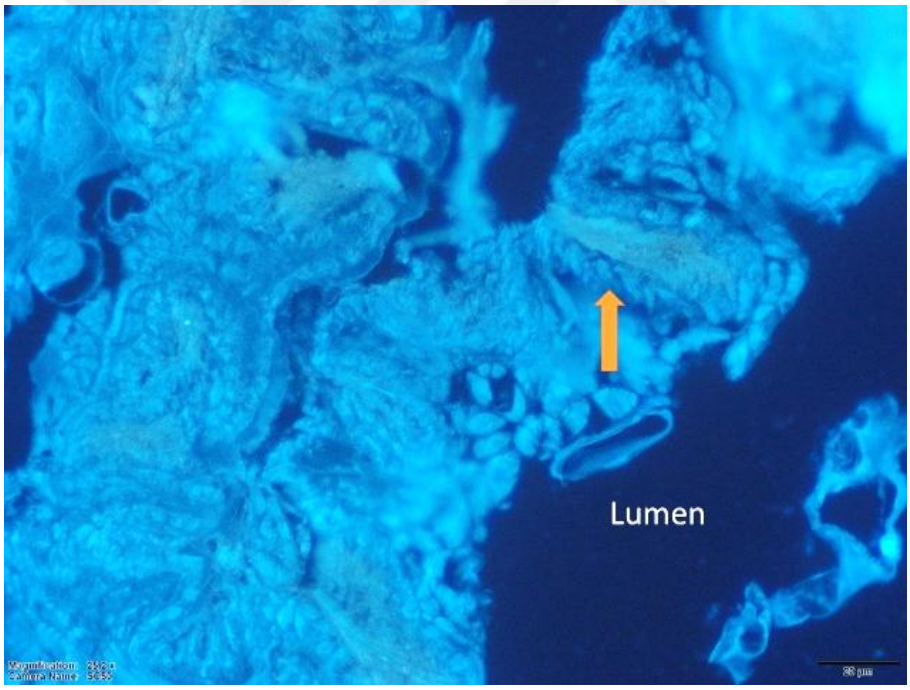
(b)

Şekil 4.5 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda. b. 24 saat 100 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Hiyalinleşmiş epitel hücresi (ok), lümen. x1000(a), x400(b)



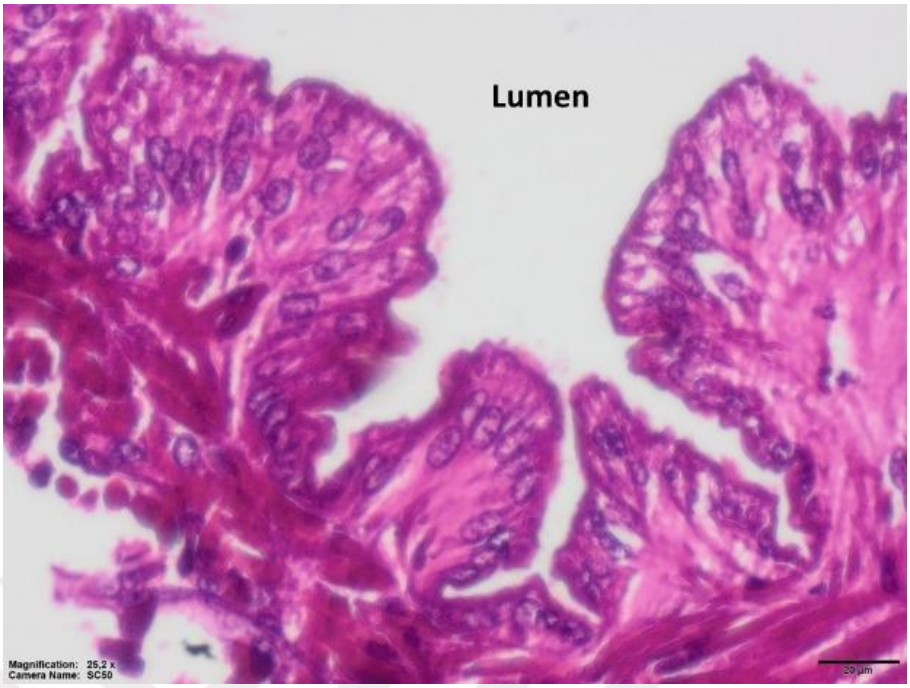
(a)



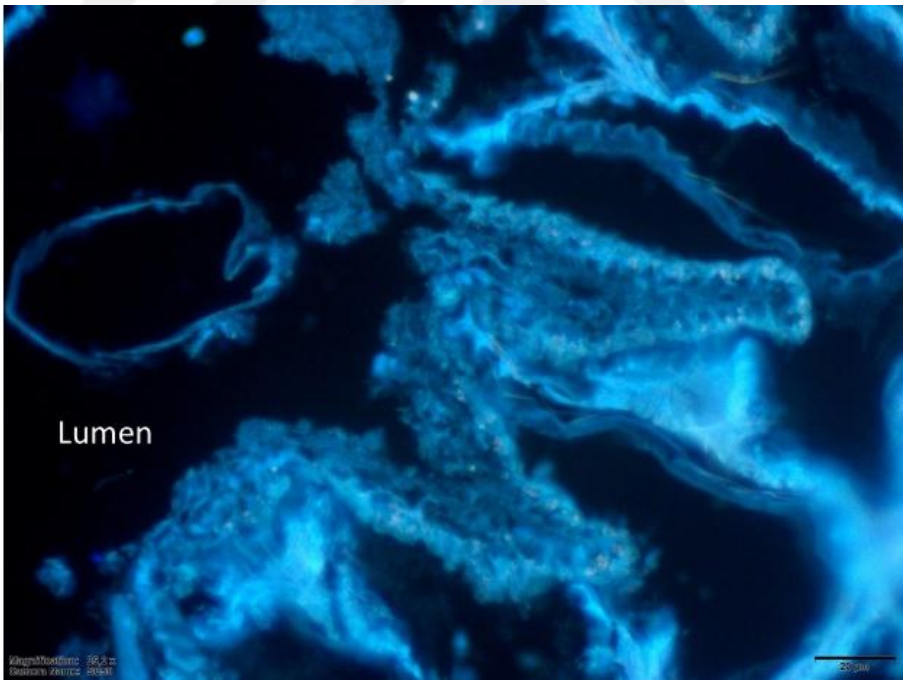
(b)

Şekil 4.6 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b. 24 saat 300 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Hiyalinleşmiş epitel hücresi (ok), lümen. x1000(a), x400(b)



(a)

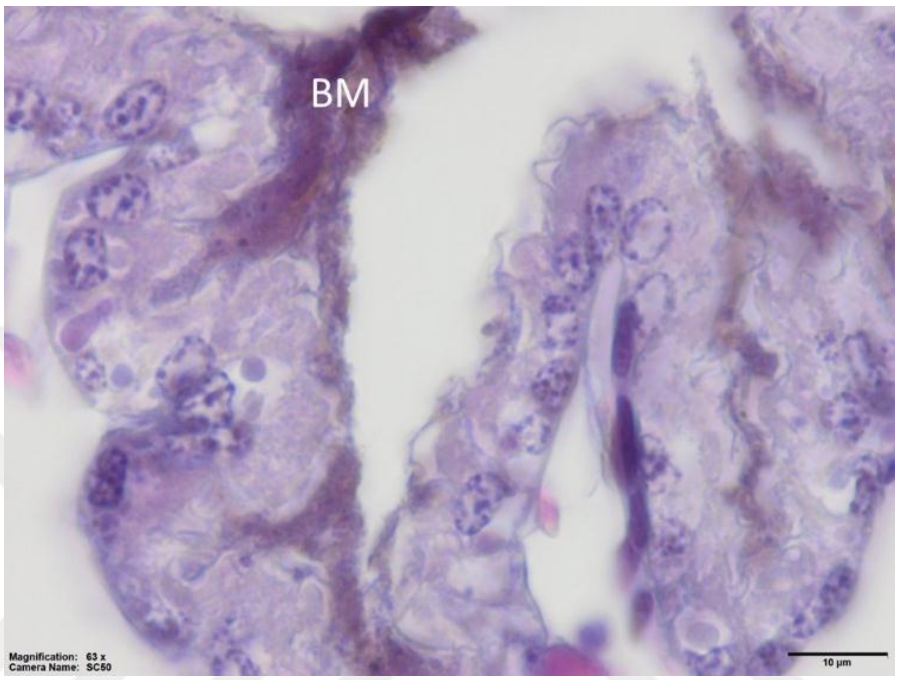


(b)

Şekil 4.7 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b. 48 saat 10 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen. x400

Otuz ppm Diflubenzuron uygulanmış deney hayvanlarında 48 saat sonra alınan bağırsak örneklerinde kontrol grubuyla benzer histolojik yapı ışık mikroskobunda gözlendi (Şekil 4.8).

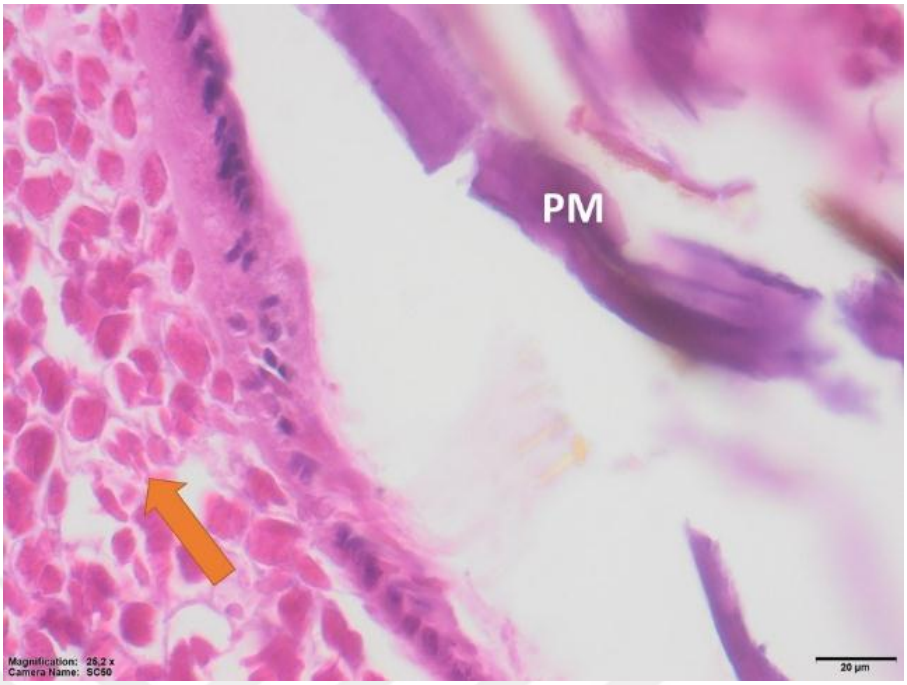


Şekil 4.8 Işık mikroskobunda 48 saat 30 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

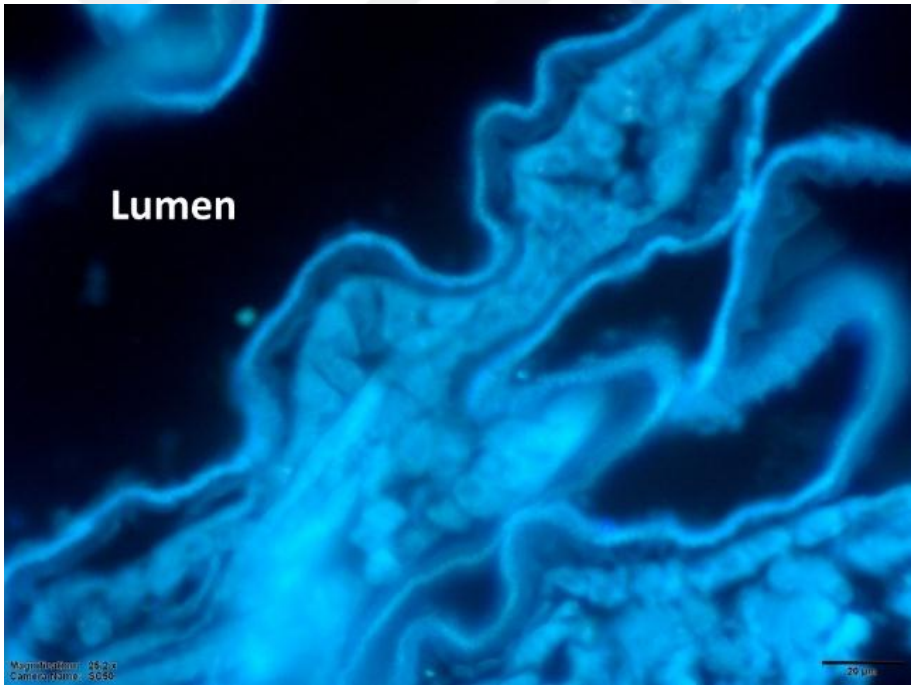
Lümen, besin maddesi (BM). x1000

Deney hayvanları olarak kullanılan hamamböceklerine Diflubenzuron'un 50 ppm'lik dozu uygulandıktan 48 saat sonra bağırsakta kontrol grubuna göre düzensiz yerleşmiş silindirik epitel hücrelerinin villuslarda yer aldığı hem ışık hem de floresan mikroskobunda gözlendi (Şekil 4.9).

P.americana bireylerine Diflubenzuron'un 100 ppm'lik dozu uygulandıktan 48 saat sonra alınan örneklerde düzensiz yerleşmiş silindirik epitel hücrelerinin sitoplazmalarında materyal kaybı hem ışık hem de floresan mikroskobunda tespit edildi (Şekil 4.10).



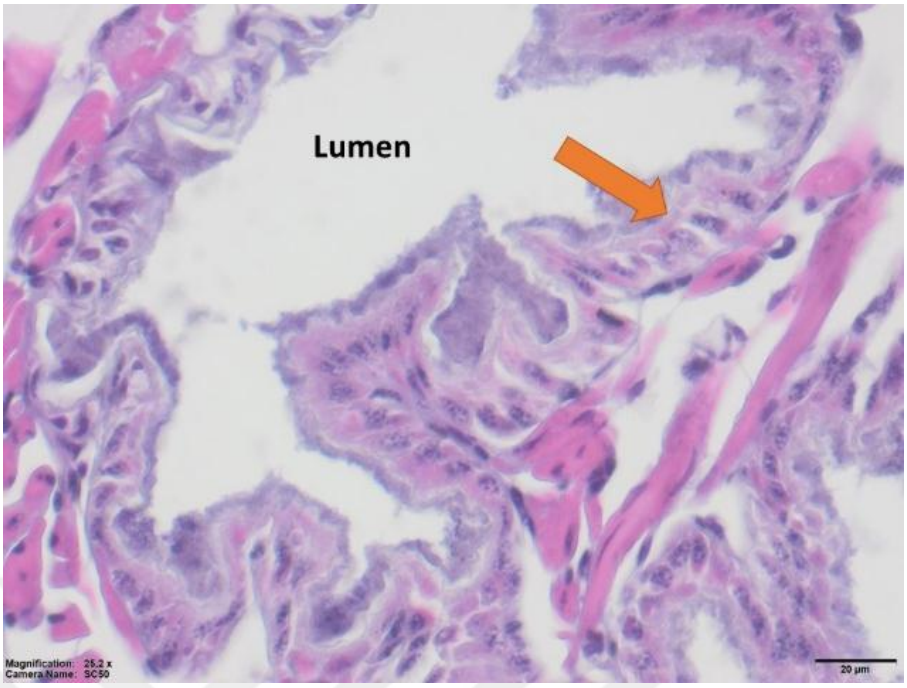
(a)



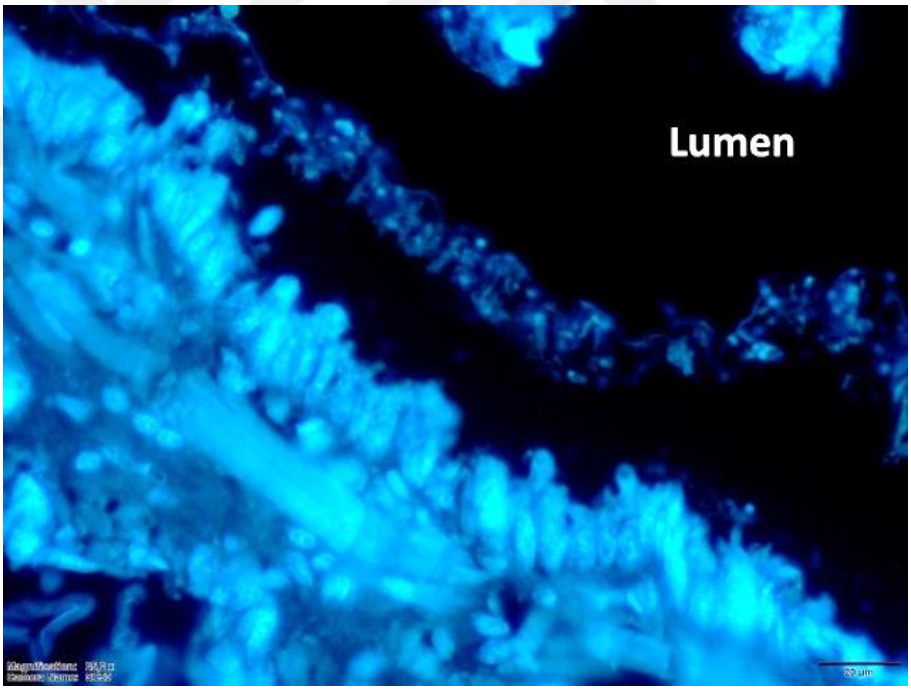
(b)

Şekil 4.9 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b. 48 saat 50 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen. x400



(a)



(b)

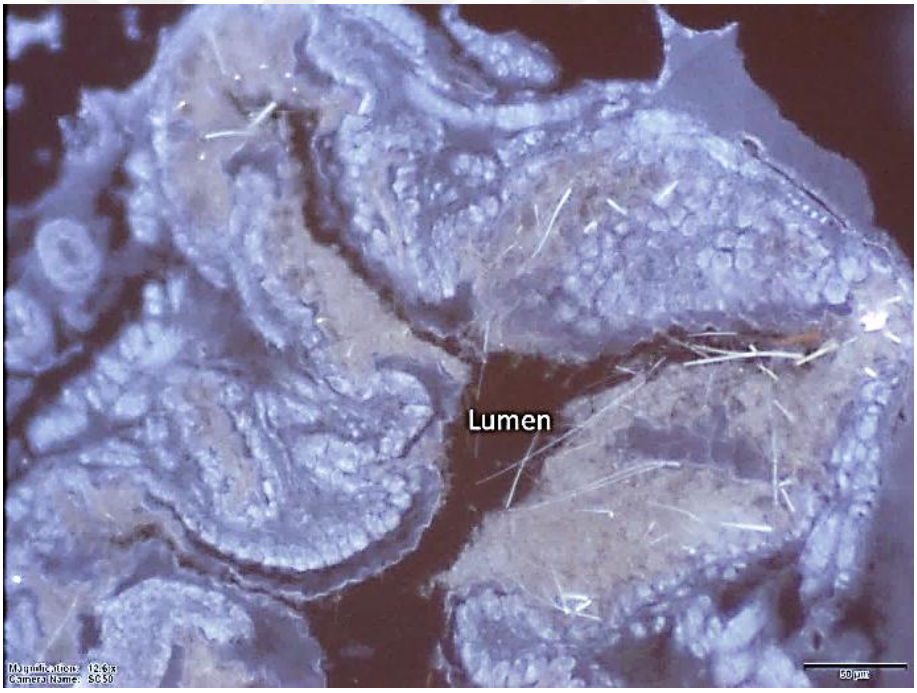
Şekil 4.10 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b. 48 saat 100 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen, hiyalinleşmiş epitel hücresi (ok). x400

Diflubenzuron'un 300 ppm'lik dozu *P.americana* bireylerine uygulandıktan 48 saat sonra bağırsak epitel hücrelerinin çoğunda sitoplazmik materyal kaybı, düzensiz hücre şekli ve çekirdek yapısı gözlendi. Bunun yanı sıra hücrelerin villusta düzensiz şekilde yerleştiği tespit edildi (Şekil 4.11).

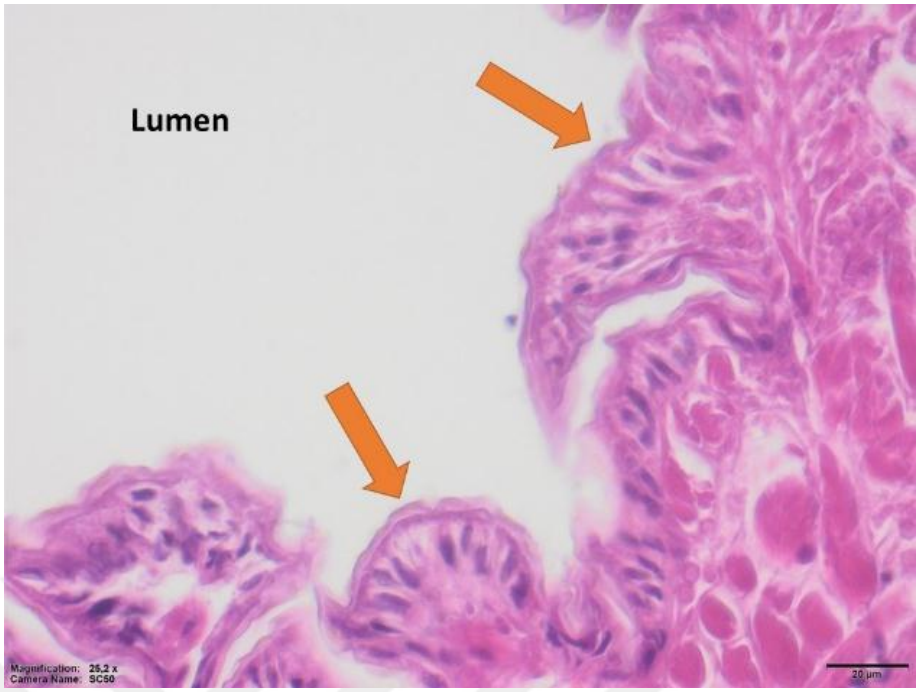
P.americana bireylerine Diflubenzuron'un 10 ppm'lik dozu uygulandıktan 72 saat sonra alınan bağırsak örneklerinde kontrol grubuna benzer hücre yerleşimi ve normal hücre yapısı floresan mikroskopta gözlendi (Şekil 4.12).

P.americana bireylerine Diflubenzuron'un 30 ppm'lik dozu uygulandıktan 72 saat sonra alınan bağırsak örneklerinde herhangi bir hücresel değişiklik ve düzensiz hücre yerleşiminin olmadığı hem ışık hem de floresan mikroskopta gözlendi (Şekil 4.13).

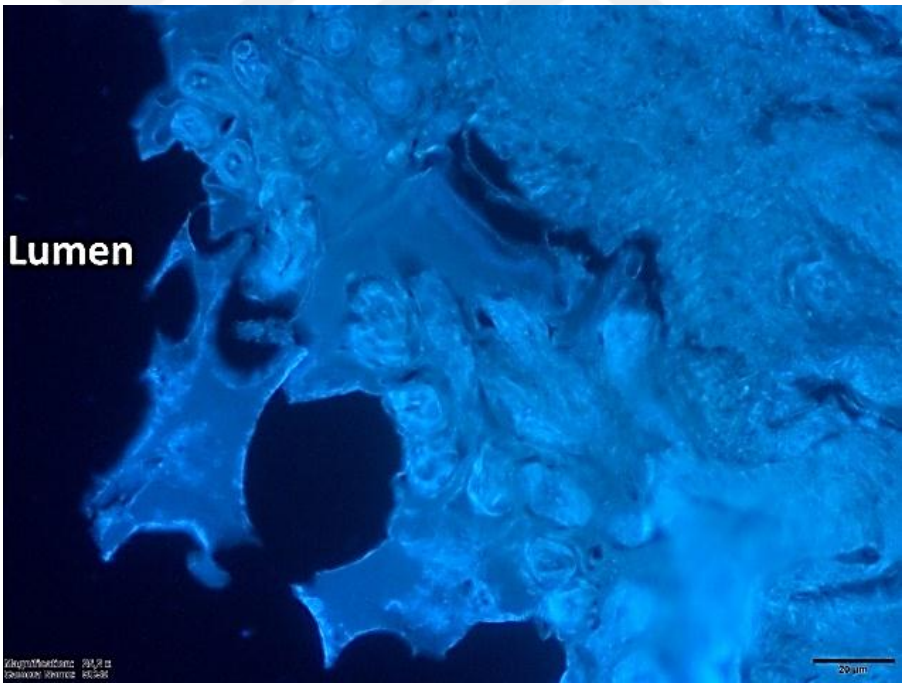


Şekil 4.11 Floresan mikroskobunda 72 saat 10 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen. x200



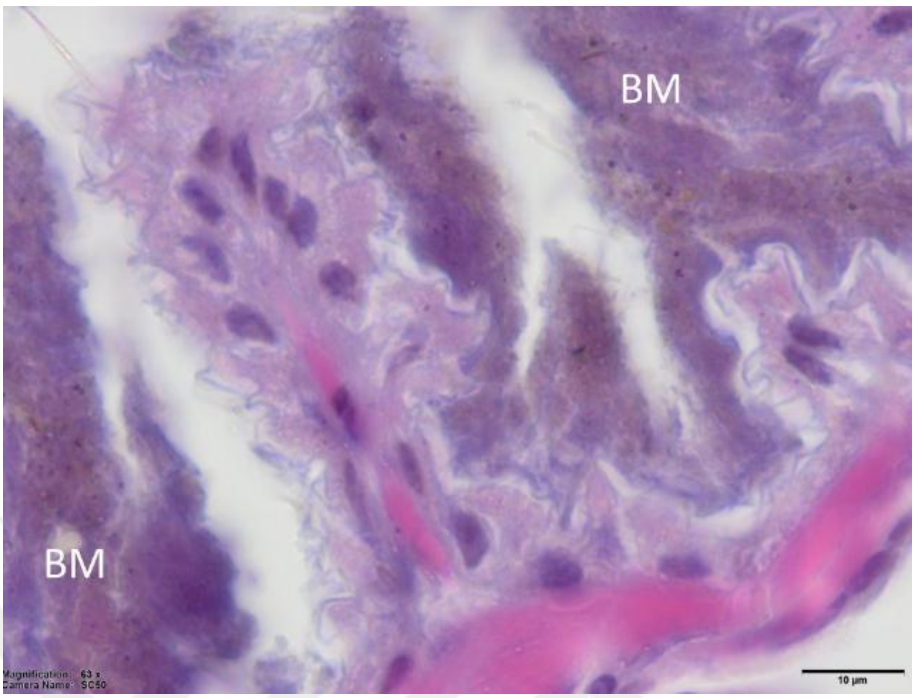
(a)



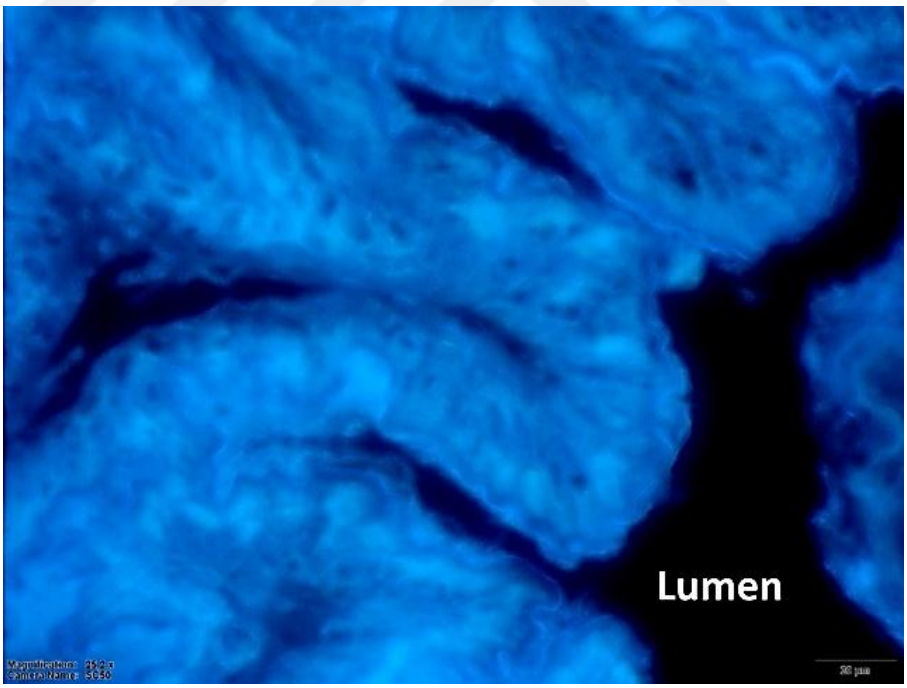
(b)

Şekil 4.12 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b. 48 saat 300 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen, hiyalinleşmiş epitel hücresi (ok). x400



(a)

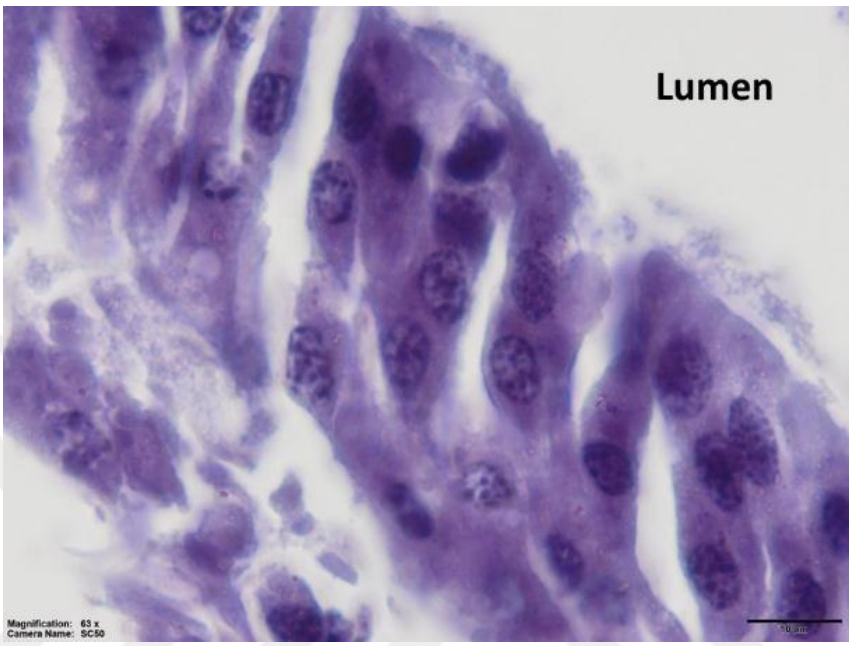


(b)

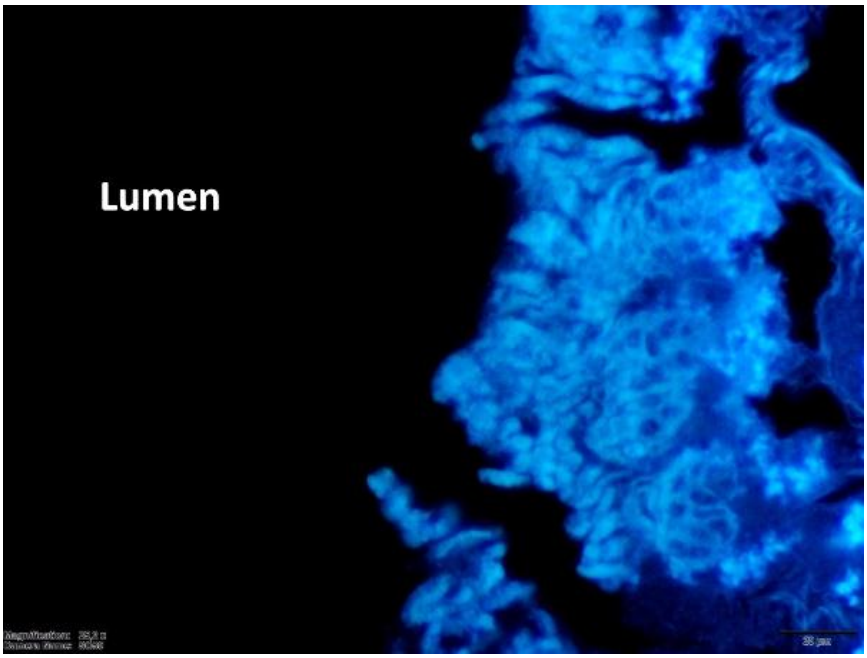
Şekil 4.13 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda b. 72 saat 30 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen, besin maddesi (BM). x1000(a),x400(b)

Diğer uygulama sürelerinde olduğu gibi DFB'nin 50 ppm'lik dozu 72 saat sonra bağırsak epiteli üzerinde önemli bir değişiklik veya hasar meydana getirmemiştir (Şekil 4.14).



(a)



(b)

Şekil 4.14 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b. 72 saat 50 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen. x1000(a), x400(b)

Hamam böceklerine Diflubenzuron'un 100 ppm'lik dozu uygulandıktan 72 saat sonra bağırsakta kontrol grubuna göre silindirik epitel hücrelerinin sitoplazmalarında hiyalinleşme olduğu hem ışık hem de floresan mikroskobunda gözlendi (Şekil 4.15).

Hamamböceklerine 300 ppm DFB uygulandıktan 72 saat sonra alınan bağırsak villuslarında kontrol grubuna göre silindirik epitel hücrelerinin çoğunda çekirdek etrafında sitoplazmik materyal kaybı olduğu hem ışık hem de floresan mikroskobunda gözlendi (Şekil 4.16).

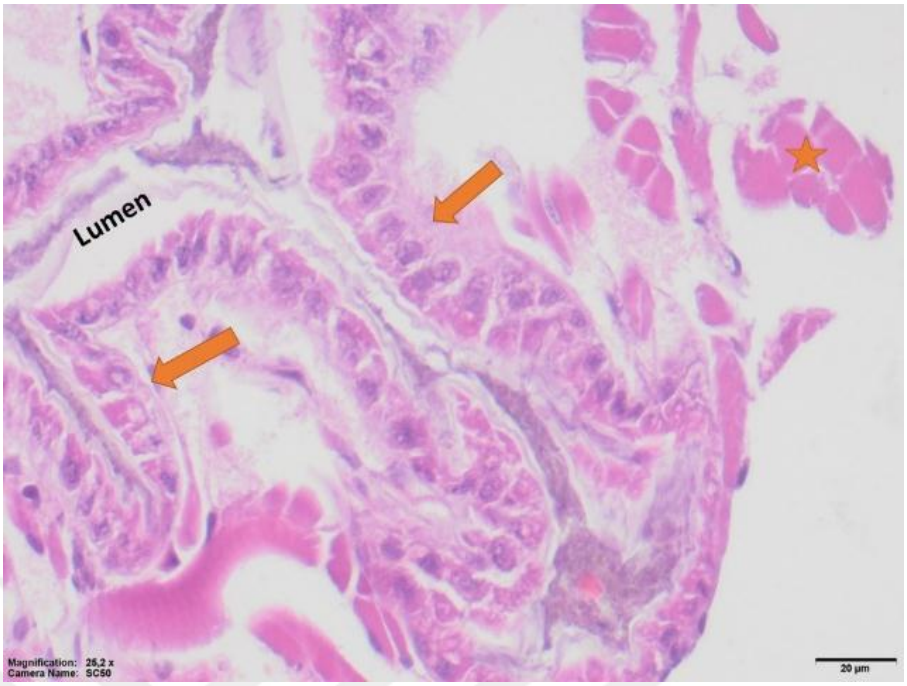
Uygulanan 10 ppm'lik DFB'nin etkisini görmek amacıyla hamamböceklerinden 1 hafta sonra alınan bağırsak örneklerinde kontrol grubuyla aynı yapıyı gösteren silindirik epitel hücrelerinin villuslarda düzenli olarak yerleştiği ışık ve floresan mikroskobunda gözlendi (Şekil 4.17).

Hamamböceklerine 30 ppm DFB uygulandıktan 1 hafta sonra alınan bağırsak örneklerinde kontrol grubuna benzer yapıda silindirik epitel hücrelerinin düzenli olarak villuslarda yer aldığı gözlendi (Şekil 4.18).

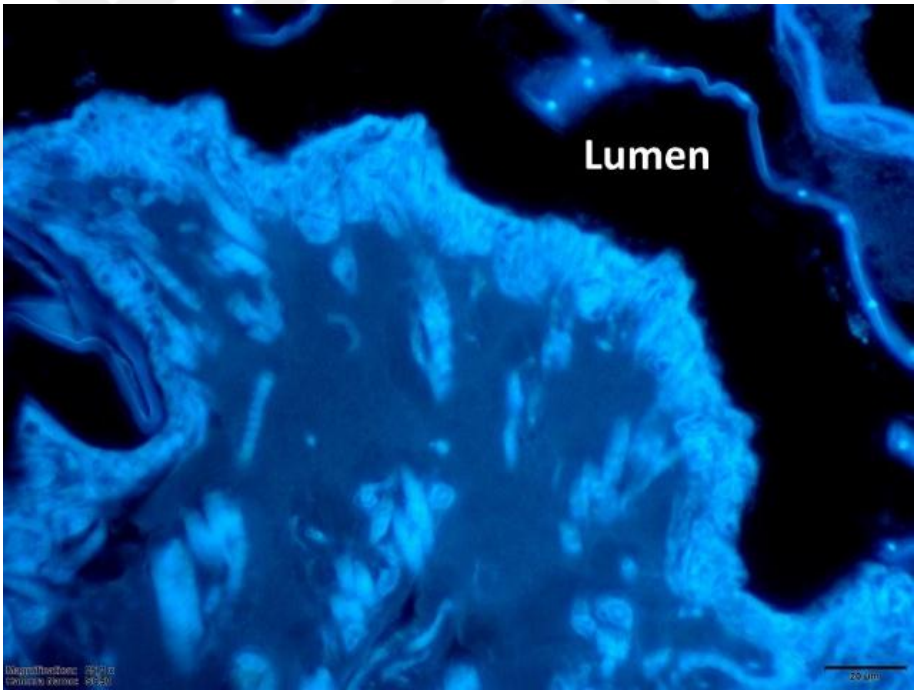
Elli (50) ppm'lik DFB dozu *P.americana* bireylerine uygulandıktan 1 hafta sonra alınan bağırsak örneklerinde hücresel bir hasara rastlanmadı. Silindirik epitel hücreleri arasında yerleşmiş goblet hücrelerinin olduğu gözlendi (Şekil 4.19).

Hamamböceklerine 100 ppm DFB uygulandıktan 1 hafta sonra alınan bağırsak dokularının bazı hücrelerinde yapısal bozuklukların olduğu hem ışık hem de floresan mikroskobunda gözlendi (Şekil 4.20).

Diflubenzuron'un 300 ppm'lik dozu hamam böceklerine uygulandıktan 1 hafta sonra alınan dokular mikroskopta incelendiğinde villuslardaki hücrelerin bazılarında çekirdek şeklinin değiştiği ve çekirdeklerin etrafında hücre hasarının bir göstergesi olan sitoplazmik materyalin kaybolduğu tespit edildi (Şekil 4.21).



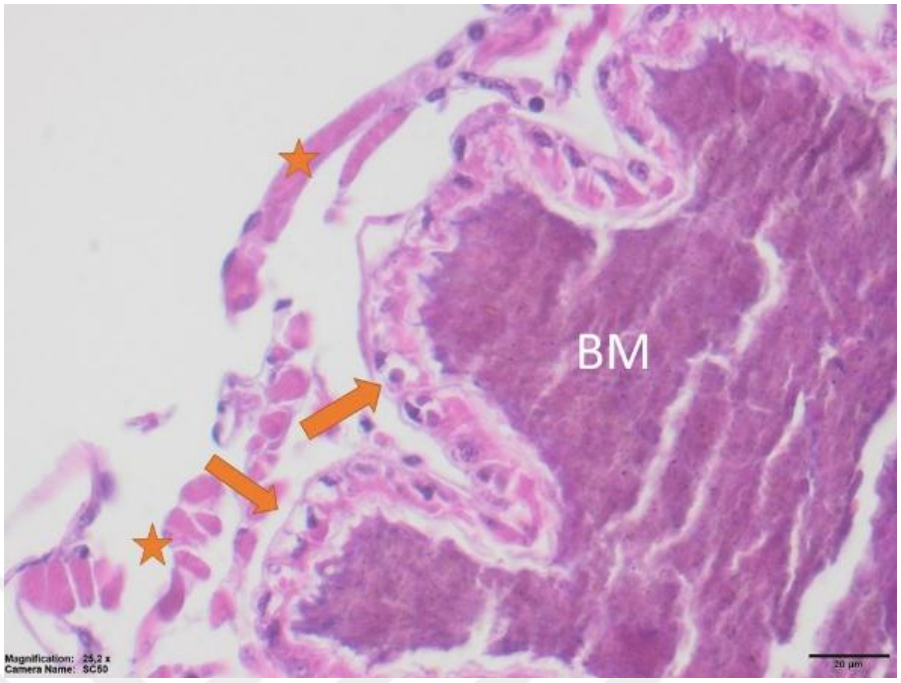
(a)



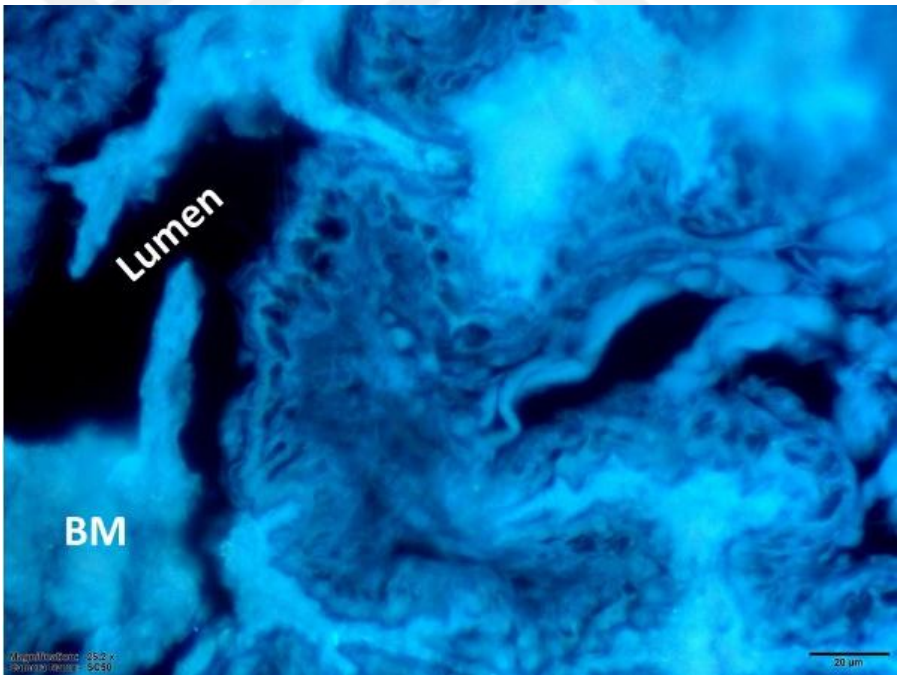
(b)

Şekil 4.15 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b.72 saat 100 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen, hiyalinleşmiş epitel hücreleri (ok), kas tabakası (yıldız). x400



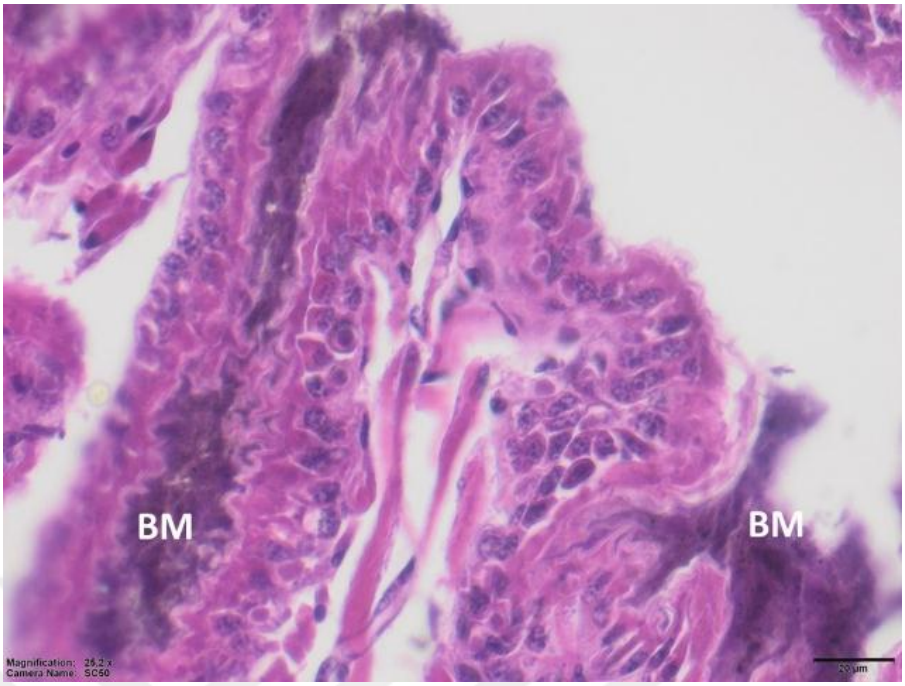
(a)



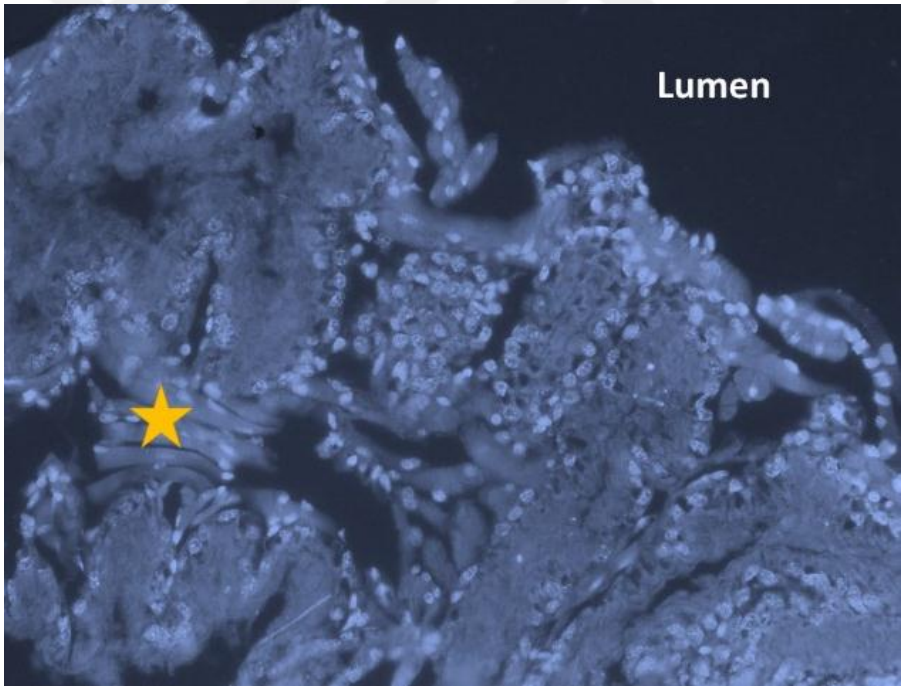
(b)

Şekil 4.16 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b. 72 saat 300 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen, hiyalinleşmiş epitel hücreleri (ok), kas tabakası (yıldız), besin maddesi (BM). x400



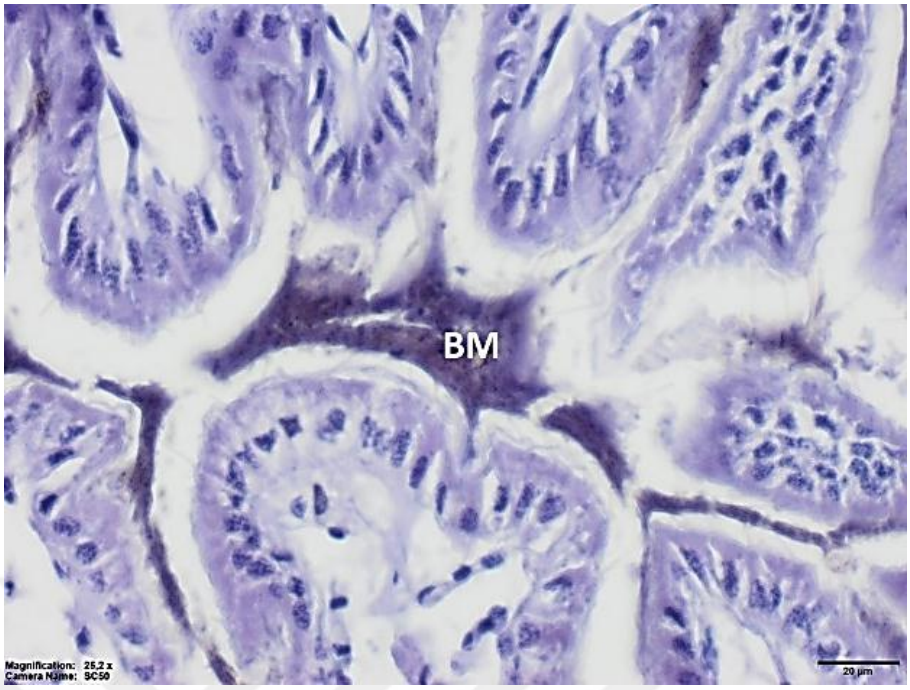
(a)



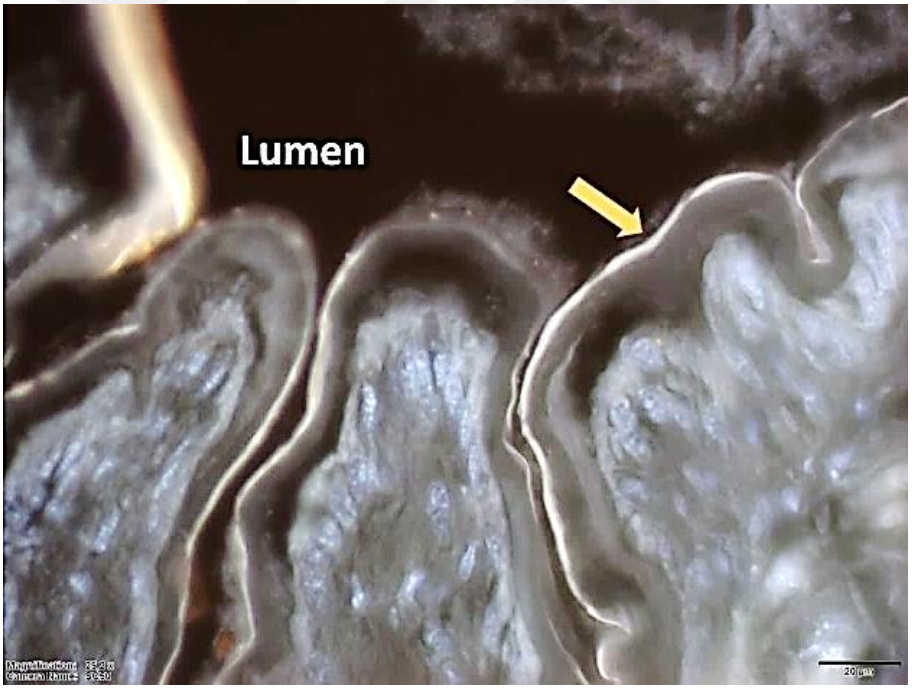
(b)

Şekil 4.17 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b. 1 hafta 10 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen, kas tabakası (yıldız), besin maddesi (BM). x400



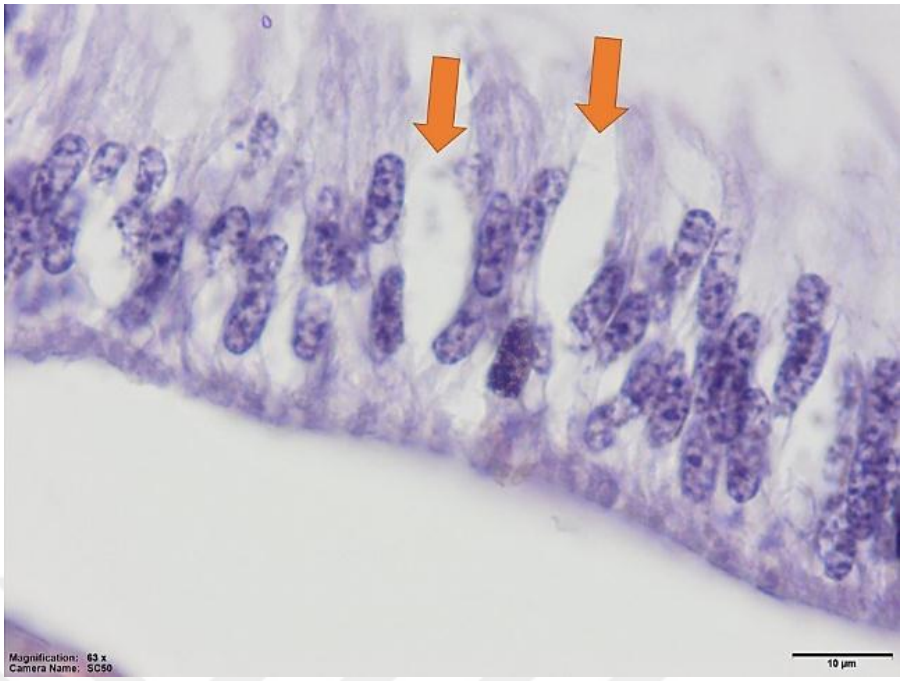
(a)



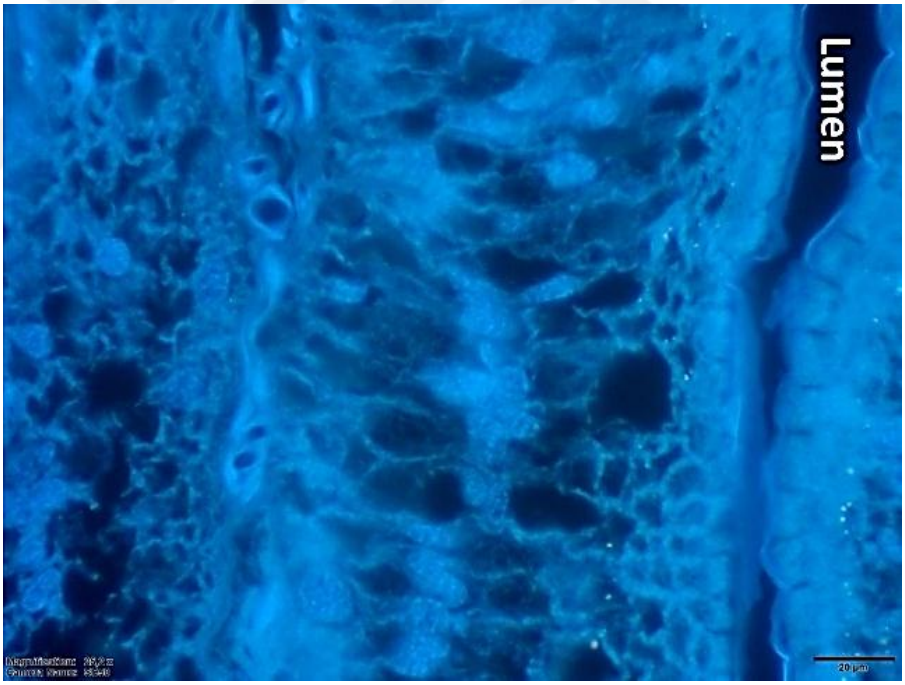
(b)

Şekil 4.18 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda b. 1 hafta 30 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen, peritrofik membran (ok), besin maddesi (BM). x400



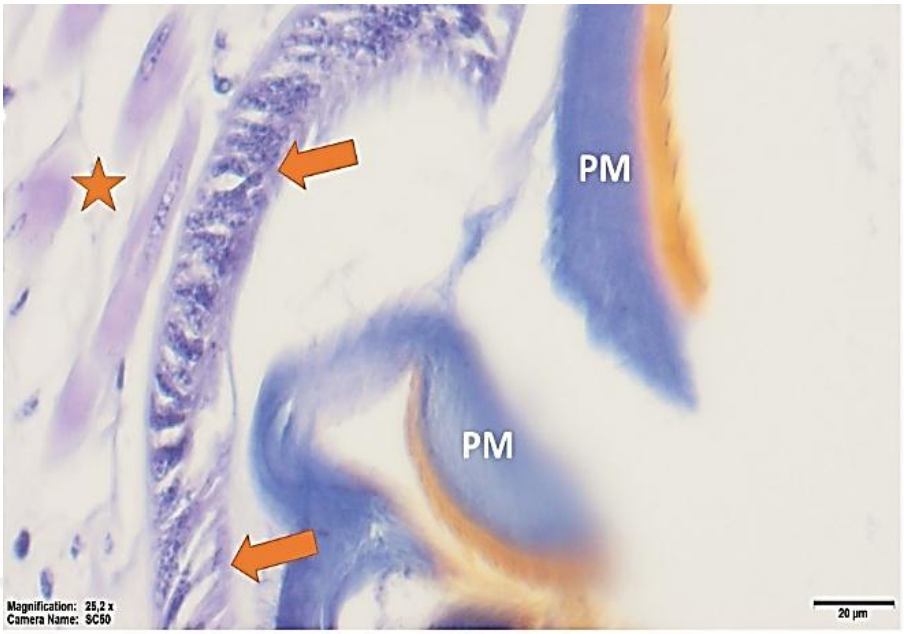
(a)



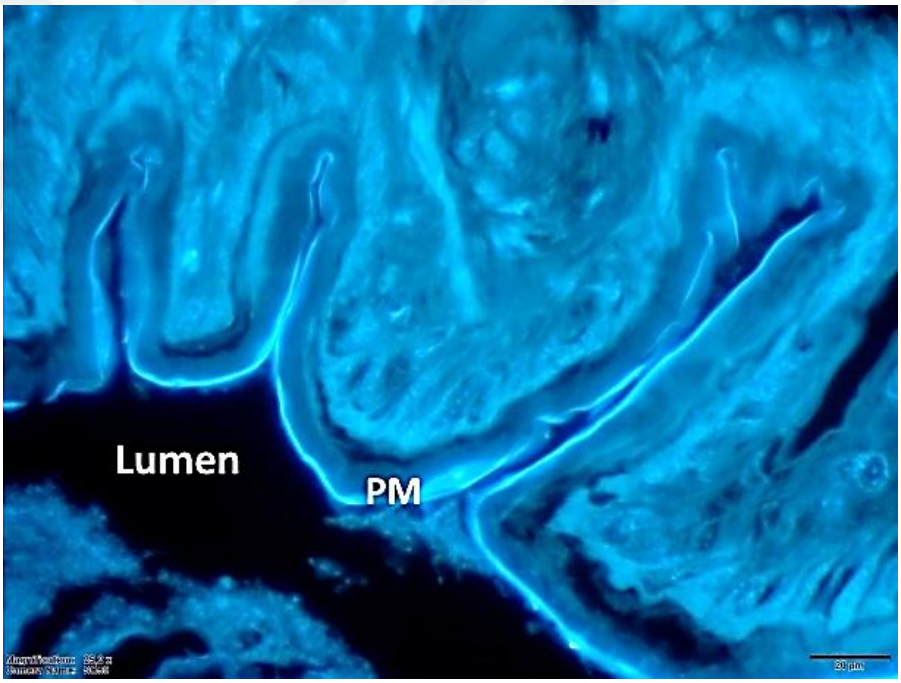
(b)

Şekil 4.19 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda (b) 1 hafta 50 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen, goblet hücreleri (ok). x1000(a), x400(b)



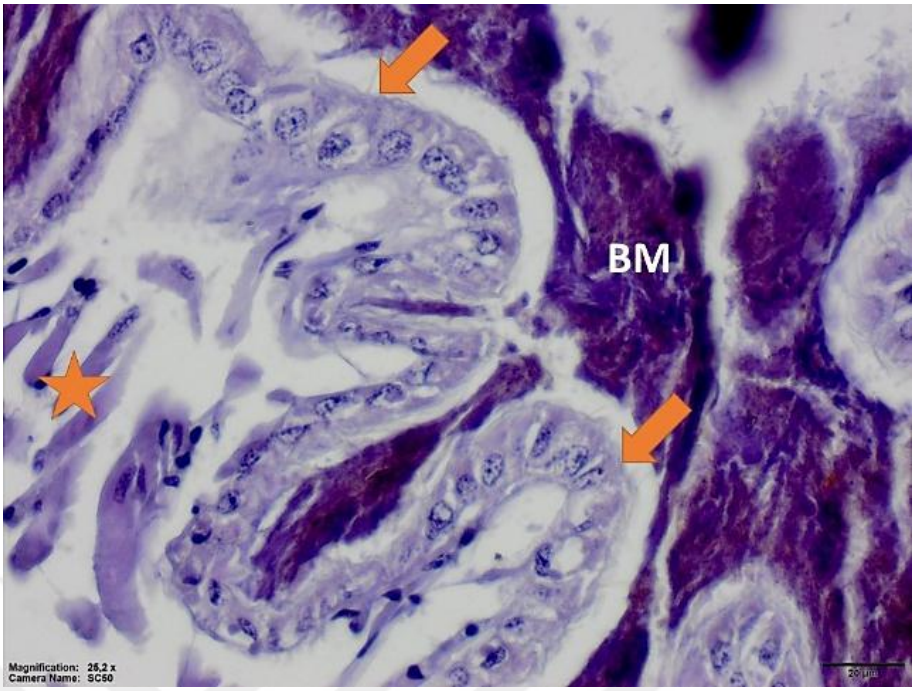
(a)



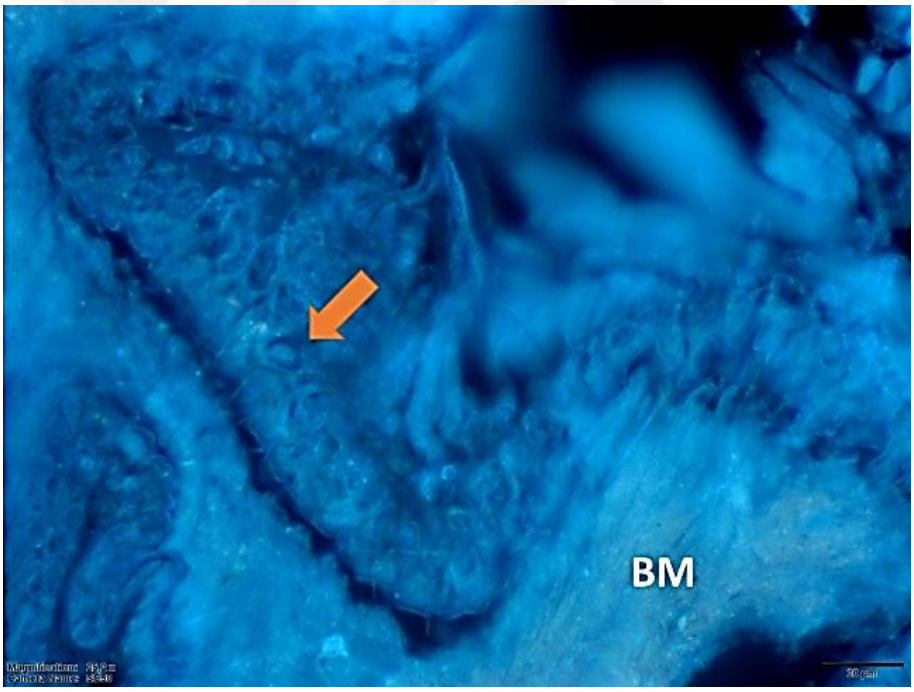
(b)

Şekil 4.20 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b. 1 hafta 100 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen, hiyalinleşmiş silindirik epitel hücreleri (ok), kas tabakası (yıldız), peritrofik membran (PM). x400



(a)



(b)

Şekil 4.21 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b. 1 hafta 300 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Hiyalinleşmiş silindirik epitel hücreleri (ok), kas tabakası (yıldız), besin maddesi (BM). x400

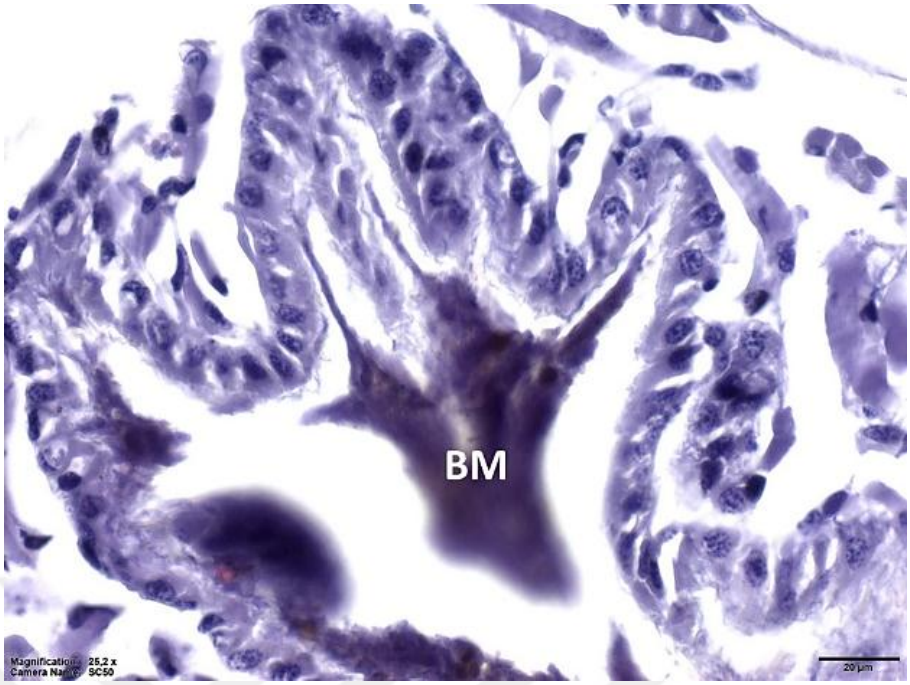
Hamam böceklerine 10 ppm Diflubenzuron uygulandıktan 1 ay sonra villus yapısında diflubenzuronun ekisinin hemen hemen hiç olmadığı dikkati çekti (Şekil 4.22).

Diflubenzuron'un 30 ppm'lik dozu hamam böceklerine uygulandıktan 1 ay sonra tıpkı 10 ppm'lik gruptaki gibi silindirik epitel hücrelerinin histolojik yapısında Diflubenzuronun etkili olmadığı ve hücrelerin düzenli bir yapıda yerleştiği gözlendi (Şekil 4.23).

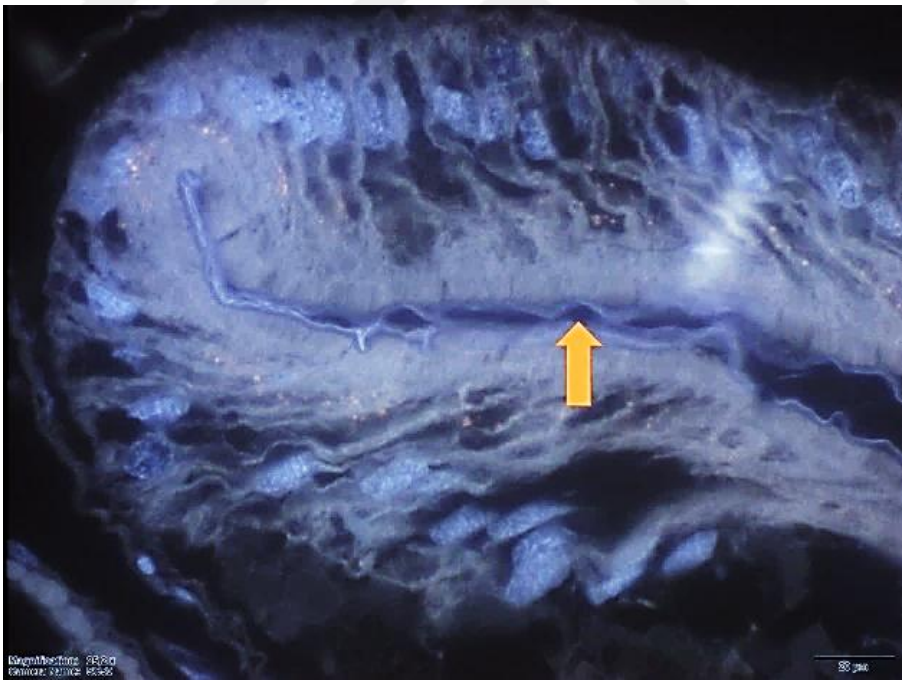
Yine benzer şekilde diğer doz sürelerinde olduğu gibi Diflubenzuron'un 50 ppm'lik dozunun hamam böceklerine uygulandıktan 1 ay sonra alınan dokular mikroskopta incelendiğinde villus hücrelerinin düzenli yerleştiği ve normal bir yapıda olduğu anlaşıldı (Şekil 4.24).

Yüksek doz olarak verilen 100 ppm'lik DFB uygulandıktan 1 ay sonra hamam böceklerinin bağırsağında diğer gruplarda olduğu gibi histolojik bazı bozukluklarının olduğu tespit edildi (Şekil 4.25).

Deneylerde en yüksek doz olarak belirlenen Diflubenzuron'un 300 ppm'lik dozu hamam böceklerine uygulandıktan 1 ay sonra alınan orta bağırsak (mide) dokularında hücrelerin çekirdekleri etrafında sitoplazmik materyal kaybı olduğu, çekirdek şekillerinin değiştiği ve düzensiz bir hücre yerleşiminin olduğu hem ışık hem de floresan mikroskopta gözlendi (Şekil 4.26).



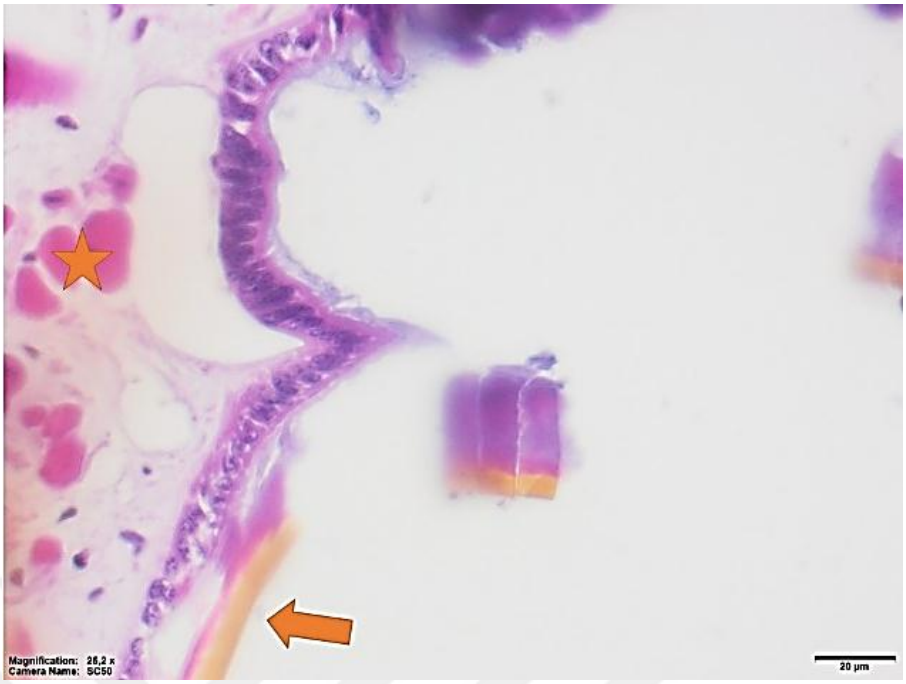
(a)



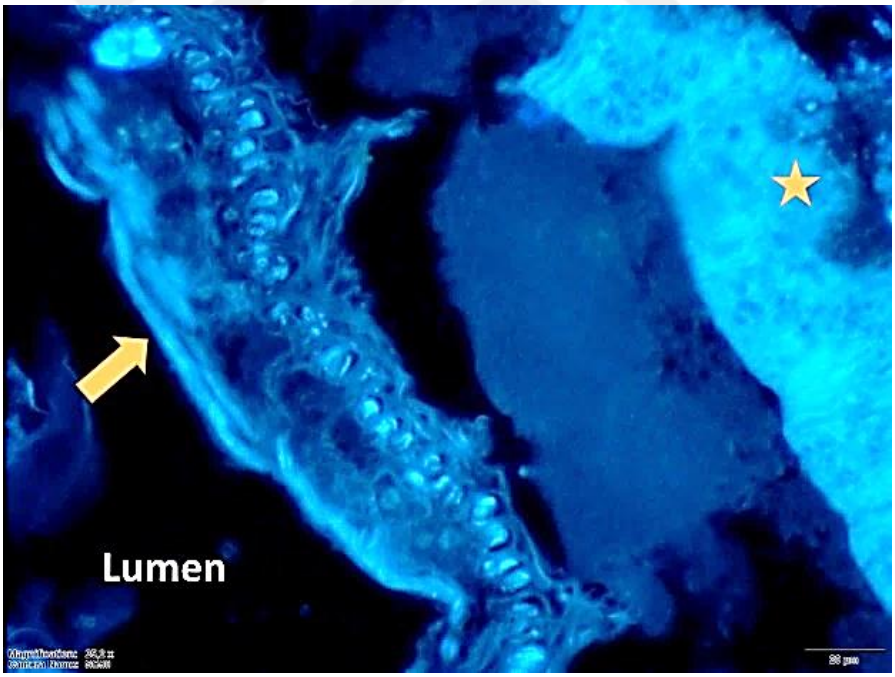
(b)

Şekil 4.22 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b, 1 ay 10 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Peritrofik membran (ok), besin maddesi (BM). x400



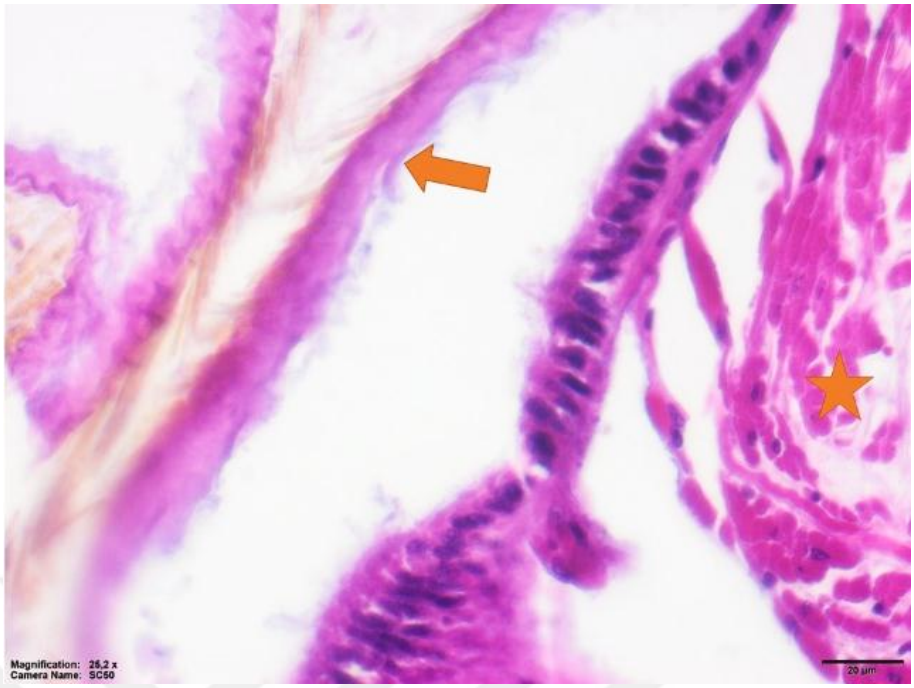
(a)



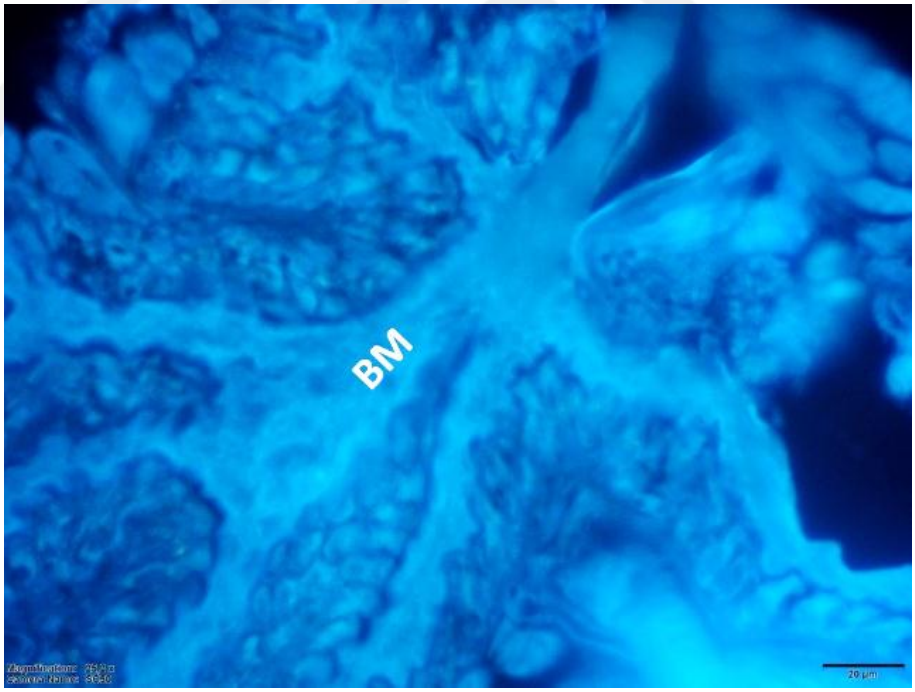
(b)

Şekil 4.23 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b. 1 ay 30 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı.

Lumen, Peritrofik membran (ok), kas tabakası (yıldız). x400



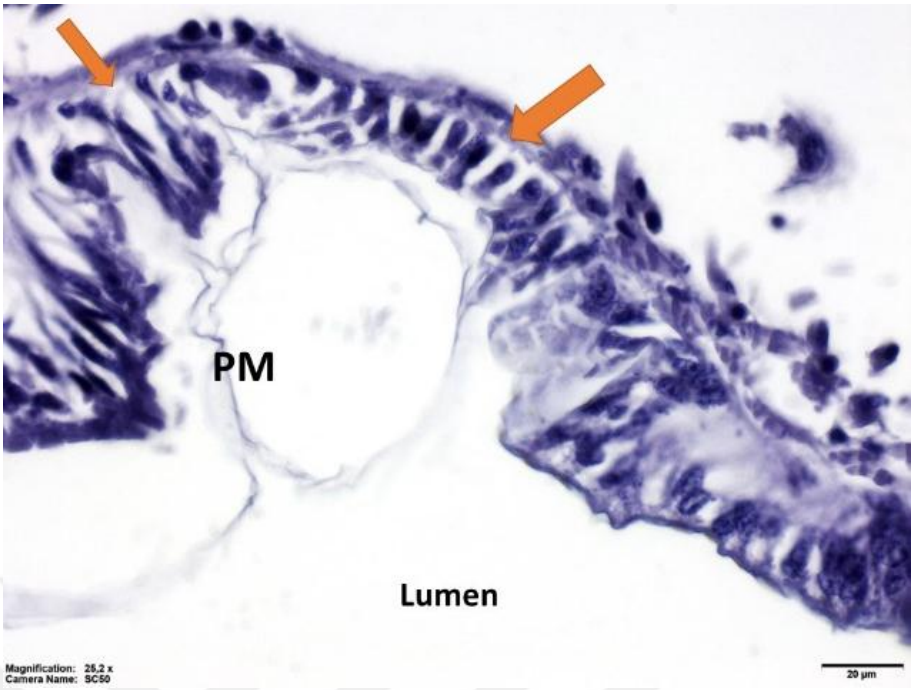
(a)



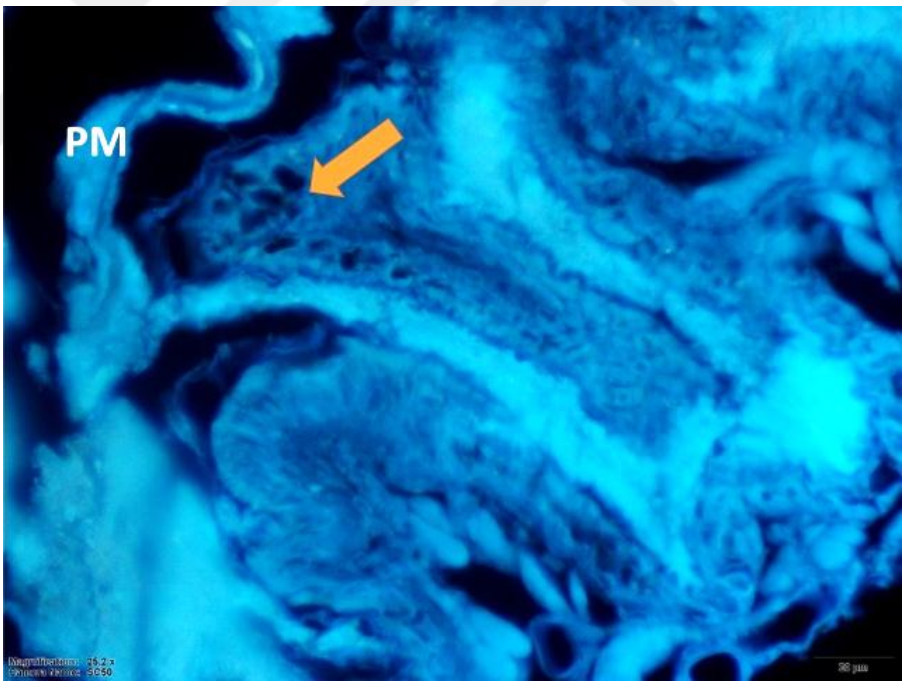
(b)

Şekil 4.24 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda, b. 1 ay 50 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Kas tabakası (yıldız) , Peritrofik membran (ok), besin maddesi (BM). x400



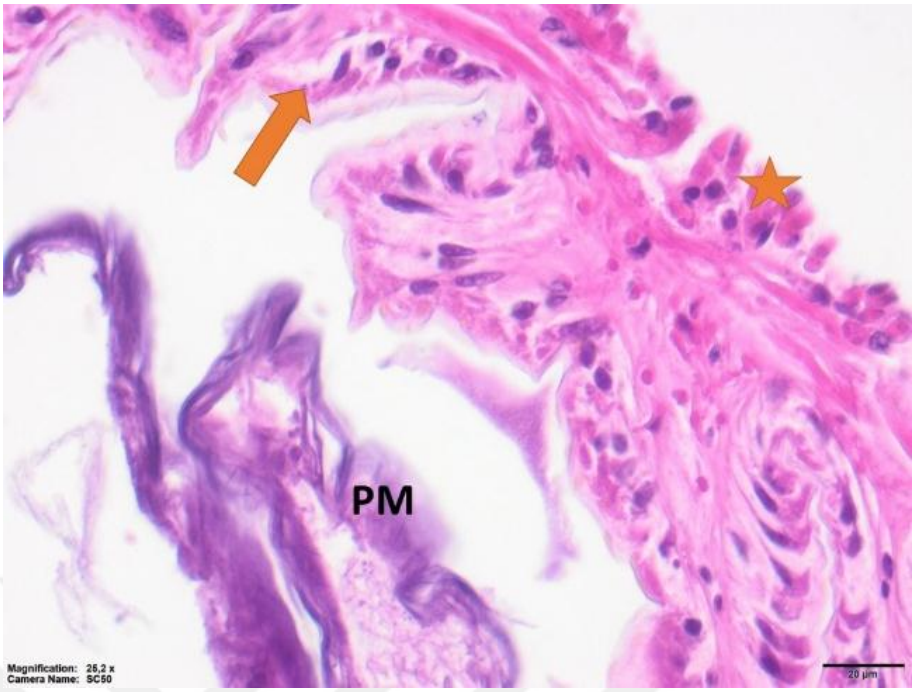
(a)



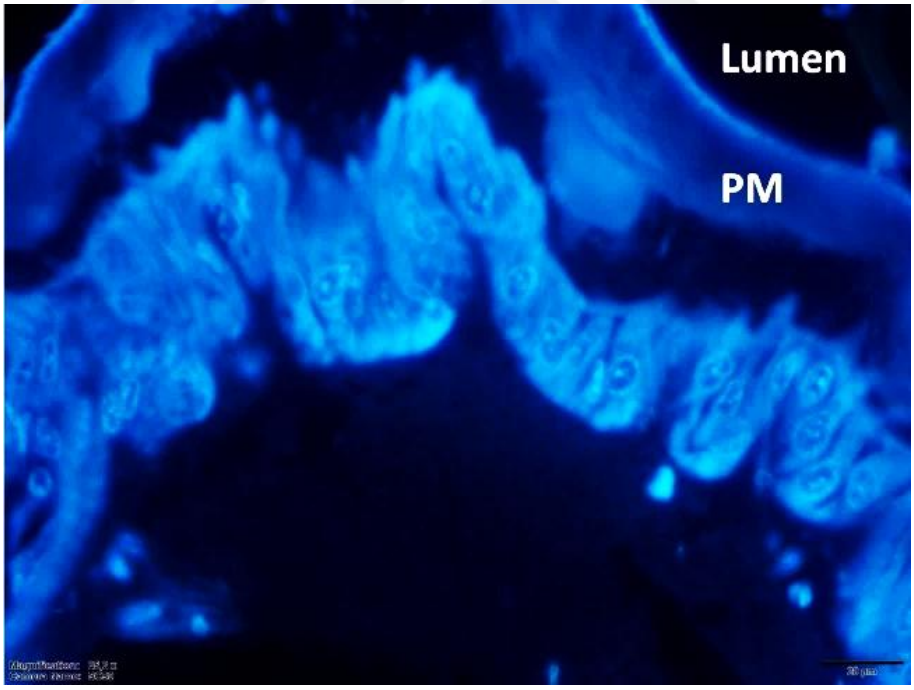
(b)

Şekil 4.25 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda. B, 1 ay 100 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen, Peritrofik membran (PM), hiyalinleşmiş epitel hücreleri (ok). x400



(a)



(b)

Şekil 4.26 Işık mikroskobunda a. floresan mikroskobunda b. 1 ay 300 ppm DFB uygulanan böcek grubunda bağırsak villus yapısı

Lümen, Peritrofik membran (PM), hiyalinleşmiş epitel hücreleri (ok), kas tabası (yıldız). x400

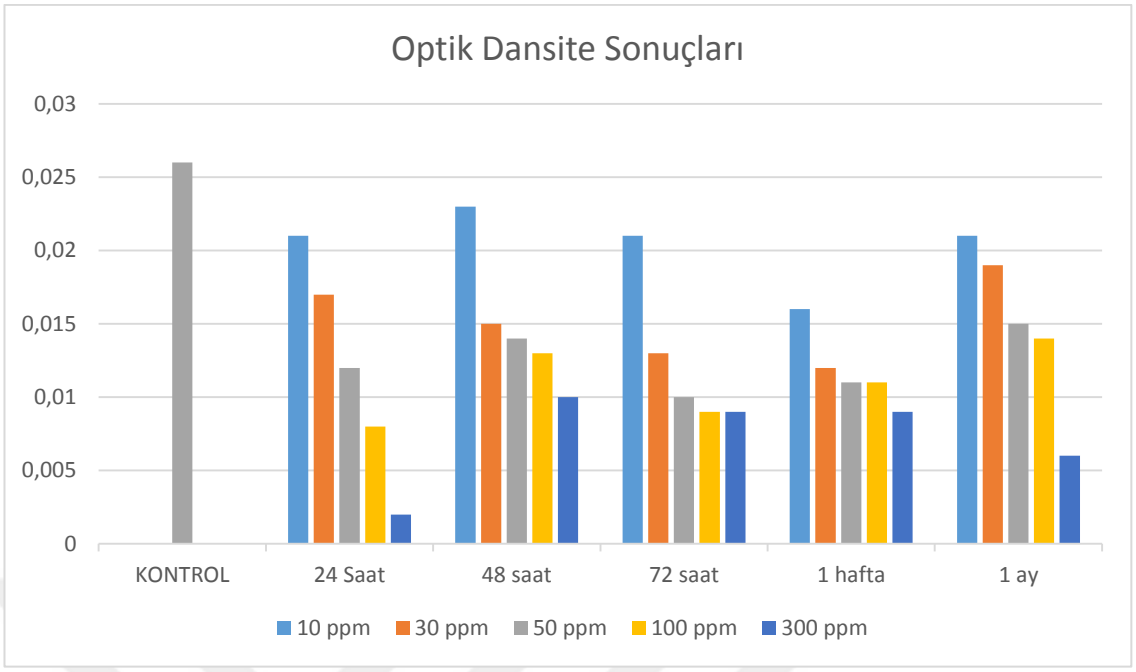
4.2 Diflubenzuron'un *Periplenata americana*'nın Kütikülasındaki Kitin Miktarı Üzerine Etkileri

Deneylerde kullanılan hamam böceği türü olan *Periplaneta americana*'nın 5.evre bireylerine Diflubenzuron'un çeşitli dozları uygulandı ve değişik sürelerde hayvanlardan kütiküla örnekleri alındı ve biyokimyasal yöntemle kitin miktarı seviyeleri ölçüldü.

Yapılan deneysel incelemeler sonunda böceklerden alınan kütiküla örneklerindeki kitin miktarı spektrofotometrede 650 nm dalga boyunda absorbans değerleri çizelge 4.1'de belirtildi. Elde edilen spektrofotometrik absorbans değerlerin Diflubenzuron'un 10 ppm'lik dozlarda 1 haftalık sürenin etkili bir şekilde kitin miktarını azalttığı (0,016), 30 ppm'lik dozlarda 1 haftalık sürede kitin miktarının azaldığı (0,012), 50 ppm'lik dozlarda 72 saatlik sürede kitin miktarının azaldığı (0,010), 100 ppm'lik dozda 24 saatlik sürede azalttığı (0,008), 300 ppm'lik dozlarda 24 saatlik DFB uygulamasında kitin miktarının en az olduğu (0,002) tespit edildi.

Çizelge 4.1 Spektrofotometrede kitin miktarı için yapılan optik dansite (OD) ölçüm sonuçları

Süre/Doz	10 ppm	30 ppm	50 ppm	100 ppm	300 ppm
24 Saat	**0,021**	**0,017**	**0,012**	**0,008**	**0,002**
48 saat	**0,023**	**0,015**	**0,014**	**0,013**	**0,010**
72 saat	**0,021**	**0,013**	**0,010**	**0,009**	**0,009**
1 hafta	**0,016**	**0,012**	**0,011**	**0,011**	**0,009**
1 ay	**0,021**	**0,019**	**0,015**	**0,014**	**0,006**



Şekil 4.27 Spektrofotometrede kitin miktarı için yapılan optik dansite (OD) ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan deneylerde Amerikan hamamböceklerinde (*Periplaneta americana*) Diflubenzuron'un çeşitli dozlarının ve çeşitli uygulama sürelerinin ne derece hasar verici etkisinin olduğu hem orta bağırsak hücrelerinin yapısına etkisi hem de böceklerin gelişim evrelerindeki kütikülasının kitin miktarına etkisi incelendi.

Diflubenzuron'un *Lymantria dispar* 'ın larval iç organlarına hasar vermediği ancak larvalarının endokütikülasındaki kitin birikimini %33 azalttığı ve lipid miktarını artırdığı bildirilmiştir (Salama vd. 1976). Yapılan çalışmada *Periplaneta americana* 'nın orta bağırsak hücrelerini yüksek dozlarda hasar vermesi, *Lymantria dispar* larvalarının iç organlarına hasar vermemesi bakımından farklılık ortaya çıktı. Kitin miktarını da aynı şekilde azalttığı tespit edildi.

Grosscurt (1977), Diflubenzuron'un *Leptinotarsa decemlineata* larvalarının endokütikülasında büyümeyi engellediğini, biyokimyasal çalışmalarla da kitin sentezinin engellendiğini belirtmiştir. Abdelmonem ve Mumma (1981), Diflubenzuron'un *Lymantria dispar* larvalarında kitin sentezini engellediği ve özellikle 3. evre larvalara oldukça toksik etki yaptığını rapor etmişlerdir. Reynolds (1987), Diflubenzuron gibi kitin sentezini engelleyen faktörler nedeniyle böceklerin yeni kütiküla sentezini yapamadığını ve eski deriyi atamadıklarını tespit etmiştir. Yukarıda yapılan çalışmalarda belirtilen Diflubenzuron'un kitin miktarını azaltma yönünde etkili olması sonuçları, çalışmamızın 5. evre *P.americana* nimflerindeki kitin sentezini engellemesi yönündeki sonuçlarla benzerlik gösterdi.

Erinç (1996), yaptığı doktora tezi çalışmasında Diflubenzuron'un 0.12 g/m^{2}lik dozunu *Agrotis segetum* larvalarının besinlerine karıştırıp uyguladıktan, 24 saat, 48 saat, 72 saat, 4 gün, 5 gün, 6 gün, 7 gün ve 8 gün sonra larvaların hayatta kalma oranlarını gözlemlemiştir. Yaptığı çalışmalar sonucunda larvalarda en etkili sürenin % 92,72 ölüm oranıyla 8. gün olduğunu belirtmiştir. Tez çalışmasında sadece 100 ppm DFB dozunun 24 saatlik deneme grubundaki bireylerin ölümüne sebep olması yönünden Erinç (1996) 'in deney sonuçlarıyla farklılık gösterdi. Histolojik yönden ise 6 saatlik

süre sonunda herhangi bir hasar olmadığını gözlemlemiştir. Uygulamadan 24 saat sonra epitel hücrelerinin apikalinde genişlemeler, madde birikimi ve sitoplazmalarında saydamlaşma tespit etmiştir. Uygulamadan 48 saat sonra ise epitel hücrelerin apikalinde vakuol oluşumları ve kopmaların olduğunu tespit etmiştir. Tez çalışmasında ise 300 ve 100 ppm'lik dozların bütün deneme sürelerinde hücre hasarına sebep olduğu ortaya konuldu.

Özparlak (2013), Diflubenzuron'un kitin sentezini engellediğini öne sürmüştür. Ayrıca DNA replikasyonunun inhibe ettiğini ileri sürmüştür. Özparlak (2013)'ın sonuçlarıyla çalışma sonuçları kitin miktarının azalması yönünde benzerlik göstermektedir.

Yapılan bu tez çalışmasıyla Diflubenzuron'un hücresel düzeyde hasar verici etkisinin yüksek dozlarda bütün deneme sürelerinde etkili olduğu (100 ve 300 ppm), kitin miktarının en fazla azalmasının ise 1 ay 300 ppm doz grubunda olduğu ortaya konuldu. Yüksek Lisans Tez çalışmasının DFB'un hücre hasarına ve kitin miktarının azalmasına sebep olması yönünden bundan sonraki böcek mücadelelerinde yüksek dozların etkili olması açısından öneminin ortaya konması bakımından referans olacağı ve bilim dünyasına entomolojik yönden katkıda bulunacağı düşünüldü.

KAYNAKLAR

Abdelmonem, A.H. and Mumma, R.O. 1981. Comperative toxicity of some molt-inhibiting insecticides to the gibsy moth. J. Econ. Entomol., 74(2); 176-179.

Ahmed, K.S., El-Bermawy, S.M., Ismael, E.H., Abdel-Gawwad R.M. and Saleh, T.A. 2015. Histopathological effects of Diflubenzuron and Chromafenozide (IGRs) on egg development in the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Lepidoptera, Noctuidae). Journal of Bioscience and Applied Research, 1(4); 147-153.

Anonymous. 2014. Web Sitesi: https://scienceeasylearning.wordpress.com/2014/12/ 21/ digestive-system-in-cockroach/ , Erişim Tarihi: 22.04.2018.

Anonymous. 2017. Web Sitesi: http://www.who.int/whopes/quality/Diflubenzuron_ eval_specs_WHO_September_2017.pdf?ua=1&ua=1,Erişim Tarihi: 05.05.2018.

Anonymous. 2018. Web Sitesi: http://lanwebs.lander.edu/faculty/rsfox/invertebrates/ periplaneta.html , Erişim Tarihi: 05.05.2018.

Benze, T. P., Sakuragui, M.M., Zago, L.H. de P. and Fernandes, M.N. 2016. Subchronic exposure to diflubenzuron causes health disorders in neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. Environmental Toxicology, 31(5); 533-542.

Bolognesi, R., Terra, W.R. and Ferreira, C. 2008. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. Annu. Rev. Entomol., 35, 219-248.

Campbell, N.A. ve Reece, J.B. 2008. Biyoloji, Altıncı baskıdan çeviri (2.baskı). Palme Yayınevi, 660 s., Ankara.

Erinç, M. 1996. *Bacillus thuringiensis* ve bazı kimyasal insektisitlerin *Agrotis segetum* (Denis et. Schiff.) (Lepidoptera:Noctuidae) larvalarına etkileri. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Fathpour, H., Noori, A. and Zeinali, B. 2007. Effects of a juvenoid pyriproxyfen on reproductive organ development and reproduction in German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). Iranian Journal of Science & Technology, Transaction A., 31, 89-98.

Göktay, M. ve Kısmalı, Ş. 1990. Diflubenzuron'un böcekler üzerindeki etkileri. Türk. Entomol. Derg., 14(1); 53-64.

Grosscurt, A.C. 1977. Ovicidal effect of diflubenzuron on the house fly (*Musca domestica*), Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gest., 41, 949-963.

Gullan,P.J. ve Cranston,P.S. 2012. Böcekler: Entomolojinin Ana Hatları. 4. Basımdan çeviri. Nobel yayınları, 564 s., Ankara.

Hassan, A.E.M. and Charnley, A.K. 1987. The effect of dimilin on the ultrastructure of the integument of *Manduca sexta*. J. Insect Physiol., 33(9); 669-676.

Kalafatic, M., Znidaric, D., Lui, A. and Wrischer, M. 1991. Effect of insecticides (Dimiline WP 25, Torak EC 24 and Gamacide 20) on hydra (*Hydra vulgaris* Pallas). Int. J. Dev. Biol., 35, 335 – 340.

Kim, S.Y., Shon, D.H. and Lee, K.H. 2000. Enzyme linked immunosorbent assay for detection chitooligosaccharides, Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 696-701.

Koçak, E. ve Kılınçer, N. 1997. Juvenil Hormon Analoğu Methoprene'in Pamuk Yaprakkurdu [*Spodoptera Littoralis* Boisd. (Lep.:Noctuidae)]'na Etkileri:I. Pupa ve Yumurtalara Etkiler. Bitki Koruma Bülteni, 37 (3-4); 163-172.

Koyama, Y., Kimura, J., Yoshioka, K., Watanabe, T., Seki, T., Hosokawa, S., Yamada, S. and Hagiwara, S. 1989. A Six-Month Chronic Dietary Toxicity Study of Pyriproxyfen in Rats. J. Toxicol. Sci., 14, 43–64.

Kuştimur, S., Aydoğan, S., Kalkancı, A., Berk, E., Yalçın, B. ve Bolat, S. 2008. Dokuda kitin varlığı ile mantar infeksiyonları arasındaki ilişkinin hayvan modellerinde gösterilmesi. İnfeksiyon Dergisi, 22(2); 97-101.

Lehmann, P.F. and White, L. 1975. Chitin assay use to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of Aspergillus fumigates mycelium in mice. Infect Immun, 12, 987-92.

Levy, S.M., Falleiros, M.F.A., Moscardi, F., Gregorio E.A. and Toledo L. 2004a. Morphological study of the hindgut in larvea of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop. Entomol., 33(4); 427-431.

Levy, S.M., Falleiros, M.F.A., Moscardi, F., Gregorio, E.A., Toledo, L. 2004b. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae): Light and electron microscopy studies of the epithelial cells. Brazilian J. Biol.,64(3B); 633-638.

Li, S., Zhu, S., Jia, Q., Yuan, D., Ren, C., Li, K., Liu, S., Cui, Y., Zhao, H., Cao, Y., Fang, G., Li, D., Zhao, X., Zhang, J., Yue, Q., Fan, Y., Yu, X., Feng, Q. and Zhan, S. 2018. The genomic and functional landscapes of developmental plasticity in the American cockroach. Nature Communications, 9(1); 66-71.

Maduenho L.P. and Martinez C.B.R. 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Comp Biochem Physiol C, 148, 265–272.

Mars, T.C. 2012. Toxicology of Insecticides to Mammals. Mini-Review Pest Manag Sci., 68(10); 1332-1336.

Matolin, S. and Chudakova, I.V. 1983. Ovicidial effects on diflubenzuron and dimatif on eggs of *Acheta domestic* (Orthoptera). Acta ent. Bohemus., 80(5); 352-35.

Merzendorfer, H. and Zimoch, L. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. J. Exp. Biol., 206, 4393-4412.

Mitsui, T., Nobusawa, C. and Fukami, J. 1981. Inhibition of Chitin Synthesis by Diflubenzuron in *Mamestra brassicae L*. . Journal of Pesticide Science, 6, 155-161.

Miyamoto, J., Hirano, M., Takimoto, Y. and Hatakoshi, M. 1993. Insect Growth Regulators for Pest Control, with Emphasis on Juvenile Hormone Analogs: Present Status and Future Prospects. ACS Symp. Ser., 524, 144-168.

Nakagawa, Y., Ishii, S. and Matsumura, F. 1996. Diflubenzuron stimulates phosphorylation of a 39 kDa Integumental Protein from newly molted American Cockroach(*Periplaneta americana*). Insect Biochem. Mol. Biol., 26(8-9); 891-898.

Özparlak, H. 2003. Böceklerde Kütikülanın Yapısı, Deri Değiştirme Ve Diflubenzuron'un (DFB) Etkileri. S.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi, 21, 7-19.

Reynolds, S.E. 1987. The cuticule growth and moulting in insects: The essential background to the actin of acylurea insecticides. Pestic. Sci., 20,131-146

Rost-Roszkowska, M.M. and Undrul, A. 2008. Fine structure and differentiation of the midgut epithelium of *Allacma fusca* (Insecta: Collembola: Symphypleona). Zool. Studies, 47(2); 200-206

Salama, H.S., Motagally, Z.A. and Skatulla, U. 1976. On the mode of action of Dimilin as a moulting inhibitor in some Lepidopteous insect. Z. Ang. Ent., 80,396-407.

Salokhe, S. G., Deshpande, S. G. and Mukherjee, S. N. 2012. Evaluation of the Insect Growth Regulator Lufenuron (Match[R]) for Control of *Aedes aegypti* by Simulated Field Trials. Parasitology Research, 111 (3); 1325-9.

Takeshi, M., Schaefer, C.M., Takeshi, R.M. and Mulligan, F.S. 1976. Effects of the insect growth inhibitor, dimilin on hatching of mosquito eggs. J. Econ. Ent., 69, 655-658.

Toros, S. ve Maden, S. 1985. Tarımsal Savaş Yöntem ve İlaçları. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara.

Turanlı, F., Çabuk, M., Kısmalı, Ş. ve Gelbici, I. 2006. Bacillus thuringiensis var. tenebrionis'in *Leptinotarsa decemlineata* (Say.) (Coleoptera: Chrysomelidae) larvalarının orta bağırsağına etki sürecinin histolojik yöntemlerle belirlenmesi. Türk. Entomol. Derg., 30 (2); 137-150.

Özkaya, G., Çeliker, A. Ve Koçer-Giray, B. 2013. İnsektisit zehirlenmeleri ve Türkiye'deki durumun değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg,; 70(2); 75-102.

Ware, G.W. 2000. The Pesticide book. Thompson Publications, Fresno, California.

Wilson, T.G. and Cryan, J.R. 1997. Lufenuron a chitin-synthesis inhibitor, interrupts developments of *Drosophila melanogaster*. J. Exp. Zool., 207(1);37-44.

Yıkılmaz, M.S. and Deveci, Ö. 2004. Structure of midgut and peritrophic matrix in the last instar larvae of *Culex pipiens* (diptera: culicidae). G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 17(2); 9-19.

ÖZGEÇMİŞ

Adı	: Hakan ESKİZENGİN
Doğum Yeri	: Lefkoşa/K.K.T.C.
Doğum Tarihi	: 21/06/1988
Medeni Hali	: Bekar
Yabancı Dili	: İngilizce, 2018 YÖKDİL - 88.75

Eğitim Durumu

Lise	: 75. Yıl Anadolu Lisesi (2006)
Lisans	: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2012)
Yüksek Lisans	: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2013 - 2018)

Deneyim Alanları

Olympus Floresan Mikroskobu kullanımı, JEOL Geçirimli Elektron Mikroskobu kullanımı, histolojik ve histokimyasal boyama teknikleri.

Proje Görevleri

Yardımcı Araştırmacı, "Biyoloji Bölümü Elektron Mikroskobu ve Histokimya Laboratuvarlarının Yeniden Yapılandırılıp Geliştirilmesi". 2016-2017. BAP Proje No: 16A0430001

Uluslararası Kongre Sözlü Sunumları

"Histochemical Effects of Brodifacoum on Rat Spleen", 11th European Vertebrate Pest Management Conference, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw – Poland.