

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**AZADIRACHTIN'IN *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA:
PYRALIDAE)'DA HEMOSİTLER ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZ TAŞKIRAN

BALIKESİR, ŞUBAT - 2016

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**AZADIRACHTIN'IN *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA:
PYRALIDAE)'DA HEMOSİTLER ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZ TAŞKIRAN

Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. Aylin ER (Tez Danışmanı)

Doç. Dr. Olga SAK

Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN

BALIKESİR, ŞUBAT - 2016

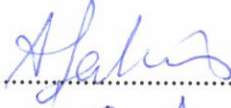
KABUL VE ONAY SAYFASI

Deniz TAŞKIRAN tarafından hazırlanan “AZADIRACHTIN'IN *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)'DA HEMOSİTLER ÜZERİNE ETKİLERİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 01.02.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Aylin ER


.....

Üye
Doç. Dr. Olga SAK


.....

Üye
Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN


.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

**Bu tez alışması Balıkesir Üniversitesi Rektrlğ Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından BAP 2015/187 nolu proje ile desteklenmiştir.
Teşekkür ederiz.**

ÖZET

**AZADIRACHTIN'IN *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)'DA HEMOSİTLER ÜZERİNE ETKİLERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
DENİZ TAŞKIRAN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. AYLİN ER)

BALIKESİR, ŞUBAT - 2016

Tez çalışması kapsamında bitkisel kaynaklı bir insektisit olan azadirachtinin, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'ya topikal olarak uygulanmasının böcekte biyolojik parametrelere, yumurta verimine ve hücresel bağışıklık tepkilerine etkileri belirlendi. Büyük balmumu güvesi, *G. mellonella*, $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $\%60\pm 5$ nispi nem uygulanarak laboratuvar koşullarında yetiştirildi. Azadirachtin uygulaması sonucu LD_{50} değeri 16.564 olarak bulundu ve konsantrasyona bağlı ölüm gerçekleşti. Ergin çıkış süresi 100 ppm'de artış gösterirken, ergin yaşam süresi LD_{50} altındaki dozlarda azalıp, daha yüksek dozlarda etkili değildi.

Azadirachtinin topikal olarak uygulanması sağlıklı yumurta sayısını azaltıp, bozuk yumurta sayısını artırarak toplam yumurta verimini azalttı. Bununla beraber 50 ppm'den büyük dozlarda ergin dişiler hiç yumurta bırakmadı. Tez çalışmamızda aynı zamanda azadirachtin uygulamasının toplam ve farklı hemosit sayıları, lamınarin enjeksiyonunu takiben nodül oluşumu, mitotik indeks ve hemositlerin yayılma davranışı gibi bağışıklık tepkileri üzerine etkileri belirlendi. Azadirachtin uygulamasını takiben 24 ve 48 saatlik periyotlarda toplam hemosit sayılarında belirgin bir düşüş görüldü. Granülosit sayısındaki azalma ve plazmatosit sayısındaki artış sadece 100 ppm'de önemli bulunurken, prohemosit ve önositoid oranlarındaki değişimler anlamlı değildi. Mitotik hemositlerin oranları ise 1000 ve 3000 ppm'de azalma gösterdi. *G. mellonella* larvalarının azadirachtine maruz kalması nodül sayılarını ve hemositlerin yayılma davranışlarını tüm dozlarda azalttı. Bulgularımız entegre zararlı yönetiminde kullanılmaya aday olan azadirachtinin, model böcek *G. mellonella*'da biyolojik parametrelere ve hücresel bağışıklık tepkilerine etkilerini ilk kez ortaya koymaktadır.

ANAHTAR KELİMELER: *Galleria mellonella*, azadirachtin, yumurta verimi, toplam hemosit, nodül oluşumu, hücre yayılması.

ABSTRACT

EFFECTS OF AZADIRACHTIN ON HEMOCYTES OF *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

MSC THESIS

DENİZ TAŞKIRAN

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. AYLİN ER)

BALIKESİR, FEBRUARY 2016

In this paper we investigate whether the botanical insecticide azadirachtin alters the biological parameters, fecundity, and cellular immune responses of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) while applied topically on the insect. The greater wax moth *G. mellonella* were reared in the laboratory at $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ and $60\pm 5\%$ relative humidity. Treatment of azadirachtin gave a LD_{50} of 16.564 ppm and showed a concentration dependent mortality of last instars. Adult emergence time dramatically increased at 100 ppm whereas adult longevity decreased at sub-lethal concentrations but displayed no effects at doses greater than LD_{50} .

Topical application of azadirachtin decreased fecundity associated with the reduced number of healthy eggs and increased number of defected eggs. Moreover the adult females laid no eggs at doses >50 ppm. The present study also elucidates immunosuppressive effects of azadirachtin with respect to total and differential hemocyte counts, nodule formation following challenge with laminarin as well as mitotic indices and spreading behavior of hemocytes. Treatment of azadirachtin elicited a sharp decrease in the number of circulating hemocytes at 24 and 48 h intervals. The reduction in granulocyte and increase in plasmatocyte ratios were only significant at 100 ppm whereas no difference were observed in prohemocyte and oenocytoid ratios. The relative number of mitotic hemocytes also decreased considerably at 1000 and 3000 ppm. Exposure of *G. mellonella* larvae to azadirachtin significantly reduced the number of nodules and the ability of hemocytes to spread at all doses. These findings demonstrate for the first time that azadirachtin, as a good candidate for the integrated pest control, has the potency to affect the life table parameters and cellular immune defense reactions of the model insect, *G. mellonella*.

KEYWORDS: *Galleria mellonella*, azadirachtin, fecundity, hemocyte count, nodule, cell-spreading.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ	vii
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM	12
2.1 <i>G. mellonella</i> Stok Kültürünün Kurulması	12
2.2 Azadirachtin.....	13
2.3 Azadirachtin Dozlarının Belirlenmesi ve Uygulaması	14
2.3.1 Toksisite	14
2.3.2 Azadirachtin Uygulaması	14
2.4 Azadirachtinin <i>G.mellonella</i> 'nın Biyolojisine Etkisi	15
2.4.1 Koza Örme Süresi.....	15
2.4.2 Puplaşma Süresi.....	16
2.4.3 Pupal Periyot	16
2.4.4 Ergin Çıkış Süresi.....	16
2.4.5 Yüzde Puplaşma ve Yüzde Erginleşme	16
2.4.6 Ergin Yaşam Süresi	17
2.4.7 Toplam Yumurta Sayısı.....	17
2.5 Toplam Hemosit Sayıları.....	17
2.6 Farklı Hemosit Sayıları.....	19
2.7 Nodülasyon	20
2.8 İstatistik.....	22
3. BULGULAR	23
3.1 Zehirlilik Testi	23
3.2 Gelişim Biyolojisi	24
3.2.1 Koza Örme Süresi.....	24
3.2.2 Puplaşma Süresi.....	25
3.2.3 Pupal Periyot	26
3.2.4 Ergin Çıkış Süresi.....	27
3.2.5 Yüzde Puplaşma ve Yüzde Erginleşme	28
3.2.6 Ergin Yaşam Süresi	30
3.2.7 Yumurta Sayıları	31
3.3 Hemosit Sayıları	35
3.3.1 Toplam Hemosit Sayıları.....	35
3.3.2 Farklı Hemosit Sayılarına Etkileri	37
3.3.2.1 Granülosit Sayısına Etkisi	37
3.3.2.2 Plazmatosit Sayısına Etkisi.....	39
3.3.2.3 Önositoid Sayısına Etkisi	40
3.3.2.4 Prohemosit Sayısına Etkisi	41
3.3.2.5 Hemositlerin Yayılma Davranışı	43
3.3.2.6 Hemositlerin Melanizasyonu	44
3.3.2.7 Hemositlerde Mitotik İndeks	45
3.4 Nodülasyon	46
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	47

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Azadirachtinin kimyasal yapısı.	2
Şekil 2.1: <i>G.mellonella</i> stok kültürü.	12
Şekil 2.2: Balsız kuru siyahlaşmış petek.	12
Şekil 2.3: Azadirachtinin molekül yapısı.	13
Şekil 2.4: Topikal aplikasyon.	15
Şekil 2.5: Neubauer hemositometre lamı.	18
Şekil 2.6: Neubauer hemositometresi sayım alanı.	19
Şekil 2.7: Laminarin enjeksiyonu.	20
Şekil 2.8: Diseksiyon.	21
Şekil 2.9: Nodül sayımı.	21
Şekil 3.1: Farklı azadirachtin dozlarında koza örme süresinde görülen değişimler. ..	25
Şekil 3.2: Farklı azadirachtin dozlarında puplaşma süresinde görülen değişimler. ..	26
Şekil 3.3: Farklı azadirachtin dozlarında pupal periyotta görülen değişimler.	27
Şekil 3.4: Farklı azadirachtin dozlarında ergin çıkış süresinde görülen değişimler. ..	28
Şekil 3.5: Yüzde puplaşma ve yüzde erginleşme için farklı azadirachtin dozlarının karşılaştırılarak gösterilmesi.	29
Şekil 3.6: Farklı azadirachtin dozlarında yüzde puplaşma ve yüzde erginleşmede görülen değişimler.	30
Şekil 3.7: Farklı azadirachtin dozlarında ergin yaşam süresinde görülen değişimler.	31
Şekil 3.8: Farklı azadirachtin dozlarında yumurta sayılarında görülen değişimler. ..	32
Şekil 3.9: Farklı azadirachtin dozlarının yumurta sayıları açısından karşılaştırılarak gösterilmesi.	33
Şekil 3.10: Farklı azadirachtin dozlarında toplam hemosit sayılarında zamana bağlı görülen değişimler.	36
Şekil 3.11: 24 ve 48 saat için farklı azadirachtin dozlarının toplam hemosit sayıları açısından karşılaştırılarak gösterilmesi.	37
Şekil 3.12: Granülosit'in mikroskop görüntüsü.	38
Şekil 3.13: Farklı azadirachtin dozlarında granülosit sayılarında görülen değişimler.	38
Şekil 3.14: Plazmatosit'in mikroskop görüntüsü.	39
Şekil 3.15: Farklı azadirachtin dozlarında plazmatosit sayılarında görülen değişimler.	40
Şekil 3.16: Önositoid'in mikroskop görüntüsü.	40
Şekil 3.17: Farklı azadirachtin dozlarında önositoid sayılarında görülen değişimler.	41
Şekil 3.18: Prohemosit'in mikroskop görüntüsü.	42
Şekil 3.19: Farklı azadirachtin dozlarında prohemosit sayılarında görülen değişimler.	42
Şekil 3.20: Farklı azadirachtin dozlarında spread hücre sayılarında görülen değişimler.	43
Şekil 3.21: Farklı azadirachtin dozlarında melanizasyona uğramış hücre sayılarında görülen değişimler.	44
Şekil 3.22: Farklı azadirachtin dozlarında mitoz safhasında olan hücre sayılarında görülen değişimler.	45
Şekil 3.23: Farklı azadirachtin dozlarında nodül oluşumunda görülen değişimler.	46

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3. 1: <i>G. mellonella</i> 'da AZA uygulamasına bağlı LD değerleri.	23
Tablo 3. 2: <i>G. mellonella</i> 'da AZA uygulamasına bağlı PD değerleri.....	23
Tablo 3. 3: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın koza örme süresine etkisi.	24
Tablo 3. 4: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın puplaşma süresine etkisi.....	25
Tablo 3. 5: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın pupal periyot üzerine etkisi.	26
Tablo 3. 6: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın ergin çıkış süresine etkisi.	28
Tablo 3. 7: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın puplaşma ve erginleşme yüzdelere etkisi.	29
Tablo 3. 8: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın ergin yaşam süresine etkisi.....	31
Tablo 3. 9: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın toplam yumurta sayılarına etkisi.	32
Tablo 3. 10: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın normal ve bozuk yumurta sayılarına etkisi.	33
Tablo 3. 11: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın yumurta sayılarına etkisi.	34
Tablo 3. 12: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın toplam hemosit sayısına ($\times 10^6$ hücre/ml) etkisi.	36
Tablo 3. 13: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın granülosit sayılarına etkisi.....	38
Tablo 3. 14: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın plazmatosit sayılarına etkisi.	39
Tablo 3. 15: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın önositoid sayılarına etkisi.....	41
Tablo 3. 16: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın prohemosit sayılarına etkisi.....	42
Tablo 3. 17: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın hemositlerdeki spreading sayılarına etkisi.	43
Tablo 3. 18: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın hemositlerdeki melanizasyona etkisi.....	44
Tablo 3. 19: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın hemositlerdeki mitoz sayılarına etkisi.....	45
Tablo 3. 20: <i>G. mellonella</i> 'da AZA'nın nodül oluşumuna etkisi.	46

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimimin ilk gününden itibaren, tecrübe ve bilgisi ile beni her zaman destekleyen ve yönlendiren manevi desteğini hiç bir zaman esirgemeyen çok değerli Danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Aylin ER'e içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmam esnasında manevi desteğini hep hissettiğim, bilgi birikimini benimle paylaşan, sonuçların istatistiksel analizi ve yorumlanmasında yardımcı olan Değerli Hocam Doç. Dr. Olga SAK'a teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Deneylerime yardım eden, bütün telaşlarıma nazlarıma ortak olan laboratuvar arkadaşım, daha da önemlisi biricik kız kardeşim Erinç ÇELİK'e ve çalışmalarım boyunca stresime ortak olan, her fırsatta güçlü olduğumu hatırlatan canım arkadaşlarım Münevver Yasemin TUNA, Bahadır AZGİDER, Gülçin YILDIZ ve Yaprak ALPINAR'a teşekkür ederim.

Son olarak hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, sevgi ve güvenlerini benden hiç esirgemeyen, eğitimimi sürdürebilmem için bana her türlü imkanı tanıyan canım aileme sonsuz teşekkürler...

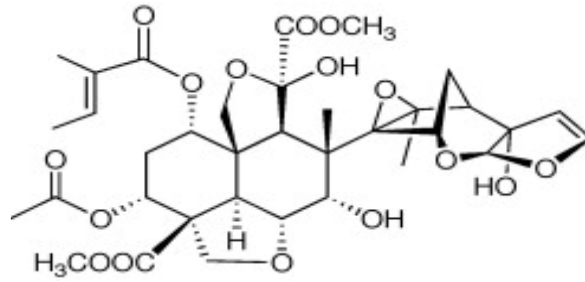
1. GİRİŞ

Tarımsal alanlarda verimlilik ve hijyeni olumsuz yönde etkileyen tarım zararlılarıyla mücadele amacıyla pestisit adı verilen zehirli kimyasal maddeler yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bilinçsiz pestisit kullanımı, doğada birikmeleri ve çevreye toksik etkileri nedeniyle hedef organizmalar dışında kalan canlıları da olumsuz yönde etkilemektedir [1, 2]. Böceklerde, sentetik insektisitlere karşı gelişen direncin dölden döle aktarılması da bu olumsuz etkiyi arttırmaktadır. Böcekler pestisitlere karşı direnç kazansalar da diğer canlılar özellikle de memeliler gibi gelişmiş canlılarda bu tip bir direnç gözlenememiştir [3]. Bu nedenlerle, pestisitlerin zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması veya en aza indirilmesi amacıyla kimyasal kontrol yöntemlerinin yerini alabilecek biyolojik savaş ve doğal organik insektisitlerin kullanımı üzerindeki çalışmalar artmıştır [4].

Böceklerle mücadele teknikleri; yumurtlamayı önleyici feromonların kullanımı, kısır böceklerin salınımı ve hormonal kontrol ile gelişimin engellenmesi gibi yöntemleri kapsamaktadır [5]. Özellikle, 1980 sonrasında gelişmiş ülkelerde “Entegre Zararlı Yönetimi (IPM =Integrated Pest Management)” adı altında yeni bir yöntem ortaya çıkmıştır [6-9]. Böceklerle entegre mücadele, onları öldürmek amacıyla değil, popülasyonlarını belli seviyelere düşürmek amacıyla yapılmaktadır. IPM programlarında kullanılan veya kullanılmaya aday olan insektisitler çevreye zarar vermemelerinden, güneş ışığında, nemde ve rüzgarlı hava koşullarında çok hızlı parçalanmalarından, insanlara karşı düşük toksik etkilerinden ve düşük dozlarda kullanılmalarından dolayı sentetik kimyasal pestisitlere nazaran daha güvenli bir alternatif olarak göz önünde bulundurulmaktadır [10, 11]

Biyopestisitler, US-EPA (Amerika Çevre Koruma Ajansı)’nın yapmış olduğu sınıflandırmada; mikrobiyal pestisitler, biyokimyasal pestisitler ve bitki pestisitleri olmak üzere üç gruba ayrılır [12]. Günümüzde, bitkisel kökenli doğal insektisitler dünya insektisit pazarının %1’ini oluşturmakta ve organik tarıma yönelimin artması nedeniyle yıllık satışlar her sene yaklaşık %10-15 oranında artış göstermektedir [12].

Yapılan çalışmalarda değişik bitki türlerinin insektisidal özellik gösterdiği rapor edilmiş olmasına rağmen, bunlardan çok az miktarının ticari pestisitlere dönüştürüldüğü ve bu ürünlerin genellikle gelişmiş ülkelerde kullanıldığı belirtilmektedir [12]. Günümüzde zararlı kontrolünde kullanılan bitkisel kaynaklı pestisitlerin en çok kabul göreni *Azadirachta indica* A. Juss. bitkisinden elde edilen, tetranotriterpenoid yapısındaki neem ekstraktlarıdır [13]. Birçok ülkede *Indian lilac* olarak bilinen neem ağacı, *A. indica* yaklaşık 30 yıldır bilinen, entomologların ve bitki kimyacılarının ilgisini çeken doğal bir insektisit kaynağıdır [14, 15]. *A. indica* Hindistan, Pakistan, Endonezya ve Afrika'nın bazı kısımlarında yaygın olarak bulunan, çabuk yetişen ve herdem yeşil subtropikal bir ağaçtır [16]. Ülkemizde ise İzmir, Adana ve Hatay yöresinde kültüre alınarak park ve bahçelerde yetiştirilmektedir [17]. *A. indica*, içerdiği meliantriol, sallanin ve azadirachtin gibi maddeler nedeniyle böcekler tarafından sevilmeyen ve istenmeyen bir bitki türüdür [16]. Azadirachtin (Şekil 1.1), ilk olarak 1971 yılında Butterworth ve Morgan tarafından izole edilmiş doğal bir insektisittir [15, 18]. Azadirachtin, *A. indica* yaprak veya kabuklarının kurutulması ile toz halinde, meyve veya tohumdan terpenoid yapıda ekstrakt olarak veya tohum ve tohum kabuğundan yağ formunda elde edilmektedir [19]. Azadirachtin insan, hayvan ve çevre açısından son derece güvenilir bir madde olarak nitelendirildiği için organik tarımda kullanılabilecek ürünler arasında yer almaktadır [20].



Şekil 1.1: Azadirachtinin kimyasal yapısı.

Yapılan çalışmalarda azadirachtinin, zararlı böcek türlerine karşı uzaklaştırıcı, beslenme önleyici, üreme ve yumurta verimliliğini azaltıcı etkisi belirtilmiştir. Ayrıca azadirachtinin birçok böcek türünde gömlek değiştirmede anormallikler, anormal özellikli formların oluşması ve ergin çıkışının engellenmesi gibi etkilerinin olduğunda bildirilmiştir [11, 19, 21, 22]. Önemli bir böcek büyüme düzenleyicisi

(IGR) olan azadirachtinin, 30 böcek türünde ovipozisyonu önlediği ve 70'in üzerinde türde büyüme ve üreme kısıtlayıcı etkilerinin olduğu belirlenmiştir [23].

Azadirachtinin böcek büyüme düzenleyisi olarak ele alınmasının en önemli nedeni böcek endokrin sistemi üzerine olan etkileridir. Böceklerde yapılan bazı çalışmalarda, azadirachtinin sinir ve endokrin sisteme etki edip juvenil hormonunun sentezini engelleyerek gömlek değiştirme mekanizmasını bozduğu tespit edilmiştir. [24, 25]. Bunun yanında ecdizon yani deri değiştirme hormonu antagonistidir [26]. *Periplaneta americana* (L.) (Blattodea)'nın son dönem nimflerine azadirachtin enjekte edilerek birkaç gün içinde gömlek değiştirme olayında gecikmeler meydana geldiği bildirilmiştir [27]. *Locusta migratoria migratoroides* (R.-F.) (Orth.: Acrididae) üzerinde azadirachtinin etkileri incelendiğinde dördüncü ve beşinci evre nimflere enjeksiyon ile azadirachtin uygulamasının gömlek değiştirmede durma ve ölümlere sebep olduğu saptanmıştır [28]. Neem yağı ve zenginleştirilmiş neem tohum kabuğu ekstraktı uygulanmış *Sogatella furcifera*, *Nephotettix virescens* ve *Nilaparvata lugens*'de bu ekstraktların gömlek değiştirmede düzensizlikler, gelişmede yavaşlama, nif dönemlerinin sürelerinin uzaması ve doza bağlı ölümler gerçekleştirdiği belirlenmiştir [29].

Farklı böcek türleri ile yapılan çalışmalarda azadirachtinin en önemli etki şekillerinden birinin beslenme engelleme olduğu tespit edilmiştir. *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Ort.: Catantopidae) üzerindeki çalışmalarda Neem'in beslenme engelleyici etkisi ilk kez bulunmuştur [30]. Bu öncü çalışma birçok araştırmacıyı bu konuda çalışmaya yönlendirmiştir. Çeltiklere %1-15 oranında neem yağı emülsiyonunun uygulandığı çalışmalarda *S. furcifera* (Horv.), *N. lugens* (Stal), (Hom.: Delphacidae) ve *N. virescens* (Dist.) (Hom.: Cicadellidae)'in beslenmesinin önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir. Azadirachtinin beslenmeyi önleyici etkisi *Spodoptera littoralis*, *S. frugiperda*, *Spodoptera exempta*, *Helicoverpa zea*, *H. armigera*, *Trichoplusia ni* ve *Mamestra brassicae* gibi kelebek larvalarında gözlemlenmiştir [31]. Neem yaprak tozu uygulamasıyla nohut bitkisi üzerinde bulunan *H. armigera* üzerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir [32]. Neem tohumları ve yeşil yapraklarından elde edilen ekstraktlar, *Cicer arietinum* (nohut) ve *Cajanus cajan* bitkilerine uygulandığında bu bitkiler üzerinden beslenen *H. Armigera*'da beslenme engellenmiş, faklı gelişim evrelerinde uzamalara ve ölümlere neden

olmuştur [33]. Başka bir çalışmada doku kültüründen elde edilen neem ekstraktlarının *Oncopeltus fasciatus* (Het.: Lygaeidae)'un bir günlük 5'inci dönem nimflerinde beslenme engelleyici özelliği tespit edilmiştir [34]. Azadirachtinin böceklere etkileri üzerine yapılan bir incelemede azadirachtinin beslenme engelleyici özelliğini birçok farklı böcek takımına ait zararlı türlerde rapor edilmiştir [16]. Bu çalışmada ayrıca neem türevlerinin, yararlı bir parazitoid türü olan *Telenomus remus* Nix. (Hym.: Scelionidea)'a olumsuz etkileri olmadığı bildirilmiştir [16].

Azadirachtin etken maddeli neem türevlerinin yumurtlamayı önleyici ve yumurta açılımını engelleyici etkileri birçok farklı böcek türleri üzerinde yapılan çalışmalarla gözlemlenmiştir. Azadirachtinin uygulandığı bitkiler veya diğer ortamlardan *Crociodolomia binotalis* (Lep.: Pryalidae), *S. frugiperda*, *H. armigera*, *Callosobruchus maculatus* (F.), *C. chinensis* (L.) ve *C. analis* (L.) (Col.: Bruchidae) dişilerinin uzaklaştığı ve yumurtlamanın azaldığı saptanmıştır [35-37]. Laboratuvar koşullarında neem tohumu ekstraktları uygulanan Guava (*Psidium guava*) meyvelerine, *Bactrocera dorsalis* (Dipt.: Tephritidae)'in yumurta bırakma davranışında isteksizlik olduğu gözlemlenmiştir [38]. Yapılan çalışmalarda, azadirachtinin preperatlarının *N. lugens*, *S. furcifera*, *N. virescens*, *Leptinoptarsa decemlineta* Say., ve *O. fasciatus* türlerinde yumurta sayılarını önemli oranda azalttığı tespit edilmiştir [29, 39]. *Nasonovia ribisnigri* ve *Myzus persicae* (Hom.: Aphididae) dişilerine 3 gün süreyle %1'lik neem tohum yağı uygulamasına bağlı olarak yumurta açılımlarında kontrole oranla madde konsantrasyonuna paralel azalmalar gözlenmiştir [40].

Bütün bunların yanında neem kökenli bileşiklerin, böceklere toksisitesi, uzaklaştırıcı etkisi ve ürün kayıplarının önlenilmesinde oluşabilen etkisini saptamak amacıyla küçük ölçekli tarla denemeleri de yapılmıştır. Azadirachtin, lahana ve karnabahar gibi sebzeleri *Mamestra brassicae*, *Pieris rapae* ve *Plutella xylostella* gibi Lepidoptera takımına bağlı zararlı türlerin oluşturduğu zararlardan korumuştur. Bununla beraber larvaların aniden ölmediği, bitki üzerinde oldukça az beslendiği veya hiç beslenmediği saptanmıştır [41]. Neem tohum tozu ve neem yağının, *Tribolium confusum* ve *Sitophilus zeamys* üzerinde uzaklaştırıcı etkiye sahip oldukları ve larva ölümlerinden dolayı *T. confusum*'da ergin oluşumunun önemli oranda azaldığı belirtilmiş ve aynı şekilde neem yağı ve azadirachtin ile ilaçlanmış

jüt çuvallarının *Tribolium spp.* ve *Sitophilus spp.* gibi zararlıların depolanmış ürünlere saldırmasını aylarca önlediği saptanmıştır [42].

Son zamanlarda neem türevlerinin ev zararlılarıyla insan hastalıklarını taşıyan vektörlere karşı etkileri konusunda araştırmalar artmıştır. Hamam bcekleriyle yapılan çalışmalar bu konuda oldukça mit vaad eden sonuçlar vermiştir. İnspektisitlere oldukça dayanıklı ve duyarlı *Blattidae germanica* ırklarında azadirachtin, beslenme davranışlarını değiştirerek ve endokrin sistemi dzensizleştirerek etkili olmuştur [43].

Böceğin fizikokimyasal bariyerlerini açıp vücut boşluğu içerisine giren patojen ve parazitler, böceğin kendinden olmayanı algılaması sonucu bağışıklık tepkileriyle karşı karşıya kalmaktadırlar. Böceklerde bağışıklık sistemi humoral bağışıklık ve hücresel bağışıklık olmak üzere iki kısımda ele alınmaktadır [44]. Humoral savunma sürecinde üç tip reaksiyon gerçekleşmektedir. Bunlar melanizasyon, hemolenfin pıhtılaşması ve antimikrobiyal peptidlerin sentezidir [45]. Siyah pigment melanin oluşumu serin proteazlarla aktif formuna dönüşen fenoloksidaz enzimi ile gerçekleşir [46]. İnakatif proenzim profenoloksidaz hemositlerde sentezlenir ve hücrelerin patlamasıyla ortama salındıktan sonra kutiklaya gönderilir veya yaralanma bölgesinin etrafında ya da enkapsüle olmuş parazitlerin etrafında birikir [45]. Aktive olmuş fenoloksidazlar hemolenfte bulunan fenolik substratlardan kinonları oluştururlar ve bu bileşikler gerekli yüzeylerde oligomerleşip melanin olarak birikirler [45]. Melanin oluşumunu sağlamanın yanı sıra ara kinon ürünleri hemolenfin pıhtılaşması sonucu hareketsizleşen mikroorganizmaları öldürebilecek gte sitotoksik maddelerdir. Böcek bağışıklık sistemi ile ilgili çalışan birçok araştırıcı fenoloksidazın pıhtılaşma ve yara iyileştirme sürecinde mükemmel bir enzim olduğunu savunmaktadırlar [47, 48].

Hücresel bağışıklık tepkileri ise fagositoz, enkapsülasyon ve nodül oluşumu gibi savunma mekanizmalarını gerçekleştiren hemositler tarafından oluşturulur [45,49-54]. Böcek hemositleri tip, morfoloji ve sayı olarak türden tre değişiklik gösterir ve tanımlanmalarını kolaylaştırmak amacıyla sınıflandırma şemaları literatürde mevcuttur [52, 54, 55]. Morfolojik, histokimyasal ve fonksiyonel karakterlerine göre, Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattaria, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Collembola gibi çeşitli takımlarda tanımlanan en genel

hemosit tipleri prohemositler, granülositler, plazmatositler, sferülositler ve önositoidlerdir [45, 49, 52, 53, 56].

Prohemositler hemolenfte bulunan en küçük hücrelerdir. Yuvarlak ve oval şekilde olup büyüklükleri 4-12 µm kadardır. Prohemositler sitoplazmayı neredeyse tamamen dolduran, oldukça büyük bir çekirdeğe sahiptirler. Endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve mitokondri gibi organelleri az sayıda olan hücre tipleridir. Sentioller ve aktif mikrotübüller içerdiklerinden bunların aktif mitotik hücreler olduğu ve diğer hemosit tiplerinin öncüleri olduğu savunulmaktadır [44, 54, 57]. Prohemositlerin dolaşımdaki oranları böceğin fizyolojik ve gelişim durumuna göre değişiklik göstermektedir ve bu oran %5 i geçmez [54, 55].

Plazmatositler boyları 3 µm'den 40 µm'ye kadar ulaşabilen ve hemolenfte dolaşım esnasında yuvarlak veya oval şekilli olabilen polimorf hemositlerdir [54, 55, 58, 59]. Farklı böcek türlerinde dolaşımdaki toplam hemositlerin % 30-60'ını oluştururlar [57]. Transmisyon elektron mikroskopunda (TEM) birkaç yalancı ayak, pinositik veziküller, vakuoller ve poliribozomlar gözlenebilir ve golgi aparatı az gelişmiştir [53]. Birçok lepidopter türünde plazmatositler granüllerden yoksundur [53, 60] ancak *G. mellonella*'da bu hücreler granül içerebilir [61]. Yayma preparatlarda inkübasyonu takiben birkaç dakika sonra cam üzerine yapışıp yalancı ayaklar ile yayılabilme ve karakteristik ince ve uzun fibroblast benzeri özellikleriyle diğer hemosit tiplerinden kolayca ayırt edilebilmektedirler [53]. Plazmatositler, fagosite edilemeyecek kadar büyük olan yabancı cisimlerin, bakteri topluluklarının veya nekrotik melanize olmuş materyallerin etrafında kapsüller ve nodüller oluşturabilirler [52, 53].

Granülositler büyüklükleri 4-45 µm arasında değişebilen küresel veya oval hücrelerdir [57]. Granülositlerin en karakteristik özellikleri sitoplazmalarında membrana bağlı çok sayıda granül içermeleri ve küçük bir çekirdeğe sahip olmasıdır [52, 53, 55]. Çekirdek yuvarlak veya uzamış ve merkezi yerleşimlidir [58]. TEM'da ise gelişmiş granüllü endoplazmik retikulumları, birçok pinositik vezikülleri, ince ve uzun yalancı ayakları tespit edilmiştir [53]. Çok sayıda lizozom ve az sayıda mitokondri içerirler [54, 58]. Farklı böcek türlerinde granülositler toplam hemosit sayısının % 30-60'ını ihtiva ederler ve plazmatositlerle birlikte birçok böcek türünde en fazla bulunan hemosit tipidirler [55, 58]. Plazmatositler gibi granülositler de

yabancı yüzeylere yapışma özelliğine sahiptirler ve yara iyileştirme ve bağışıklık tepkilerinde çok önemli rolleri oldukları bilinmektedir [54, 55, 58,]. Granüler hemositlerin en önemli fonksiyonunun fagositoz olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir [60, 62, 63]. Granüler hemositlerin aynı zamanda kapsül / nodül oluşumu sırasında yabancı cisimlerle ilk temas kuran ve granüler içeriğini dışarı veren hücreler olduğu tespit edilmiştir. Birçok araştırmacı, granüler hemosit içeriğinin bu şekilde ekzositozunun plazmatositleri o bölgeye çekmekte iş gördüğünü [53] veya en azından kapsül veya nodül oluşumu sırasında plazmatositlere yardımcı olacağını [64] düşünmektedir.

Önositoidler çapları 54 µm'yi bulan yuvarlak veya oval şekilli oldukça büyük hücrelerdir [55, 57]. Çekirdekleri küçük ve merkezi değildir. Stoplazmaları oldukça kompleks yapıda ve hemositler içerisinde en büyük ebatlara sahip hücrelerdir. TEM görüntülerine göre sitoplazmalarında birçok serbest ribozom içerirler ancak diğer tipik sitoplazmik organelleri az gelişmiştir [53, 54, 65]. Bazı önositoidler çubuk, iğne veya kristal şeklinde sitoplazmik inklüzyonlar içerebilirler. Örneğin *Drosophila*'da inklüzyonların şekli nedeniyle önositoidler kristal hücreler olarak adlandırılırlar [54, 66]. Önositoidler toplam hemosit popülasyonunun % 1-2'sini oluştururlar [55] ve Lepidopterlerde diğer hemosit tiplerine kıyasla en büyük hemositler oldukları belirtilmiştir [54, 58]. Birçok Lepidopter türünde hazırlanan preperatlarda önositoidler oldukça nazik ve in vitroda hemen lizize uğrayan hücreler olarak göze çarpmaktadırlar [67]. Ancak *G. mellonella* önositoidlerinin daha dayanıklı hücreler oldukları bildirilmiştir [55]. Lepidopterlerde bağışıklık sisteminde ve yara iyileştirmede oldukça önemli rol oynayan hemolenfin koyulaşmasından (melanizasyon) sorumlu olan fenoloksidaz enzimi bu hemositlerde mevcuttur [60, 68 - 69]. Ashida ve ark. *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae)'de fenoloksidazın önositoidler içinde sentezlendiğini ve bu hücrelerin parçalanması sırasında plazmaya salındığını tespit etmişlerdir [69].

Sferülositler çapları 5-25 µm arasında değişebilen genellikle yuvarlak veya oval hücrelerdir [54, 58]. Dolaşımında görülme sıklıkları tüm hemosit popülasyonu içinde %5'den azdır [55]. Karakteristik özellikleri sitoplazmalarını tamamen doldurup hücre membranının gerilmesine neden olan 1,5-3 µm çapında sferüller içermeleridir [55]. Sferüllerin histokimyasal analizleri mukopolisakkarit ve

glikomukoprotein içerikte olduklarını göstermektedir [54]. Sitoplâzma aynı zamanda ribozomlar, golgi, lizozomlar, mitokondri ve endoplazmik retikulum içermektedir [57]. Bazı araştırmacılar sferüositlerin ipek üretimi, melanizasyon, fagositoz ve pıhtılaşmanın düzenlenmesinde görev aldıklarını savunsalar da sferüositlerin bağışıklık sistemindeki fonksiyonları henüz net değildir [54, 58, 70].

Böceklerde hücrel savunma reaksiyonlarında hemositler temel olarak fagositoz, nodül oluşumu ve enkapsülasyonda görev almaktadırlar [52, 54, 55, 57]. Bu hücrel savunma tepkilerinde rol alan hemositler plazmatositler ve granüositlerken, önositoidler ise daha önce bahsedildiği gibi melanizasyonda görev alırlar [57].

Fagositoz böceklerde bakteri, mantar ve virüslere karşı hemositler tarafından oluşturulan temel bağışıklık tepkisidir. Plazmatositler ve granüositler fagositozdan sorumlu başlıca hemositlerdir [52, 54].

Fagositozun başlaması, organizmanın dışarıdan vücuda giren yabancı maddeyi algılaması ile başlar [54, 71]. Organizmanın kendinden olmayanı hemositler tarafından algılanması, yabancı organizma üzerindeki peptidoglikan, lipopolisakkarit ve 1.3-glukanlar gibi yüzey moleküllerinin tanınması veya örnek tanıma proteinleri (opsoninler) adı verilen ve fagosite edilecek partikülü hücrel saldırı için işaretleyen proteinler yardımı ile meydana gelmektedir [52]. Yabancı organizmanın tanınmasıyla fagositoz basamakları organizmaya yapışma ile başlar ve organizmanın içeri alınması için sinyal iletiminin başlaması, yabancı ayakların oluşumu, yabancı maddenin içeri alınması ve fagozom denilen veziküller içerisinde ayrıştırılması ile tamamlanır [52]. Bu basamakların gerçekleşmesinin ardından sindirim enzimleri içeren lizozomlar fagozomlarla birleşerek içeri alınan yabancı partiküllerin parçalanmasını sağlarlar [72].

Nodüller, fazla sayıda yabancı partikülün etrafında bulunan, genellikle melanize olmuş nekrotik bir merkeze sahip olan hücre dışı pıhtı ve hemosit agregatlarıdır [54, 55]. Böceklerde nodüller yüksek konsantrasyonlarda cansız maddelere karşı olabildiği gibi bakteri, fungal sporlar, maya hücreleri ve protozoonlara karşı da meydana gelebilmektedir. *G. mellonella* ve *Pieris brassicae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) ile yapılan çalışmalarda yüksek dozlarda bakteri

müdahalesini takiben nodül oluşumunun ilk aşamasının hemosit ve mikroorganizma kümeleri oluşumu olduğu belirtilmiştir [73]. Bakteriyle temasın ardından granülositler içerisinde bulunan granüller şişmeye başlar, hücre dışına göç ederler ve bakterilerin tutunmasını sağlayan yapışkan bir maddeyi hemolenfe bırakırlar. Bu durum bakteri ve hemositlerin hücre dışı matrikste gömülmesini sağlar. Nodül genişledikçe granülositler degranülasyona devam ederler ve nodül sıkılaştıkça yakalanan bakterilerin etrafında melanin birikimi olur. Nodül oluşumu başlamasını takiben 2-4 saat sonra plazmatositler nodülün etrafında toplanmaya başlar. Nodül oluşumu yaklaşık 24 saatte tamamlanır ve nodüllerin etrafı yassılaştırmış plazmatositlerle çevrilmiş olur. Bakteriler ve granülosit kalıntıları içeren melanize olmuş bir merkeze sahip olurlar [57, 73]. Nodül oluşumunda rol alan temel hemositler granülositler ve plazmatositlerdir. Ancak, bazı araştırmacılar melanizasyonda rol oynayan profenoloksidaz içermesi nedeniyle önositoidlerin de nodül oluşumunda rol aldıklarını savunmaktadırlar [74, 75].

Hemosit aracılı enkapsülasyon böcek hemositlerinin kendilerinden daha iri yapıdaki yabancı maddelere karşı oluşturdukları bağışıklık sisteminin en önemli unsurlarından bir tanesidir [54, 76, 77]. Bu tepki yabancı patojenin kendinden olmayan olarak algılanması ve bunun etrafında çok yoğun yassılaştırmış hemosit tabakalarının oluşmasıdır. Bu hemosit tabakalarındaki kısmi veya tam melanizasyon sonucu patojenin öldürülmesi şeklinde tanımlanmaktadır [49].

Enkapsülasyon hemositlerin rastgele hareketlerle veya doğrudan kemotaksisle yabancı maddeyle temas kurmasıyla başlar ve daha sonra granülositler bu yabancı olarak algılanan nesneye tutunarak degranülasyon başlatılır. Degranülasyon sonucu granülositlerden salgılanan granüller yabancı maddeye ve diğer hemositlere tutunur, ardından diğer granülositler ve plazmatositler enkapsülasyonun olduğu bölgeye doğru çekilir. Çekilen plazmatositler kapsül etrafında yassı bir hücre tabakası oluşturur. Hücreler arası boşluklar doldurulup ilk yapışan granüller hücreler parçalanarak kapsülün etrafı ince bir granülosit tabakasıyla kaplar. Son olarak da kapsül melanize olur [52, 78].

Böceklerde immün sistem diğer birçok sistemle ilişkili olmakla birlikte dış ortamdan uygulanan sıcaklık değişimleri, insektisit veya bitkisel kaynaklı uygulamalar gibi çevresel faktörlere karşı oldukça duyarlıdır [79]. Bu nedenle

böceklerde immün fonksiyon, biyopestisitlerin sistemik toksik etkilerinin belirlenmesinde etkili bir biyobelirteç olarak kullanılabilir. Bunun yanında biyopestisit uygulamasına bağlı olarak baskılanacak olan böcek immün sistemi, böceğin hangi evrede enfeksiyona daha açık olacağını göstergesi olabilir. Bu durum mikrobiyal pestisitlerin diğer biyopestisitlerle birlikte kullanılması gereken durumlarda böceğin zayıflatılmış bağışıklık sistemine bağlı olarak zamanlamanın doğru yapılmasına katkı sağlayacaktır. Azadirachtin böcekler üzerinde iyi bilinen tüm etkilerinin yanında böcek bağışıklık sistemini de etkiliyor olabilir. Ancak bu konuda literatürde çok az sayıda çalışma mevcuttur. Yapılan çalışmalar azadirachtinin *Rhodnius prolixus* Stal. (Hemiptera:Reduviidae) [80], *S. litura* [81] ve *S. littoralis* [82] türlerinde humoral ve hücre sel bağışıklık tepkilerini önemli oranda etkilediğini göstermiştir.

Galleria mellonella birçok fizyolojik, immunolojik ve biyokimyasal çalışmalarda kullanılan model bir böcek türüdür [83, 84]. Çalışmamızda model tür olarak kullanılan büyük balmumu güvesi (*G. mellonella*) bal arılarının (*A. mellifera*) ekonomik zararlılarından dır. Arıcılık yapılan, özellikle düşük rakımlı, ılıman iklim bölgelerinde yaygın olarak bulunurlar [85] ve tüm dünyada arıcıların peteklerini onlardan korumada zorluklar yaşadığı önemli bir zararlı olarak tanınmaktadırlar [86].

Sistematikteki Yeri

Alem	: Animalia
Şube	: Arthropoda
Familya	: Insecta
Takım	: Lepidoptera
Üst Familya	: Pyralidea
Alt Familya	: Galleriinae
Cins	: <i>Galleria</i> Fabricius (1798)
Tür	: <i>Galleria mellonella</i> (Linnaeus 1758)

Genellikle depolanan kabartılmış peteklerin orta taban kısmında büyük tüneller açıp yıkıntı ve döküntüler meydana getirerek zararlı olurlar [87] ve bu tahribat peteğin tekrar kullanılma şansını ortadan kaldırmaktadır [88, 89]. Arıcılar, larvaların kovana zarar vermelerini engellemek için genellikle zehirli kimyasallar (pestisitler) kullanmaktadırlar.

Zararlı böceklerle etkin şekilde mücadele için o türün biyolojisi, yayılışı ve zarar şeklinin yanında larval gelişim sürecinin ve larval bağışıklık tepkilerinin bilinmesi de son derece önemlidir. Çünkü kimyasal ve organik insektisitler, böceklerde öncelikle bağışıklık sistemini ve buna bağlı olarak da larval gelişim sürecini etkilemektedir. Bu çalışmada azadirachtinin değişik dozlarının *G. mellonella* son evre larvaları üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. *G. mellonella* son evre larvasına topikal olarak uygulanan azadirachtinin böceğin biyolojik özelliklerine, yumurta verimine ve hücresel bağışıklık tepkilerine etkileri tez kapsamında araştırılmıştır. Bu sayede ele geçen bulguların zararlı böcek mücadelesinde kullanılabilmesi umut edilmektedir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 *G. mellonella* Stok Kültürünün Kurulması

Azadiractinin farklı konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın gelişim biyolojisi ve hemositleri üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmada büyük balmumu güvesi model böcek olarak kullanıldı. *G. mellonella*'nın laboratuvar süksesif kültürlerinin kaynağını, araştırma laboratuvarımızda bulunan ve içinde *G. mellonella*'ya ait larva, pup ve erginlerin bulunduğu çekirdek kültür oluşturdu. Bu larva, pup ve erginler birarada, balsız kuru siyahlaşmış petek içeren, ağzı hava sirkülasyonunu önlemeyecek şekilde bez ile kapatılmış, çeşitli hacimlerdeki cam kavanozlara konuldu. Kavanozlar bireylerin verimli üremelerini sağlamak için fotoperiyot uygulanmayan $30\pm5^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve yaklaşık $\%60\pm5$ nem oranına sahip bir etüv içerisine konularak *G. mellonella* stok kültürü oluşturuldu (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: *G.mellonella* stok kültürü.



Şekil 2.2: Balsız kuru siyahlaşmış petek.

Laboratuvarında süksesif kültürünün devamlılığı için kavanozlara populasyon yoğunluğuna bağlı olarak azalan konak besinini karşılamak için zaman zaman yeterli miktarda balsız kuru siyahlaşmış petek ilave edildi (Şekil 2.2). Süksesif konak kültürlerini kurma işlemine, hem kültürün devamını sağlamak hem de deneylerde kullanılacak son evre larvalarını verecek erginleri elde etmek için deneyler boyunca devam edildi.

2.2 Azadirachtin

Azadirachtin (AZA), *A. indica* A. Juss bitkisinin tohumlarından ekstrakte edilen etkili bir bileşen ve primer yapıya toksik bir maddedir (Şekil 2.3). Azadirachtin etkili maddesine sahip neem ekstraktları, zararlı böcek türlerine karşı uzaklaştırıcı, toksik ve büyüme düzenleyici, yumurtlamayı azaltıcı, beslenme engelleyici etkilere sahiptir. Doğal düşmanlara ve faydalı böceklere karşı toksik etkisi çok azdır. Bilinen mutajenik etkisi yoktur ve dayanıklılık geliştirme daha yavaş olmaktadır. Özellikle bal arısı *A. mellifera*'ya karşı toksitesi oldukça düşük düzeyde olduğu bilinmektedir [14, 40, 90-95].



Şekil 2.3: Azadirachtinin molekül yapısı.

Etken Madde: Azadirachtin

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

Molekül Ağırlığı: 720

Kimyasal Ailesi: Tetranortriperperoids

Çalışmalarımızda kullandığımız NeemAZAL T/S, %1 (10000 ppm Azadirachtin) Trifolio M GmbH isimli Alman şirketi tarafından geliştirilmiş olan ruhsatlı doğal bir insektisittir. Bu çalışmada ticari preparat olan NeemAZAL T/S kullanılmıştır.

2.3 Azadirachtin Dozlarının Belirlenmesi ve Uygulaması

2.3.1 Toksikite

Azadirachtine bağlı olarak *G. mellonella*'da gelişim biyolojisinin nasıl etkilendiğini ve hemositlerdeki değişimi gözleyebilmek için doz aralığı belirleme ön çalışmaları yapıldı. Farklı konsantrasyonlarda azadirachtin uygulamasının *G. mellonella*'da toksik etkisini tespit etmek amacıyla son evre larvalara çeşitli konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 3000 ve 10000 ppm) madde uygulandı. Uygulama neticesinde maddenin puplaşma ve ölüm oranlarını nasıl etkilediği yaklaşık 2 aylık süre boyunca hergün gözlemlendi. Probit ölüm doğrularından yararlanılarak larval ve pupal olmak üzere sırasıyla LD₅₀ ve PD₅₀ değerleri belirlendi. Çalışmalarımızda LD₅₀ ve PD₅₀ değerlerinin hem altında, hem de üstünde olan ppm değerleri uygulandı.

2.3.2 Azadirachtin Uygulaması

7. larval evreye gelen *G. mellonella* bireylerinin; toraks dorsaline mikropipet yardımıyla topikal aplikasyon yöntemi ile farklı konsantrasyonlarda her bir bireye 5 µl azadirachtin uygulaması yapıldı (Şekil 2.4.). Uygulama yapılan bireyler 60x15 mm ölçülerde plastik petrilere alınıp 30±5°C'ye ayarlı (%60±5 nem oranı olan) 12:12 oranlarında fotoperiyot uygulanan bir etüv içerisine kondu.

Kontrol gruplarını da her birine 5 µl saf su uygulanan bireyler ve herhangi bir işleme tabii tutulmayan bireyler oluşturdu.



Şekil 2.4: Topikal aplikasyon.

2.4 Azadirachtinin *G.mellonella*'nın Biyolojisine Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 3000 ve 10000 ppm) azadirachtin uygulanan *G.mellonella* larvaları 60x15 mm ölçülerde plastik petrilere alınıp $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlı (%60 \pm 5 nem oranı olan) 12:12 oranlarında fotoperiyot uygulanan etüv içerisine kondu ve maddenin gelişim biyolojisine etkilerini belirlemek amacıyla 55 gün boyunca hergün için gözlem çizelgeleri tutuldu.

2.4.1 Koza Örme Süresi

Farklı konsantrasyonlardaki azadirachtinin larvaların koza örme süresine etkilerini belirlemek için her gün aynı saatte petrillerdeki günlük değişimler takip edilerek her bireyin koza örme süresi gün olarak belirlendi.

2.4.2 Puplaşma Süresi

Farklı konsantrasyonlardaki azadirachtinin larvaların puplaşma süresine etkilerini belirlemek amacıyla her bir petri için; her gün aynı saatte günlük değişimler takip edildi. Larvaların petriye alındığı andan itibaren pup oluncaya kadar geçen süre gün olarak hesaplandı.

2.4.3 Pupal Periyot

Farklı konsantrasyonlardaki azadirachtinin larvaların pup olarak geçirdiği süreye yani pupal periyota etkilerini belirlemek amacıyla her gün aynı saatte petrilereki günlük değişimler takip edilerek her bireyin pup olduktan sonra ergin birey oluncaya kadar geçen süre, yani pup şeklinde kaldığı süre gün olarak belirlendi.

2.4.4 Ergin Çıkış Süresi

Azadirachtinin ergin çıkış süresi üzerine etkilerini tespit etmek amacıyla petrilere hergün aynı saatte gözlemlendi. Her bireyin madde uygulandıktan sonra ergin birey oluncaya kadar geçirdiği süre gün olarak belirlendi.

2.4.5 Yüzde Puplaşma ve Yüzde Erginleşme

Farklı konsantrasyonlardaki azadirachtinin larvaların puplaşma ve erginleşme yüzdelerine etkilerini belirlemek amacıyla her gün aynı saatte petrilereki günlük değişimler takip edilerek bireylerin pup ve ergin olup olmama durumları belirlendi. Pup olan ve ergin olan bireylerin sayılarına göre yüzde puplaşma ve erginleşme değerleri hesaplandı.

2.4.6 Ergin Yaşam Süresi

Azadirachtin uygulanan larvalardan erginleşenlerin her gün aynı saatte petrillerdeki günlük değişimleri takip edilerek her bireyin ergin olduktan sonra ölümüne kadar geçen süreleri belirlendi.

2.4.7 Toplam Yumurta Sayısı

Azadirachtin uygulanmasından sonra ergin bireyler tespit edildiğinde petri kapakları arasına sargı bezi yerleştirilerek erginlerin bu bezlere yumurta bırakması sağlandı. 100x70mm ölçülere sahip sargı bezleri konulan petrilere 30±5°C sıcaklık, %60±5 nem oranına sahip 12:12 oranlarında fotoperiyot uygulanan etüvlerde muhafaza edildi. Ergin dişilerin bıraktığı yumurtalar birey ölene kadar hergün sayılarak yumurta verimi tespit edildi. Ayrıca muntazam bir şekle sahip (küresel, oval) ve şeffaf olan yumurtalar normal yumurta olarak, şeklinde bozukluk (çöküntü, çıkıntı) gözlemlenen ve koyu lekelenme, renklenme oluşmuş yumurtalar ise bozuk yumurta olarak değerlendirildi.

2.5 Toplam Hemosit Sayıları

G. mellonella'ya azadirachtin uygulamasının toplam hemosit sayısına etkilerinin belirlendiği çalışmalarda 100, 500, 1000, 3000 ve 10000 ppm dozları taze olarak hazırlanıp bekletilmeden larvalara topikal aplikasyon yöntemiyle toraks dorsalinden mikropipet yardımıyla uygulandı (Şekil 2.4). Uygulama yapılan bireyler 60x15 mm ölçülere sahip plastik petrilere alınıp uygulama saatleri dolana kadar 30±5°C sıcaklık %60±5 nem oranına sahip 12:12 oranlarında fotoperiyot uygulanan etüvlerde muhafaza edildi. Azadirachtin uygulamasından 24 ve 48 saat sonrasında larvalardan hemolenf alınıp hemosit sayıları belirlendi.

Kontrol gruplarını herhangi bir işleme tabi tutulmamış bireyler ve saf su uygulanmış larvalar oluşturdu. Deney grupları oluşturulurken her bir doz ve kontrol grupları için 3 tekrar halinde toplam 15'er larva kullanıldı.

Toplam hemosit sayılarının belirlenebilmesi için larvalar birinci arka bacak üzerinden ince uçlu iğne (lanset) ile delindi ve 4 µl hemolenf mikropipiler tüp (Sigma) yardımıyla alındı. Elde edilen hemolenf örneği buz üzerinde bekletilen ve içerisinde 36 µl atikoagulant (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M Na₂EDTA ve 0,041 M Sitrik asit, pH = 4,5) bulunan endorf tüplerine aktarıldı. 1: 10 oranında seyreltilmiş hücre süspansiyonu mikropipet yardımıyla birkaç kez çekilip bırakılmak suretiyle karıştırıldı ve hücre süspansiyonundan 10 µl mikropipet ile çekilerek 0,100 mm derinliğe sahip Neubauer hemositometresine (Improved Neubauer Hemocytometer; Superior, Germany) (Şekil 2.5) yüklendi. Hemositler Olympus BX51 marka mikroskopta sayıldı ve bir mililitre hemolenfteki hemosit sayısı olarak belirlendi.



Şekil 2.5: Neubauer hemositometre lamı.

Neubauer hemositometresi üzerinde iki farklı sayım alanı (Şekil 2.6) bulunan ve bu sayım alanlarının bir çukurlukla birbirinden ayrıldığı sayma lamıdır. Her bir sayım alanında köşelerde dört tane 1 mm²'lik bölümler (büyük kareler) bulunur. Bunlar 16 tane orta büyüklükte kareye ayrılmıştır (1/4 x 1/4 = 1/16 mm²). Ortada bulunan büyük kare ise 25 tane orta büyüklükte kareye ayrılmıştır. Orta büyüklükteki karelerin etrafı çift çizgi ile çevrilmiştir.

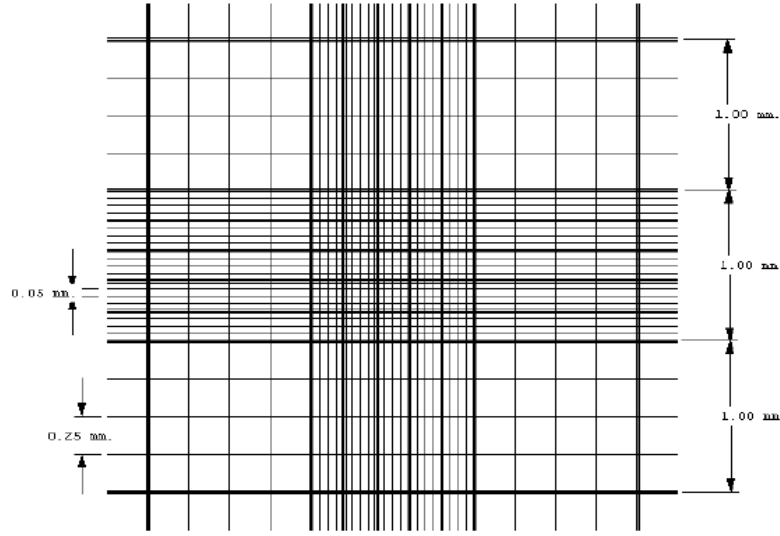
Herbir orta kare de 16 küçük kareye bölünmüştür (Şekil 2.6). Böylece, ortadaki alanda 25 tane orta kare, 400 tane küçük kare vardır. Bir küçük karenin alanı 1/20 x 1/20 = 1/400 mm²'dir. Sayım alanı dışında kalan kenarlar, sayım alanı yüzeyinden 0,1 mm yüksektir. Sayım alanı üzerine hemositometrenin lameli konulunca, lamel ile sayım alanı yüzeyi arasında 0,1 mm'lik bir boşluk kalır. Böylece lam ve lamel arasında kalan her karenin hacmi hesaplanabilir:

En büyük (1mm²'lik) karenin hacmi = 1 X 1 X 0,1 = 0,1 mm³

0,1 mm³ = 0,0001 cm³ = 0,0001 ml'dir.

Deney gruplarımızda hemositometre lamının orta kısmında bulunan, 25 orta büyüklükte kareye ayrılmış ve her bir orta karenin de 16 küçük kareye bölündüğü 1 mm²'lik büyük karenin tamamı sayılarak toplam hemosit sayıları belirlendi. Mililitredeki toplam hemosit sayısının hesaplanması için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

Hücre sayısı / ml = Büyük karede sayılan hücre sayısı x Sulandırma katsayısı x 10⁴



Şekil 2.6: Neubauer hemositometresi sayım alanı.

2.6 Farklı Hemosit Sayıları

Azadirachtinin *G. mellonella*' da farklı hemosit sayılarına etkilerinin belirlendiği çalışmada 100, 1000 ve 3000 ppm dozları larvalara topikal aplikasyon yöntemi ile uygulandı. Bireyler 60x15 mm ölçülere sahip plastik petrilere alınıp uygulama saatleri dolana kadar 30±5°C sıcaklık %60±5 nem oranına sahip 12:12 oranlarında fotoperiyot uygulanan etüvlerde muhafaza edildi.

Doz uygulamasını takiben 24 saat sonrasında yukarıda belirtildiği gibi larvalardan hemolenf alınarak buz üzerinde bekletilen ve içerisinde 20 µl PBS

bulunan endorf tüplerine aktarıldı. 1: 6 oranında seyreltilmiş hücre süspansiyonu mikropipet yardımıyla birkaç kez çekilip bırakılmak suretiyle karıştırıldı ve hücre süspansiyonundan 20 µl mikropipet ile çekilerek önceden alkolle silinen lam üzerine damlatıldı.

Hazırlanan preparatlar nem çemberi içerisine alınarak 30°C ye ayarlı etüv içerisinde 20 dakika bekletildi. Nem çemberinden alınan preparat lamelle kapatılarak Olympus BX51 marka mikroskop altında farklı hemositler sayıldı.

Hiçbir işlem görmeyen bireylerin oluşturduğu kontrol grubu ile saf su uygulanan kontrol grupları ve deney grupları için hazırlanan preparatlarda rastgele beş alan belirlenerek hücre sayıları tespit edildi. Her bir deney üç kez tekrarlandı ve toplamda dokuz birey kullanıldı.

Farklı hemosit sayıları belirlenirken bunun yanında sayım yapılan alanlardaki hemositlerden; yayılma davranışı gösteren, mitotik evrede olan ve melanize olan hücrelerin de sayıları tespit edildi.

2.7 Nodülasyon

G. mellonella'da azadirachtin uygulamasının; böcek bağışıklığının önemli bir unsuru olan hemositlerin nodülasyon davranışlarına etkisi belirlendi. 100, 1000 ve 3000 ppm olarak belirlenen azadirachtin dozları topikal aplikasyon yöntemi ile son evre larvalara uygulandı. Bireyler 60x15 mm ölçülere sahip plastik petrilere alınarak laboratuvar koşullarında (25±5°C sıcaklık, %55±5 nem 12:12 fotoperiyot) 24 saat muhafaza edildi.



Şekil 2.7: Laminarin enjeksiyonu.

24 saat sonunda aynı bireylere insülin iğnesi aracılığıyla, larvanın son ayak çifti altından 10 µl laminarin (sigma) enjekte edildi (Şekil 2.7) ve bireyler yine petrilere alınıp aynı laboratuvar koşullarında bekletildi.

Laminarin enjeksiyonundan 24 saat sonra böcekler stereomikroskop altında disekte (Şekil 2.8) edilerek bireylerin hemolenfi, yağ dokusu veya diğer organlarında gömülmüş olan nodüller tespit edildi (Şekil 2.9). Her bir deney üç kez tekrarlandı ve toplamda 15'er larva kullanıldı.



Şekil 2.8: Diseksiyon.



Şekil 2.9: Nodül sayımı.

2.8 İstatistik

Bütün deney sonuçlarından elde edilen ortalamalar SPSS 18.0 istatistik programında tek yönlü varyans analizleri (ANOVA) ile karşılaştırıldı. Ortalamalar arası farklar Tukey gerçekten anlamlı farklılık (Tukey HSD) testleri ile belirlendi. Veri analizinde SPSS istatistik programı kullanıldı. Yüzde olarak verilen tüm değerler analizlerden önce arcsinüs karekökleri alınarak normalleştirildi ve istatistiksel analizlere tabii tutuldu. Ancak, sonuçlar yüzde olarak sunuldu. Sonuçlar $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

3. BULGULAR

3.1 Zehirlilik Testi

Azadirachtin uygulamasında yaklaşık 2 aylık süre sonunda; deneylerde kullanılacak doz aralığını belirlemek ve LD₅₀ ile PD₅₀ değerlerini hesaplamak için probit analizi kullanıldı. Buna göre azadirachtinin logaritmasına karşı ölen larvaların ve puplaşan bireylerin probit değerleri karşılaştırılarak farklı LD ve PD değerleri hesaplandı (Tablo 3.1 ve 3.2). Probit ölüm doğrularından yararlanılarak larval ve pupal olmak üzere sırasıyla LD₅₀ değeri 16.564 ppm, PD₅₀ değeri ise 73,088 ppm olarak tespit edildi.

Tablo 3. 1: *G. mellonella*'da AZA uygulamasına bağlı LD değerleri.

Uygulanan madde	X ² (sd)	Eğim ± SH	öldürücü Dozlar (ppm) (min.-mak.)	
AZA	50	11.604	1.018± 0.162	LD ₅₀ = 16.564 (4.517 – 46.428)
				LD ₆₀ = 29.376 (9.834 – 95.072)
				LD ₇₀ = 54.226 (19.987 – 231.529)
				LD ₈₀ = 111.112 (40.311 – 746.079)
				LD ₉₀ = 300.493 (93.301 – 4321.345)
LD ₉₉ = 3191.307(541.489–354112.773)				

*(AZA: Azadirachtin ; N: toplam birey sayısı; sd: serbestlik derecesi, y=a+bx)

Tablo 3. 2: *G. mellonella*'da AZA uygulamasına bağlı PD değerleri.

Uygulanan madde	X ² (sd)	Eğim ± SH	öldürücü Dozlar (ppm)(Min.-Mak.)	
AZA	50	22.621	0.926 ± 0.129	PD ₅₀ = 73.088 (12.048 – 408.582)
				PD ₆₀ = 137.270 (29.618 – 1153.562)
				PD ₇₀ = 269.423 (64.809 – 4189.695)
				PD ₈₀ = 593.166(138.016 – 22255.680)
				PD ₉₉ = 23842.527 (2136.498– 1.227 E8)

*(AZA: Azadirachtin ; N: toplam birey sayısı; sd: serbestlik derecesi, y=a+bx)

3.2 Gelişim Biyolojisi

3.2.1 Koza Örme Süresi

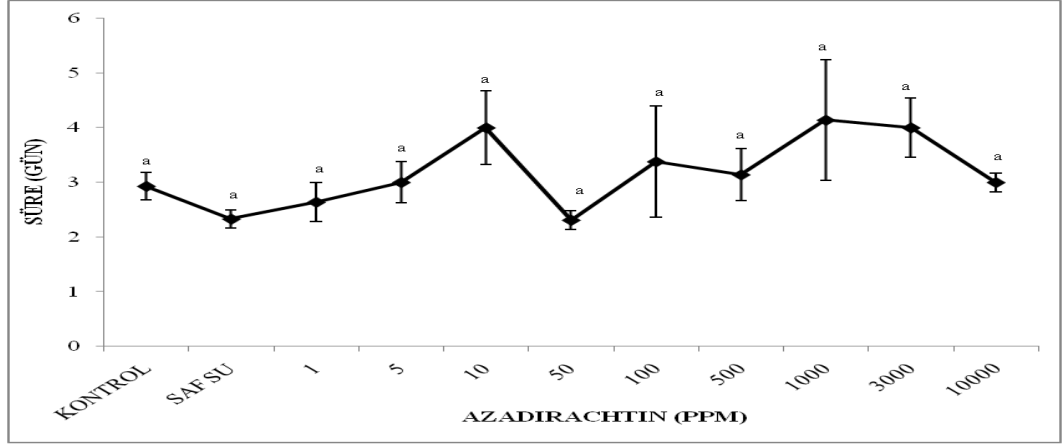
G. mellonella'da farklı konsantrasyonlarda azadirachtin uygulamasının koza örme süresine etkisi Tablo 3.3'de verilmektedir. Koza örme süresinde; kontrol gruplarına göre madde uygulanan gruplardan 1 ve 50 ppm'de azalma gözlemlenirken diğer gruplarda yine kontrol gruplarına göre artmalar olduğu gözlemlendi. Bu artma ve azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı analizlerle belirlendi (Şekil 3.1) (F=1.260; df=10, 134; p= 0.260).

Tablo 3. 3: *G. mellonella*'da AZA'nın koza örme süresine etkisi.

AZA (ppm)	N	Koza Örme Süresi (gün)	
		Min. - Mak.	ORTALAMA±SH*
Kontrol	15	2 – 6	2.93 ± 0.25a
Saf su	15	2 – 4	2.33 ± 0.16a
1	14	2 – 6	2.64 ± 0.36a
5	11	2 – 5	3.00 ± 0.38a
10	14	2 – 10	4.00 ± 0.67a
50	13	2 – 4	2.31 ± 0.17a
100	13	2 – 15	3.38 ± 1.02a
500	14	2 – 7	3.14 ± 0.48a
1000	14	2 – 18	4.14 ± 1.10a
3000	10	2 – 7	4.00 ± 0.54a
10000	12	2 – 4	3.00 ± 0.17a

* Aynı sütunda (a) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

* AZA; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata



Şekil 3.1: Farklı azadirachtin dozlarında koza örme süresinde görülen değişimler.

3.2.2 Puplaşma Süresi

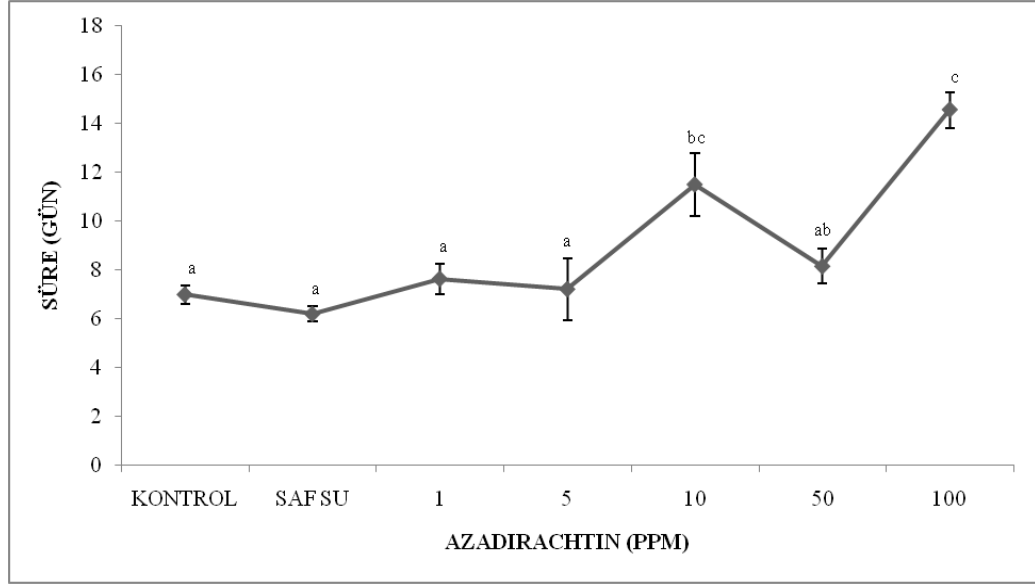
Azadirachtin dozlarının uygulandığı gruplarda (1, 5, 10, 50 ve 100 ppm) ortalama puplaşma süresi sırasıyla 7.64, 7.22, 11.50, 8.15 ve 14.56 olarak hesaplandı (Tablo 3.4). Deney grupları içerisinde puplaşma süresi en kısa kontrol gruplarında, en uzun ise 100 ppm’de görüldü. Kontrol gruplarında puplaşma süresi ortalama 5-10 gün iken madde konsantrasyonu arttıkça bu değerler de yaklaşık 18 güne ulaştı. Puplaşma süresinde meydana gelen bu artmaların istatistiksel değerlendirmeler sonucunda önemli olduğu belirlendi ($F=12.559$; $df=6, 82$; $p=0.000$). Ayrıca deney grupları kendi içinde karşılaştırıldığında 1, 5 ve 50 ppm’e göre 100 ppm’de görülen artma da istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 3.2).

Tablo 3. 4: *G. mellonella*’da AZA’nın puplaşma süresine etkisi.

AZA (ppm)	N	Puplaşma Süresi (gün)	
		Min. - Mak.	ORTALAMA \pm SH*
Kontrol	15	5 – 10	7.00 \pm 0.38a
Saf su	15	4 – 8	6.20 \pm 0.31a
1	14	5 – 14	7.64 \pm 0.63a
5	9	4 – 17	7.22 \pm 1.26a
10	14	4 – 19	11.50 \pm 1.27bc
50	13	4 – 14	8.15 \pm 0.72ab
100	9	12 - 18	14.56 \pm 0.73c

* Aynı sütunda (a-c) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0.05$).

* AZA; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata.



Şekil 3.2: Farklı azadirachtin dozlarında puplaşma süresinde görülen değişimler.

3.2.3 Pupal Periyot

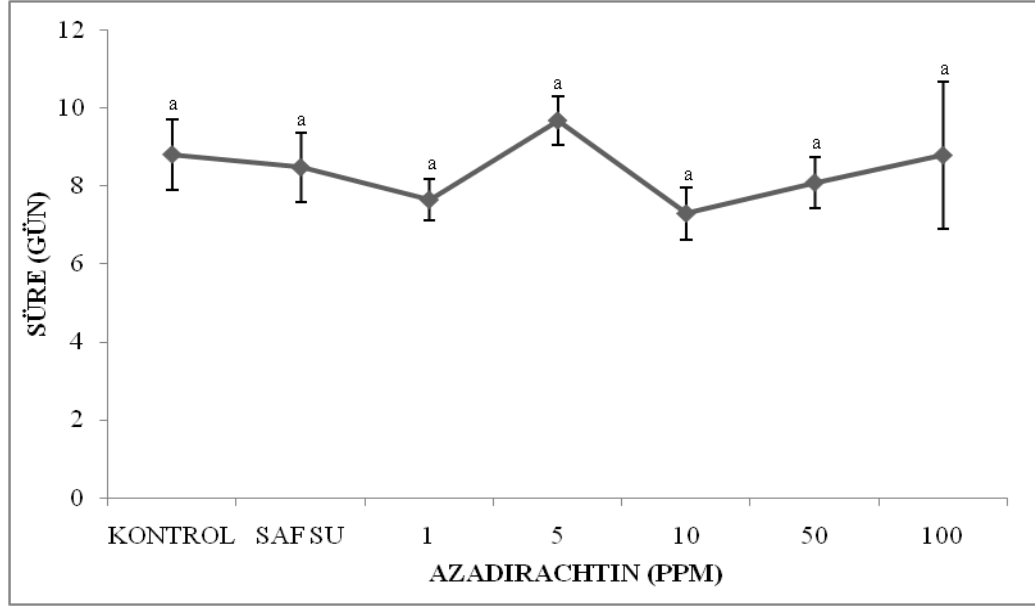
Azadirachtin dozuna bağlı olarak, bireylerin pup olarak kaldığı sürelerde gözlemlenen değişimler Tablo 3.5’de verilmektedir. Deney grupları arasında kontrol gruplarına göre madde uygulanan gruplarda 1, 10 ve 50 ppm de azalma görülürken, 5 ve 100 ppm’de artma olduğu görüldü. Ancak bu artma ve azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı analizler sonucunda belirlendi (Şekil 3.3) ($F=0.737$; $df=6, 82$; $p=0.037$).

Tablo 3. 5: *G. mellonella*’da AZA’nın pupal periyot üzerine etkisi.

AZA (ppm)	N	Pupal Periyot (gün)	
		Min. - Mak.	ORTALAMA \pm SH*
Kontrol	15	1 – 16	8.80 \pm 0.90a
Saf su	15	1 – 17	8.47 \pm 0.88a
1	14	5 – 11	7.64 \pm 0.54a
5	9	6 – 12	9.67 \pm 0.62a
10	14	3 – 13	7.29 \pm 0.67a
50	13	5 – 13	8.08 \pm 0.66a
100	9	3 - 19	8.78 \pm 1.88a

* Aynı sütunda (a) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0.05$).

* AZA; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata.



Şekil 3.3: Farklı azadirachtin dozlarında pupal periyotta görülen değişimler.

3.2.4 Ergin Çıkış Süresi

Azadirachtin dozuna bağlı olarak, ergin çıkış süresinde gözlemlenen değişimler Tablo 3.6'da verilmektedir. Deney grupları içerisinde ortalama ergin çıkış süresi en kısa kontrol grubunda, en uzun ise 100 ppm'de olduğu görüldü.

Farklı azadirachtin dozlarında ergin çıkışı; kontrol gruplarında 7-26 gün arasında sürmekteyken azadirachtin uygulanan deney gruplarında bu süre (1, 5, 10, 50 ve 100 ppm) sırasıyla ortalama 15.29, 16.89, 18.79, 16.23 ve 23.33 güne kadar artma gösterdi.

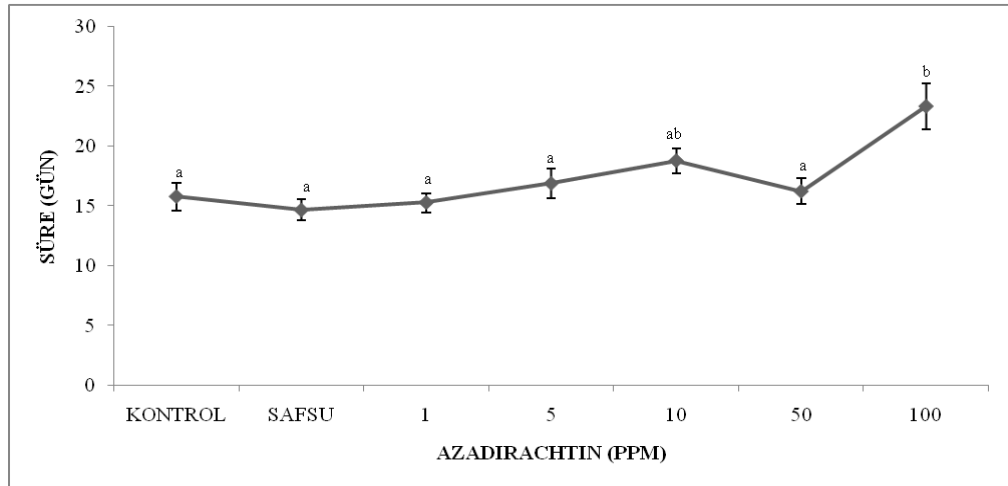
Azadirachtin uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre gözlemlenen bu artmaların istatistiksel olarak da önemli olduğu analizlerle belirlendi ve deney grupları kendi arasında karşılaştırıldığında ise 100 ppm'de görülen artma 1, 5 ve 50 ppm'e göre de anlamlıydı (Şekil 3.4). ($F= 5.789$; $df= 6, 82$; $p = 0.000$).

Tablo 3. 6: *G. mellonella*'da AZA'nın ergin çıkış süresine etkisi.

AZA (ppm)	N	Ergin çıkış süresi (gün)	
		Min. – Mak.	ORTALAMA±SH*
Kontrol	15	7 – 26	15.80 ± 1.16a
Saf su	15	8 – 23	14.67 ± 0.88a
1	14	12 – 22	15.29 ± 0.81a
5	9	13 – 26	16.89 ± 1.25a
10	14	14 – 25	18.79± 1.01ab
50	13	12 – 22	16.23 ± 1.08a
100	9	17 - 34	23.33 ± 1.94b

* Aynı sütunda (a-b) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

* AZA; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata.

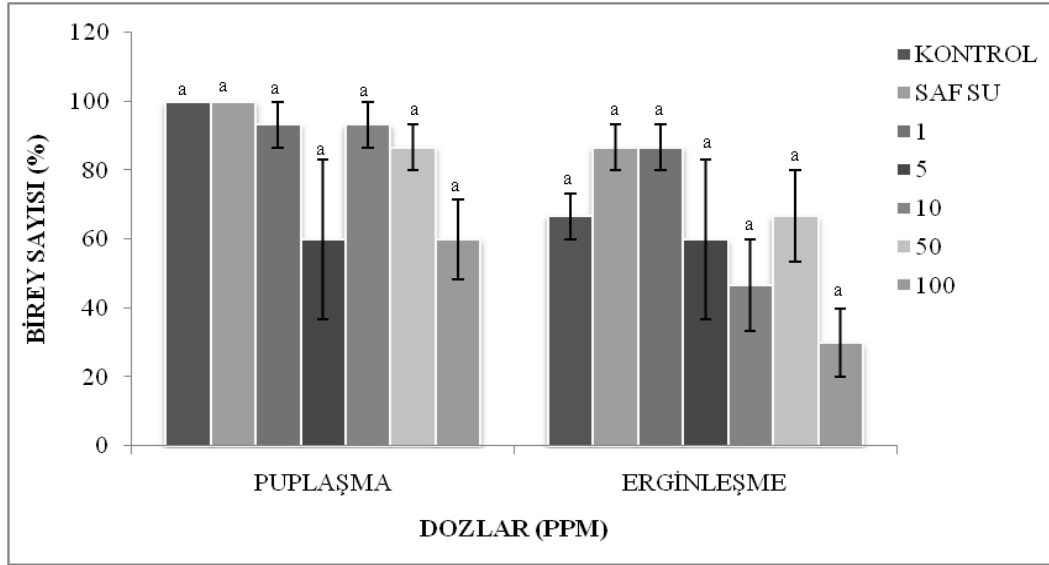


Şekil 3.4: Farklı azadirachtin dozlarında ergin çıkış süresinde görülen değişimler.

3.2.5 Yüzde Pupaşma ve Yüzde Erginleşme

Farklı azadirachtin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'da pupaşma ve erginleşme yüzdeleri üzerine etkileri Tablo 3.7'de verilmektedir. Kontrol gruplarında bütün bireyler pup oluşturdu ancak madde konsantrasyonuna paralel olarak pupaşma oranlarında azalma gözlemlenmiştir. Aynı şekilde erginleşme yüzdeleri tablodan incelendiğinde kontrol gruplarına göre madde konsantrasyonu uygulanan gruplarda

erginleşen birey sayısı azalma gösterdi (Şekil 3.5-3.6). Verilerin istatistiksel analizleri yapıldığında puplaşma ve erginleşme yüzdelerinde oluşan bu azalmalar anlamlı bulunmadı (Puplaşma: $F= 2.740$, $df= 6, 14$, $p= 0.056$; Erginleşme: $F= 1.747$, $df= 6, 13$, $p= 0.188$).



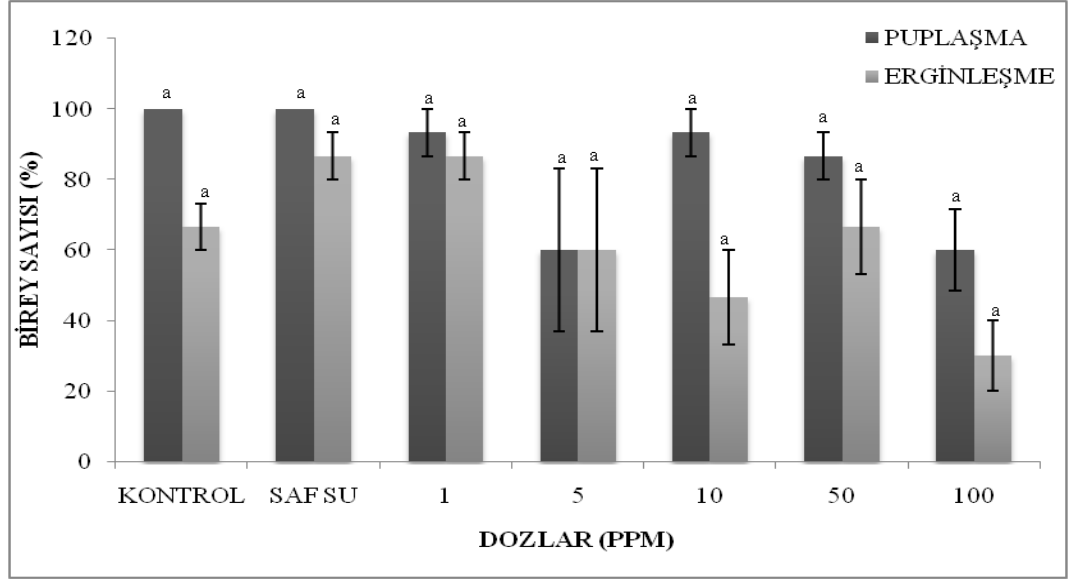
Şekil 3.5: Yüzde puplaşma ve yüzde erginleşme için farklı azadirachtin dozlarının karşılaştırılarak gösterilmesi.

Tablo 3. 7: *G. mellonella*'da AZA'nın puplaşma ve erginleşme yüzdelerine etkisi.

AZA (ppm)	Puplaşma Yüzdesi (%)		Erginleşme Yüzdesi (%)	
	Min. – Mak.	ORTALAMA	Min. – Mak.	ORTALAMA
Kontrol	100 - 100	100a	80 – 100	86.67a
Saf su	100 - 100	100a	80 – 100	86.67a
1	80 - 100	93.33a	80 – 100	86.67a
5	20 - 100	60a	20 – 100	60a
10	80 – 100	93.33a	20 – 60	46.67a
50	80 – 100	86.67a	40 – 80	66.67a
100	40 – 80	60a	20 – 40	30a
500	---	---	---	---
1000	---	---	---	---
3000	---	---	---	---
10000	---	---	---	---

* Aynı sütunda (a) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0.05$).

* AZA; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata.



Şekil 3.6: Farklı azadirachtin dozlarında yüzde puplaşma ve yüzde erginleşmede görülen değişimler.

3.2.6 Ergin Yaşam Süresi

Uygulanan farklı azadirachtin konsantrasyonlarının ergin yaşam uzunluğuna etkileri tablo 3.8’de verilmektedir. Tablo incelendiğinde, kontrol grubunda bireylerin yaşam süresi minimum 3, maksimum 21, ortalama 9.45 gün olduğu görülmektedir.

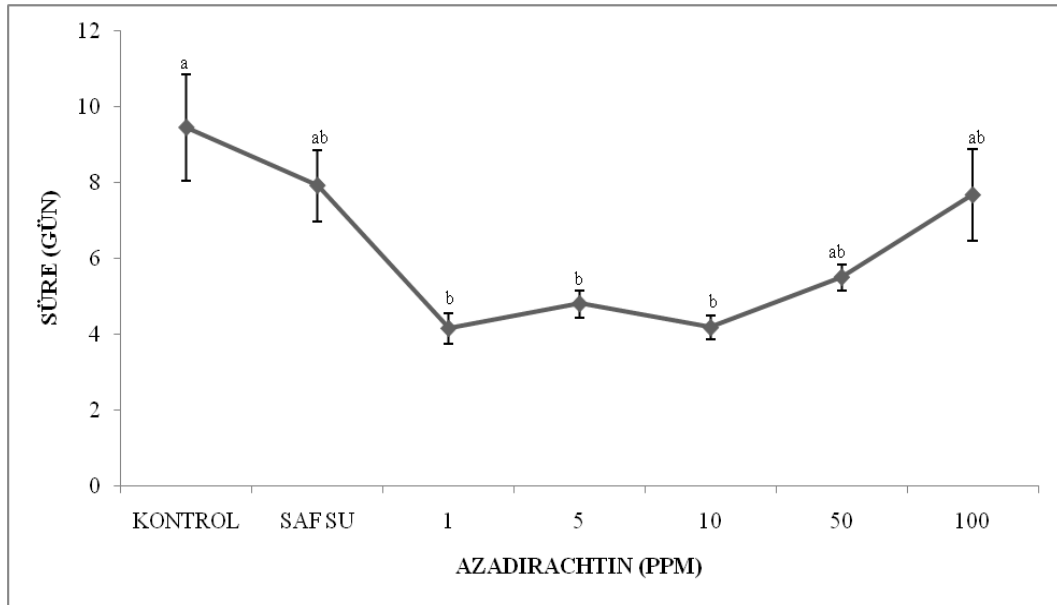
Buna karşılık madde uygulanan gruplardan 1 ppm’de minimum 1, maksimum 7, ortalama 4.15 gün, 5 ppm’de minimum 4, maksimum 7, ortalama 4.80 gün, 10 ppm’de minimum 3, maksimum 5, ortalama 4.17 gün, 50 ppm’de minimum 4, maksimum 7, ortalama 5.50 gün ve 500 ppm’de minimum 6, maksimum 10, ortalama 7.67 gün olduğu görülmektedir (Şekil 3.7).

Kontrol gruplarına göre farklı konsantrasyonlarda madde uygulanan gruplarda ergin yaşam süresinde azalmalar gözlemlendi. İstatistiksel analizlerle kontrol gruplarına göre 1, 5 ve 10 ppm’de görülen azalmaların önemli olduğu belirlendi ($F=6.254$; $df= 6, 59$; $p= 0.000$).

Tablo 3. 8: *G. mellonella*'da AZA'nın ergin yaşam süresine etkisi.

AZA (ppm)	N	Ergin yaşam süresi (gün)	
		Min. - Mak.	ORTALAMA±SH*
Kontrol	11	3 – 21	9.45 ± 1.41a
Saf su	13	3 – 13	7.92 ± 0.94ab
1	13	1 – 7	4.15 ± 0.41b
5	10	4 – 7	4.80 ± 0.36b
10	6	3 – 5	4.17 ± 0.31b
50	10	4 – 7	5.50 ± 0.34ab
100	3	6 - 10	7.67 ± 1.20ab

* Aynı sütunda (a-b) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).
* AZA; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata.



Şekil 3.7: Farklı azadirachtin dozlarında ergin yaşam süresinde görülen değişimler.

3.2.7 Yumurta Sayıları

Farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10 ve 50 ppm) uygulanan azadirachtinin *G. mellonella* bireylerindeki toplam yumurta sayılarında kontrol gruplarına göre azalma

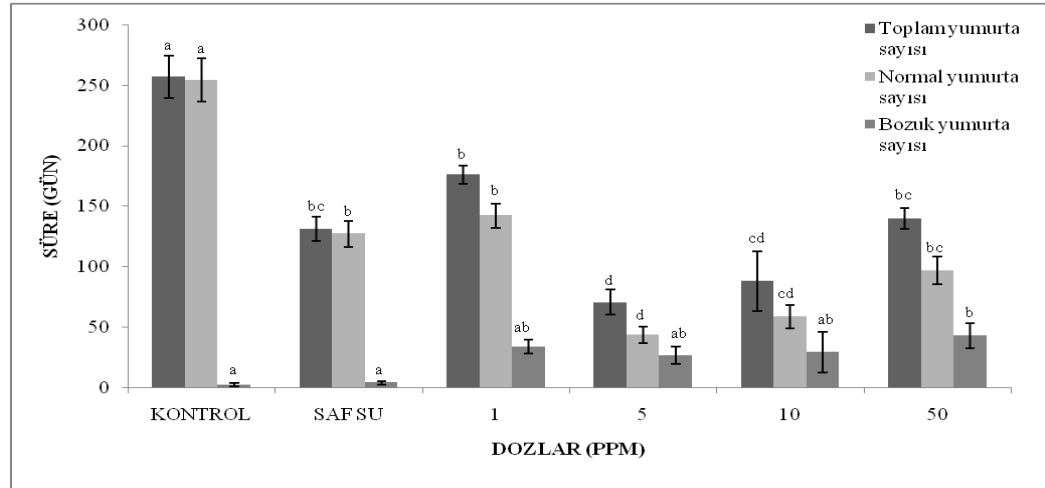
olduğu Tablo 3.9’da açıkça görülmektedir. Kontrol gruplarında ortalama 256,75 olan yumurta sayıları 1 ppm’de 176.00’ya, 5 ppm’de; 70.50’ye, 10 ppm’de; 87.80’e ve 50 ppm’de ise; 139.87’ye kadar düştü (Tablo 3.9 ve 3.11). İstatistiksel analizlerle bu azalmaların önemli olduğu belirlendi (F= 25.690; df=5, 38; p= 0.000) (Şekil 3.8 ve 3.9).

Tablo 3. 9: *G. mellonella*’da AZA’nın toplam yumurta sayılarına etkisi.

AZA (ppm)	N	Toplam Yumurta Sayısı	
		Min. – Mak.	Ortalama ± SH*
Kontrol	8	200 – 318	256.75 ± 17.39a
Saf su	8	96 – 170	131.12 ± 10.14bc
1	9	122 – 198	176.00 ± 7.75b
5	6	41 – 103	70.50 ± 10.36d
10	5	47 – 184	87.80 ± 24.84cd
50	8	109 - 183	139.87 ± 8.65bc

* Aynı sütunda (a-b) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

* AZA; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata.



Şekil 3.8: Farklı azadirachtin dozlarında yumurta sayılarında görülen değişimler.

Yumurta verimi gözlemlerinde, toplam yumurta sayımları yapılırken normal ve bozuk yumurta sayılarında oluşan farklılıklar da Tablo 3.10’da verilmiştir. Kontrol gruplarında normal yumurta sayısı ortalama 254.25 iken bozuk yumurta sayısı ortalama 2.50 kadardı (Tablo 3.11).

Madde konsantrasyonuna bağı olarak bu rakamlar, 1 ppm de normal yumurta sayısı; 142.22, bozuk yumurta sayısı 33.78, 5 ppm de normal yumurta sayısı; 43.66, bozuk yumurta sayısı; 26.83, 10 ppm de normal yumurta sayısı; 58.60, bozuk yumurta sayısı; 29.20 ve 50 ppm de normal yumurta sayısı; 97.00, bozuk yumurta sayısı; 42.88 olarak değişim gösterdi (Tablo 3.10 ve 3.11).

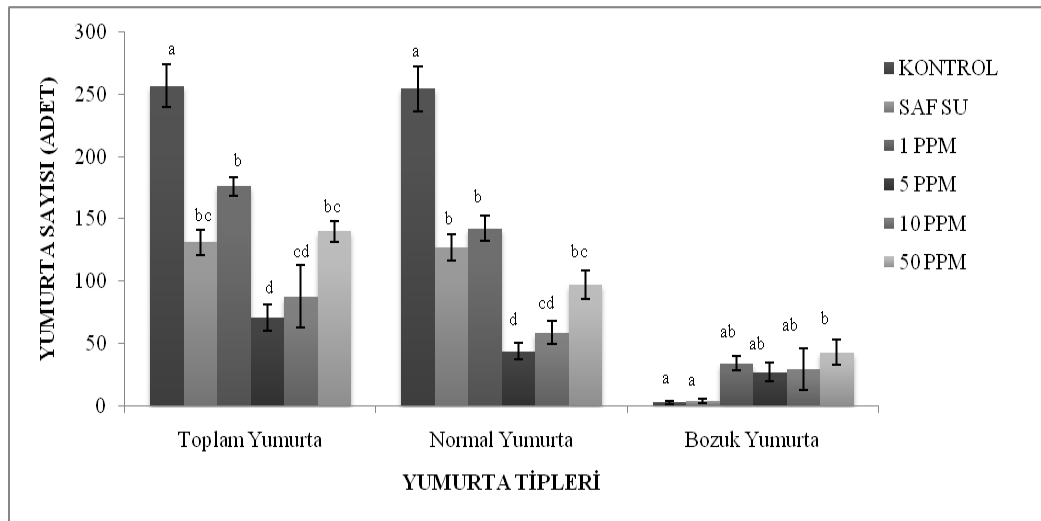
İstatistiksel olarak normal yumurta sayılarında gözlemlenen azalmanın ve bozuk yumurtalarda belirlenen artmanın önemli olduğu analizlerle saptandı (normal yumurta sayısı: $F= 37.116$; $df= 5, 38$; $p= 0.000$, bozuk yumurta sayısı: $F = 5.26$; $df= 5, 38$; $p=0.001$)(Şekil 3.8 ve 3.9).

Tablo 3. 10: *G. mellonella*'da AZA'nın normal ve bozuk yumurta sayılarına etkisi.

AZA(ppm)	N	Normal Yumurta		Bozuk Yumurta	
		Min - Mak	Ortalama± SH*	Min - Mak	Ortalama ± SH*
Kontrol		199 – 318	254.25±17.79a	0 – 11	2.50 ± 1.38a
Saf su		83 – 164	127.12± 10.57b	0 – 13	4.00 ± 1.64a
1		85 – 176	142.22± 10.07b	13 – 67	33.78 ± 5.67ab
5		22 – 64	43.66 ± 6.87d	13 – 63	26.83 ± 7.43ab
10		33 – 91	58.60 ± 9.51cd	4 – 93	29.20± 16.70ab
50		72 - 166	97.00± 11.35bc	0 – 89	42.88 ± 10.10b

*Aynı sütunda (a-d) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0.05$).

*AZA; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata.



Şekil 3.9: Farklı azadirachtin dozlarının yumurta sayıları açısından karşılaştırılarak gösterilmesi.

Tablo 3. 11: *G. mellonella*'da AZA'nın yumurta sayılarına etkisi.

AZA(ppm)	N	Toplam Yumurta Sayısı		Normal yumurta		Bozuk Yumurta sayısı	
		Min. – Mak.	Ortalama ± SH*	Min. – Mak.	Ortalama ± SH*	Min. – Mak.	Ortalama±SH*
Kontrol	8	200 – 318	256.75± 17.39a	199 – 318	254.25± 17.79a	0 – 11	2.50±1.38a
Saf su	8	96 – 170	131.12± 0.14bc	83 – 164	127.12± 10.57b	0 – 13	4.00±1.64a
1	9	122 – 198	176.00 ± 7.75b	85 – 176	142.22± 10.07b	13 – 67	33.78±5.67ab
5	6	41 – 103	70.50 ± 10.36d	22 – 64	43.66 ± 6.87d	13 – 63	26.83±7.43ab
10	5	47 – 184	87.80 ± 24.84cd	33 – 91	58.60 ± 9.51cd	4 – 93	29.20±16.70ab
50	8	109 - 183	139.87± 8.65bc	72 - 166	97.00± 1.35bc	0 – 89	42.88±10.10b

* Aynı sütunda (a-d) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

* AZA; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata.

3.3 Hemosit Sayıları

3.3.1 Toplam Hemosit Sayıları

Yüksek konsantrasyonlarda uygulanan azadirachtinin *G.mellonella*'nın toplam hemosit sayısına etkileri 24 saatlik ve 48 saatlik deney periyodu sonunda belirlenerek Tablo 3.12 ve Şekil 3.10 - 3.11'de gösterilmiştir.

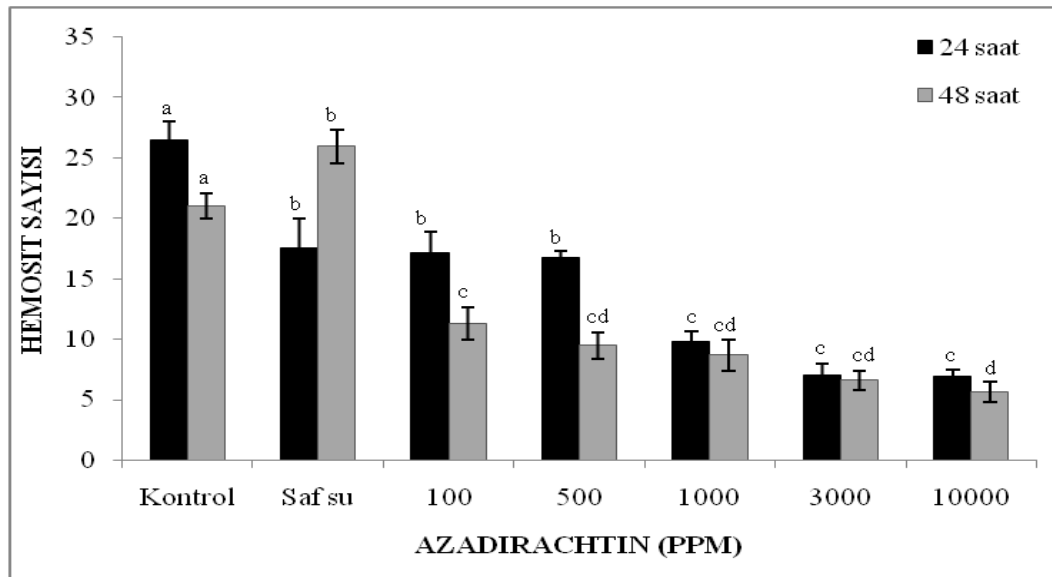
24 saatlik deney periyodu sonunda kontrol grubunda 26.45×10^6 olan toplam hemosit sayısı çözücü olan saf su kontrol grubunda ve denenen tüm konsantrasyonlarda, kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldı (24saat; $F=26.049$, $df=6$, 98 , $p= 0.000$). Bu azalmalar madde konsantrasyon artışına paralel olarak gerçekleşti ve en yüksek konsantrasyonlar olan 3000 ppm ve 10000 ppm de sırasıyla 7.05×10^6 ve 6.92×10^6 olarak belirlendi.

Deney periyodunun 48 saatlik kısmında ise kontrol grubunda 21.05×10^6 olan toplam hemosit sayısı çözücü olan saf su kontrol grubu hariç denenen tüm konsantrasyonlarda, kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldı (48saat; $F=45.808$, $df= 6$, 98 , $p= 0.000$). Yine bu azalmalar madde konsantrasyon artışına paralel olarak gerçekleşti ve en yüksek konsantrasyonlar olan 3000 ppm ve 10000 ppm de sırasıyla 6.61×10^6 ve 5.65×10^6 olarak belirlendi (Tablo 3.12). Yapılan gözlemler sonucu azadirachtinin *G. mellonella*'nın hemolenf viskozitesini özellikle yüksek dozlarda (>500 ppm) azaltığı görüldü. Toplam hemosit sayılarındaki azalma da bu gözlemimizi destekler niteliktedir.

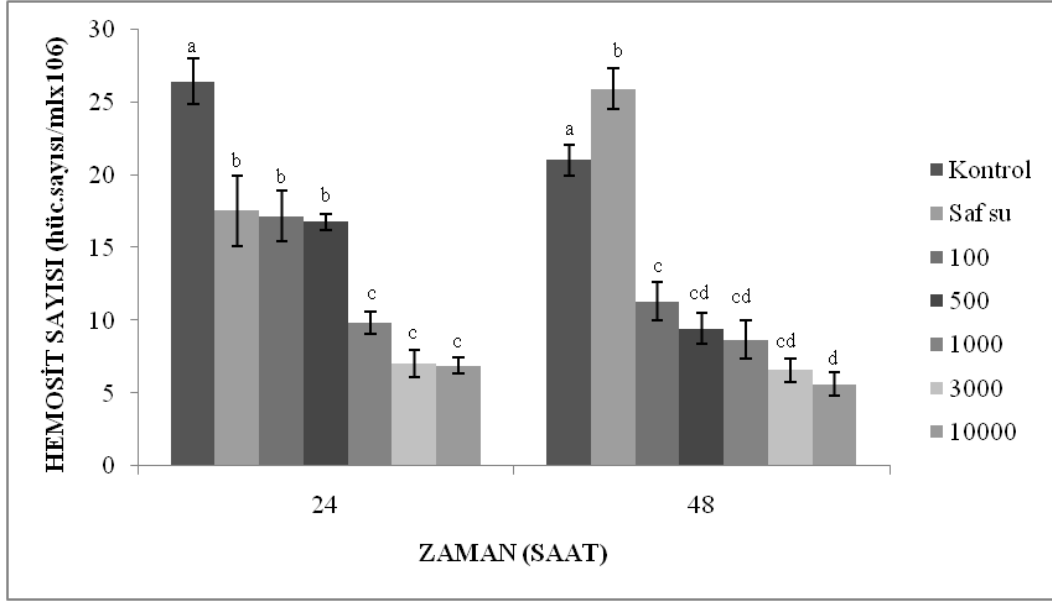
Tablo 3. 12: *G. mellonella*'da AZA'nın toplam hemosit sayısına ($\times 10^6$ hücre/ml) etkisi.

AZA (ppm)	N	Toplam Hemosit Sayıları ($\times 10^6$ hücre/ml)			
		Gözlem Zamanı			
		24 saat		48 saat	
		Min – Mak.	Ortalama \pm SH*	Min-Mak.	Ortalama \pm SH*
Kontrol	5	10.80– 32.80	26.45 \pm 1.55a	12.90–29.60	21.05 \pm 1.07a
Saf su	5	8.30 – 39.60	17.56 \pm 2.42b	19.00–37.30	25.95 \pm 1.43b
100	5	9.81 – 27.50	17.18 \pm 1.72b	3.10–21.00	11.33 \pm 1.35c
500	5	13.20– 19.80	16.79 \pm 0.57b	3.90–18.70	9.47 \pm 1.09cd
1000	5	4.30 – 15.40	9.84 \pm 0.79c	2.90–20.20	8.69 \pm 1.30cd
3000	5	3.16 – 15.10	7.05 \pm 0.96c	2.80–11.90	6.61 \pm 0.80cd
10000	5	2.85 – 10.30	6.92 \pm 0.57c	2.30–12.80	5.65 \pm 0.81d

*Aynı sütunda (a-d) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0.05$).
*AZA; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata.



Şekil 3.10: Farklı azadirachtin dozlarında toplam hemosit sayılarında zamana bağlı görülen değişimler.



Şekil 3.11: 24 ve 48 saat için farklı azadirachtin dozlarının toplam hemosit sayıları açısından karşılaştırılarak gösterilmesi.

3.3.2 Farklı Hemosit Sayılarına Etkileri

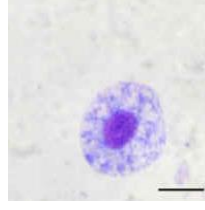
G. mellonella'da larval hemosit tipleri morfolojik olarak granülositler, plazmatositler, sfrülositler, önositoidler ve prohemositler olarak sınıflandırıldı. Azadirachtin uygulamasının larvalarda farklı hemosit tiplerine etkilerinin belirlendiği çalışmalarda tüm hemosit tipleri ayrı olarak sayıldı.

3.3.2.1 Granülosit Sayısına Etkisi

Tablo 3.13 ve 3.14'e bakıldığında hiçbir işleme tabi tutulmayan ve saf su uygulanmış *G. mellonella* larvalarında en yoğun bulunan hücre tipleri granülositler (Şekil 3.12) ve onu takiben ikinci yoğun hücre tipi plazmatositler (Şekil 3.14) olarak belirlendi.

Farklı hemosit sayılarak belirlenen hücrelerde granülosit sayıları kontrol grubunda %68.09, saf su kontrol grubunda %50.59, 100 ppm'de %58.92, 1000 ppm'de %71.69 ve 3000 ppm olan en yüksek dozda %65.04 olarak sayıldı (Tablo 3.13). Yüzde oranları göz önüne alındığında kontrol grubuna göre diğer dozlarda

artmalar gözlemlendi (Şekil 3.13). İstatistiksel analizlerle bu artmaların önemli olduğu belirlendi (F=20.374 , df= 4, 40 , p= 0.000).

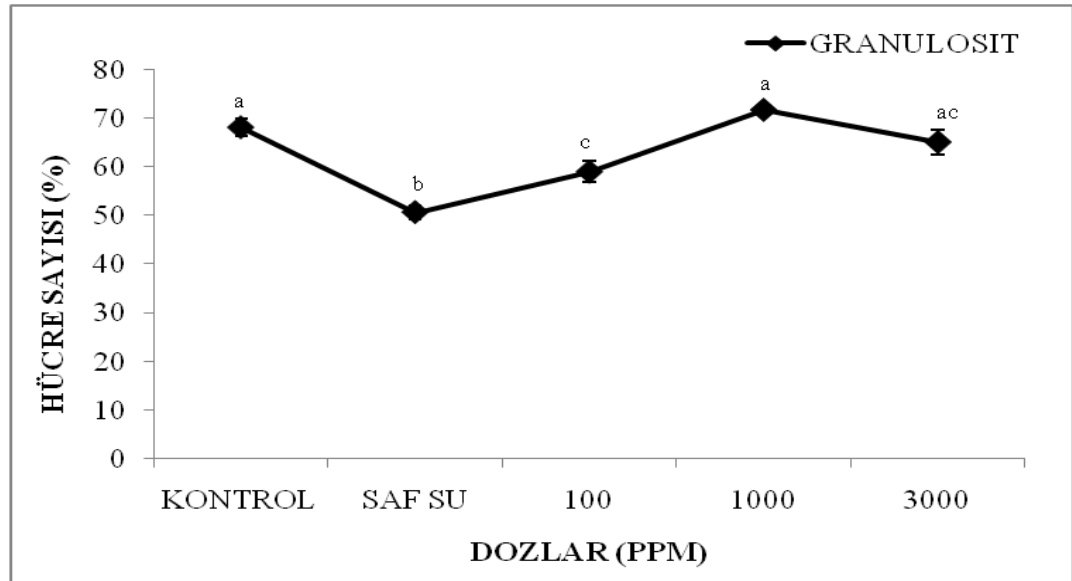


Şekil 3.12: Granülosit'in mikroskop görüntüsü.

Tablo 3. 13: *G. mellonella*'da AZA'nın granülosit sayılarına etkisi.

AZA (ppm)	N	Granülosit Sayısı(%)	
		Min. – Mak.	ORTALAMA
Kontrol	9	63.82 – 72.35	68.09a
Saf su	9	47.64 – 53.70	50.59b
100	9	53.90 – 63.93	58.92c
1000	9	69.94 – 73.43	71.69a
3000	9	59.31 – 70.76	65.04ac

*Aynı sütunda (a-c) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).
*AZA; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata.

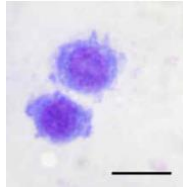


Şekil 3.13: Farklı azadirachtin dozlarında granulosit sayılarında görülen değişimler.

3.3.2.2 Plazmatosit Sayısına Etkisi

Hücre sayımlarında en yoğun bulunan bir diğer hücre tipide plazmatositlerdir (Şekil 3.14). Farklı hemosit sayılarak belirlenen hücrelerde plazmatosit sayıları kontrol grubunda; %30.55, saf su kontrol grubunda; %48.65, 100 ppm’de; %40.60, 1000 ppm’de %27.52 ve 3000 ppm olan en yüksek dozda %34.01 olarak sayıldı (Tablo 3.14).

Yüzde oranları göz önüne alındığında kontrol grubuna göre diğer dozlarda önemli ölçüde artmalar gözlemlendi (Şekil 3.15). Yapılan istatistiksel analizlerle bu artmaların önemli olduğu belirlendi ($F= 20.751$, $df= 4, 40$, $p= 0.000$).



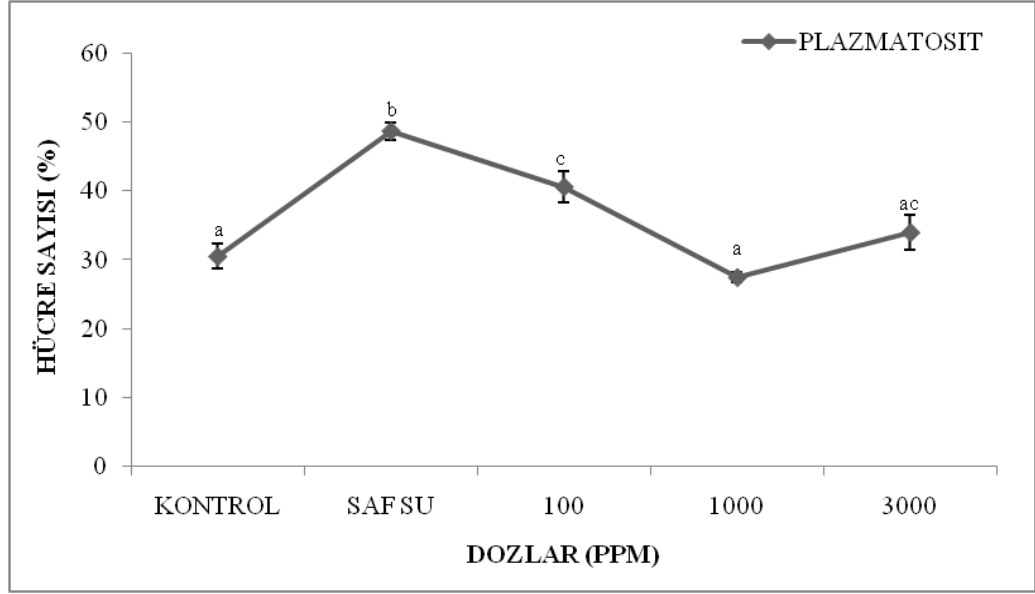
Şekil 3.14: Plazmatosit’in mikroskop görüntüsü.

Tablo 3. 14: *G. mellonella*’da AZA’nın plazmatosit sayılarına etkisi.

AZA (ppm)	N	Plazmatosit Sayısı(%)	
		Min. – Mak.	ORTALAMA
Kontrol	9	26.30– 34.78	30.55a
Saf su	9	45.62 – 51.67	48.65b
100	9	35.27 – 45.91	40.60c
1000	9	25.75 – 29.27	27.52a
3000	9	28.33 – 39.68	34.01ac

* Aynı sütunda (a-c) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0.05$).

* AZA; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata.



Şekil 3.15: Farklı azadirachtin dozlarında plazmatosit sayılarında görülen değişimler.

3.3.2.3 Önositoid Sayısına Etkisi

Farklı hemositler sayılarak belirlenen hücrelerde önositoid (Şekil 3.16) sayıları kontrol grubunda; %0.62, saf su kontrol grubunda; %0.35, 100 ppm'de; %0.20, 1000 ppm'de %0.23 ve 3000 ppm olan en yüksek dozda %0.52 olarak sayıldı (Tablo 3.15).

Yüzde oranları göz önüne alındığında kontrol grubuna göre diğer dozlarda azalmalar ve artmalar gözlemlendi (Şekil 3.17). Ancak yapılan istatistiksel analizlerle bu artma ve azalmaların önemli olmadığı belirlendi ($F= 2.032$, $df= 4, 40$, $p= 0.108$).



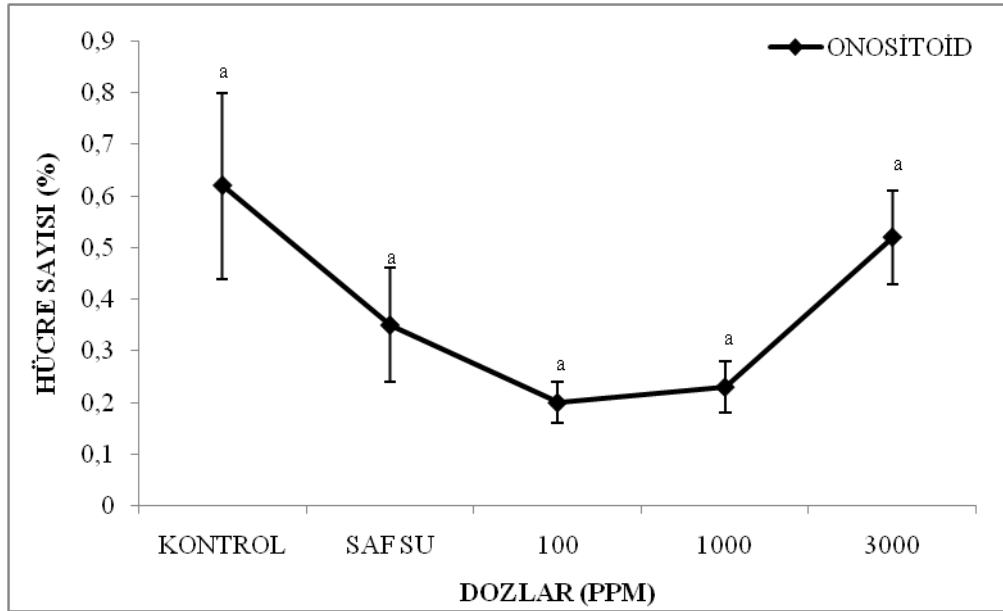
Şekil 3.16: Önositoid'in mikroskop görüntüsü.

Tablo 3. 15: *G. mellonella*'da AZA'nın önositoid sayılarına etkisi.

AZA (ppm)	N	Önositoid Sayısı(%)	
		Min. – Mak.	ORTALAMA
Kontrol	9	0.21 – 1.02	0.62a
Saf su	9	0.10 – 0.60	0.35a
100	9	0.10 – 0.29	0.20a
1000	9	0.11 – 0.35	0.23a
3000	9	0.32 - 0.72	0.52a

*Aynı sütunda (a) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0.05$).

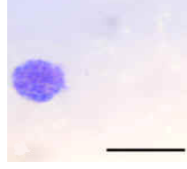
*AZA; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm), SH; Standart Hata.



Şekil 3.17: Farklı azadirachtin dozlarında önositoid sayılarında görülen değişimler.

3.3.2.4 Prohemosit Sayısına Etkisi

Farklı hemositler sayılarak belirlenen hücrelerde prohemosit (Şekil 3.18) sayıları kontrol grubunda; %0.72, saf su kontrol grubunda; %0.39, 100 ppm'de; %0.60, 1000 ppm'de %0.55 ve 3000 ppm olan en yüksek dozda %0.41 olarak sayıldı (Tablo 3.16). Yüzde oranları göz önüne alındığında kontrol gruplarına göre diğer dozlarda artmalar ve azalmalar olduğu gözlemlendi (Şekil 3.19). Ancak yapılan istatistiksel analizlerle bu artma ve azalmaların önemli olmadığı belirlendi ($F=0.748$, $df=4, 40$, $p=0.565$).



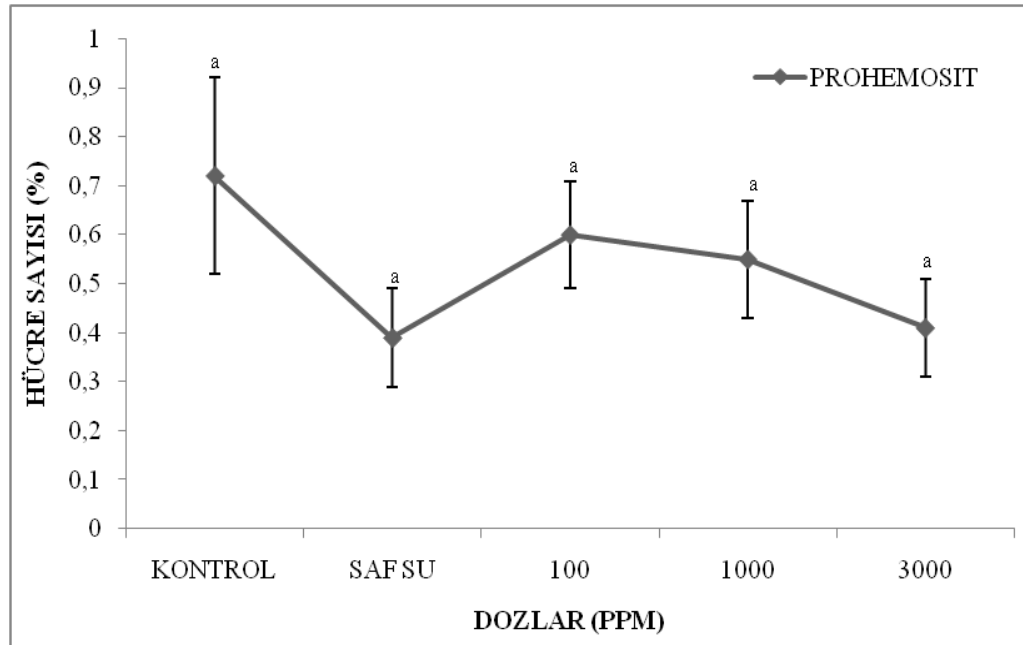
Şekil 3.18: Prohemosit'in mikroskop görüntüsü.

Tablo 3. 16: *G. mellonella*'da AZA'nın prohemosit sayılarına etkisi.

AZA (ppm)	N	Prohemosit Sayısı(%)	
		Min. – Mak.	ORTALAMA
Kontrol	9	0.26 – 1.18	0.72a
Saf su	9	0.15 – 0.63	0.39a
100	9	0.34 – 0.86	0.60a
1000	9	0.28 – 0.81	0.55a
3000	9	0.17 – 0.64	0.41a

* Aynı sütunda (a-c) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($P > 0,05$).

* Aza-A; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm).



Şekil 3.19: Farklı azadirachtin dozlarında prohemosit sayılarında görülen değişimler.

3.3.2.5 Hemositlerin Yayılma Davranışı

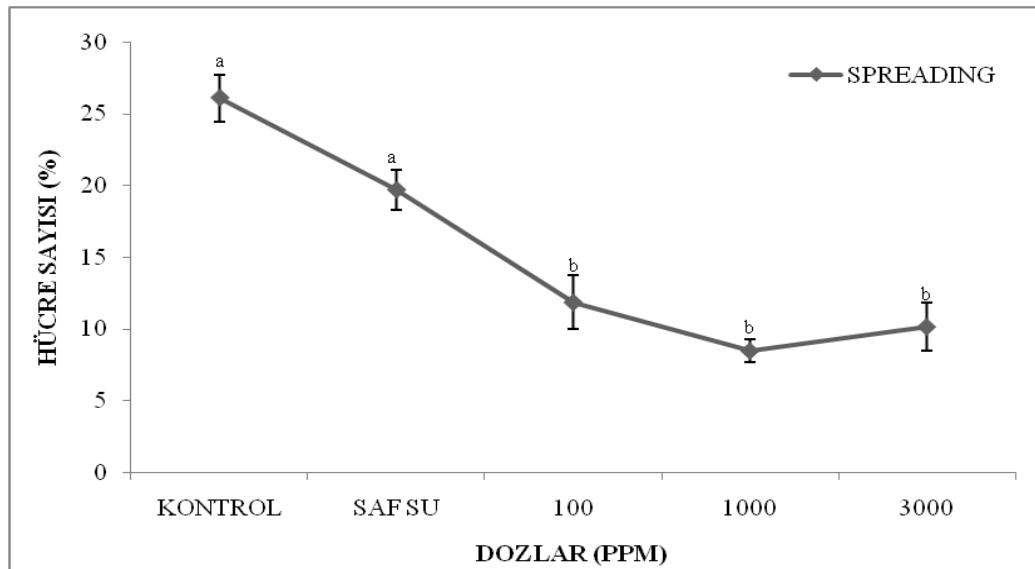
Farklı hemositler sayılırken hücrelerden spreading olan hücrelerin sayıları da belirlendi. Spread olan hücre sayıları kontrol grubunda ortalama; %26.10, saf su kontrol grubunda %19.70, 100 ppm'de %11.87, 1000 ppm'de %8.49 ve 3000 ppm olan en yüksek dozda %10.17 olarak sayıldı. Tablo 3.17'de de görüldüğü gibi yüzde oranları göz önüne alındığında; hiçbir işlem görmemiş bireylerin oluşturduğu kontrol grubuna ve sadece çözücü uygulanmış saf su kontrol grubuna göre diğer dozlarda önemli ölçüde azalma gözlemlendi (Şekil 3.20) ($F= 20.689$, $df= 4, 40$, $p= 0.000$).

Tablo 3. 17: *G. mellonella*'da AZA'nın hemositlerdeki spreading sayılarına etkisi.

AZA (ppm)	N	Spreading Sayısı(%)	
		Min. – Mak.	ORTALAMA
Kontrol	9	22.37 – 29.82	26.10a
Saf su	9	16.54 – 22.85	19.70a
100	9	7.59 – 16.13	11.87b
1000	9	6.58 – 10.39	8.49b
3000	9	6.34 – 14.00	10.17b

* Aynı sütunda (a-b) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0,05$).

* Aza-A; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm).



Şekil 3.20: Farklı azadirachtin dozlarında spread hücre sayılarında görülen değişimler.

3.3.2.6 Hemositlerin Melanizasyonu

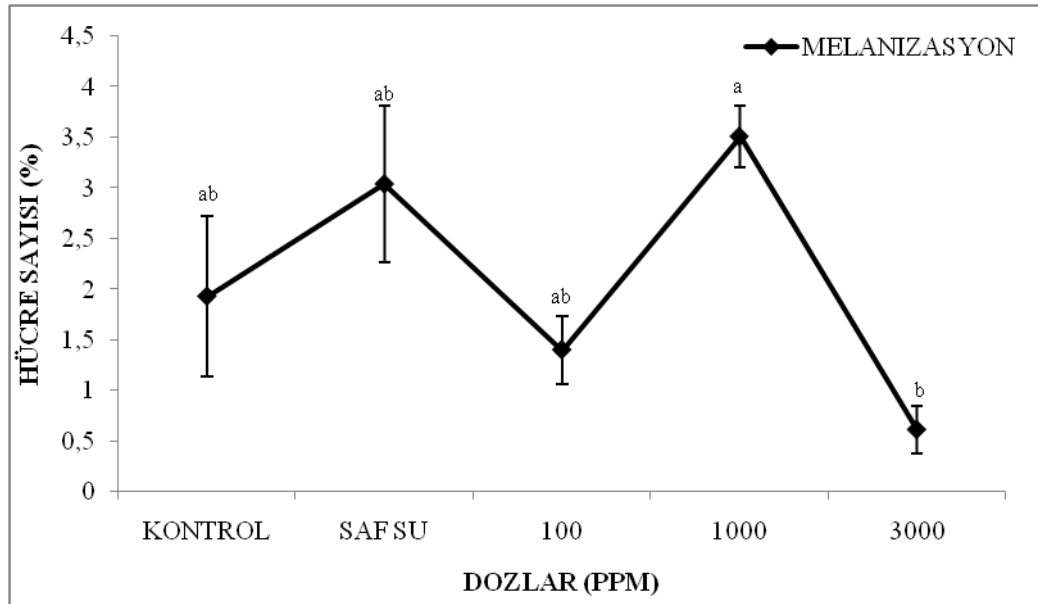
Farklı hemositler sayılarak belirlenen hücrelerde melanizasyona uğramış olan hücre sayıları kontrol grubunda ortalama; %1.93, saf su kontrol grubunda; %3.04, 100 ppm'de; %1.40, 1000 ppm'de %3.51 ve 3000 ppm olan en yüksek dozda %0.61 olarak sayıldı. Tablo 3.18 ve Şekil 3.21'ye bakıldığında kontrol grubuna göre diğer dozlarda azalmalar ve artmalar gözlemlendi. Yapılan istatistiksel analizlerle bu artma ve azalmaların önemli olmadığı belirlendi ($F= 4.189$, $df= 4, 40$, $p= 0.006$).

Tablo 3. 18: *G. mellonella*'da AZA'nın hemositlerdeki melanizasyona etkisi.

AZA (ppm)	N	Po ⁺ Sayısı(%)	
		Min. – Mak.	ORTALAMA
Kontrol	9	0.11 – 3.74	1.93ab
Saf su	9	1.26 – 4.82	3.04ab
100	9	0.62 – 2.17	1.40ab
1000	9	2.79 – 4.23	3.51a
3000	9	0.07 - 1.15	0.61b

* Aynı sütunda (a-b) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0,05$).

* Aza-A; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm).



Şekil 3.21: Farklı azadirachtin dozlarında melanizasyona uğramış hücre sayılarında görülen değişimler.

3.3.2.7 Hemositlerde Mitotik İndeks

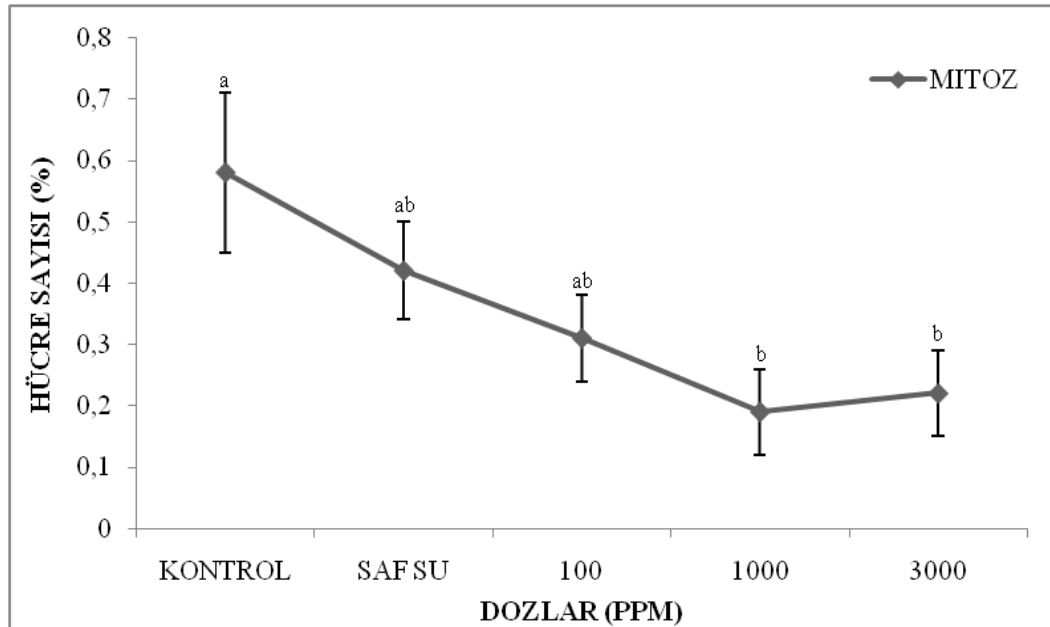
Farklı hemositler sayılarak belirlenen hücrelerde mitoz bölünme safhasında olan hücre sayıları kontrol grubunda ortalama; %0.58, saf su kontrol grubunda; %0.42, 100 ppm'de; %0.31, 1000 ppm'de %0.19 ve 3000 ppm olan en yüksek dozda %0.22 olarak sayıldı. Tablo 3.19 ve Şekil 3.22'e bakıldığında kontrol grubuna göre diğer dozlarda azalmalar olduğu görülmektedir. Ancak yapılan istatistiksel analizlerle bu azalmaların önemli olmadığı belirlendi ($F=3.602$, $df= 4, 40$, $p= 0.013$).

Tablo 3. 19: *G. mellonella*'da AZA'nın hemositlerdeki mitoz sayılarına etkisi.

AZA (ppm)	N	Mitoz Sayısı(%)	
		Min. – Mak.	ORTALAMA
Kontrol	9	0.28 – 0.87	0.58a
Saf su	9	0.24 – 0.60	0.42ab
100	9	0.15 – 0.46	0.31ab
1000	9	0.27 – 0.35	0.19b
3000	9	0.05 – 0.37	0.22b

* Aynı sütunda (a-b) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0,05$).

* Aza-A; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm).



Şekil 3.22: Farklı azadirachtin dozlarında mitoz safhasında olan hücre sayılarında görülen değişimler.

3.4 Nodülasyon

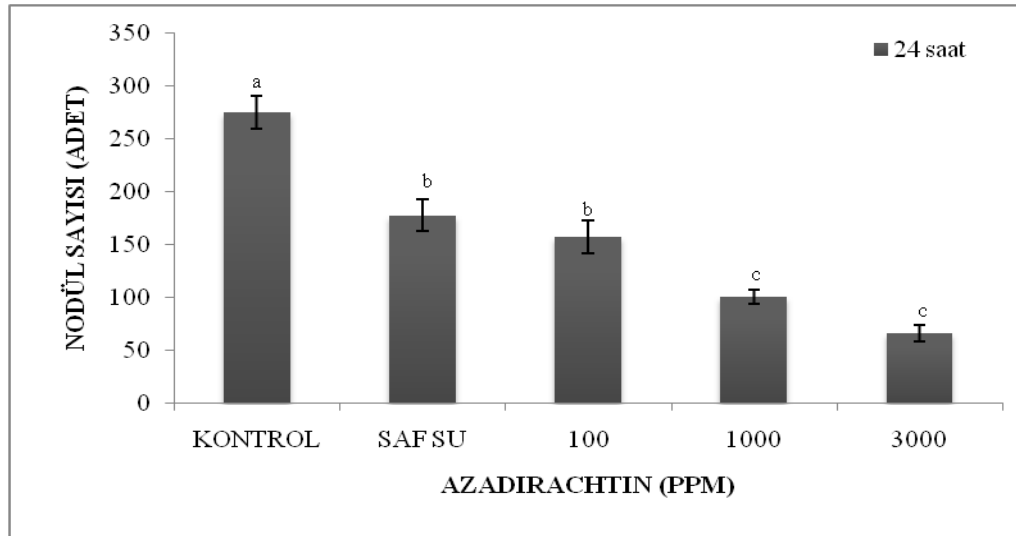
Laminarin enjeksiyonunu takiben *G. mellonella* bireylerine yüksek konsantrasyonlarda uygulanan azadirachtin maddesinin, bireylerin vücut boşluğunda oluşan nodül sayılarını nasıl etkilediği Tablo 3.20 görülmektedir. 24 saatlik deney periyodu sonunda; kontrol grubunda ortalama 274.67 olan nodul sayısı çözücü olan saf su kontrol grubunda ve madde uygulanan tüm konsantrasyonlarda, kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalma gösterdi ($F= 40.053$, $df= 4, 70$, $p= 0.000$). Bu azalmalar, saf su kontrol grubunda ortalama; 177.20, 100 ppm de; 156.80, 1000 ppm de; 100.13 ve 3000 ppm de 65.93 olarak gerçekleşti. Deney druplar kendi içerisinde karşılaştırıldığında 100 ppm'e göre 1000 ve 3000 ppm'de görülen azalma da istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 3.23).

Tablo 3. 20: *G. mellonella*'da AZA'nın nodül oluşumuna etkisi.

AZA (ppm)	N	Nodülasyon	
		Min. – Mak.	ORTALAMA±SH*
Kontrol	15	212 – 391	274.67 ± 15.47a
Saf su	15	116 – 315	177.20 ± 15.08b
100	15	28 – 291	156.80 ± 15.50b
1000	15	21 – 127	100.13 ± 6.39c
3000	15	27 - 145	65.93 ± 7.49c

*Aynı sütunda (a-c) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0,05$).

*Aza-A; Azadirachtin konsantrasyonu (ppm).



Şekil 3.23: Farklı azadirachtin dozlarında nodül oluşumunda görülen değişimler.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde zararlılarla mücadelede sentetik pestisitlerin kullanılmasının çevre ve insan sağlığı açısından tehlikeli oluşturduğu kanısına varıldığından beri, bu kimyasal maddelere alternatif olabilecek bitkisel kaynaklı doğal bileşiklerin kullanımını önemle üzerinde durulan bir konu haline gelmiştir. Çünkü bu bileşikler hedef olmayan organizmalara zarar vermemekte ve kısa sürede çözünerek doğada birikmeye sebep olmamaktadırlar. Bu durum dolayısıyla çevre üzerinde olumsuz etki oluşturmasını da engellemektedir. Bu doğal pestisitlerden en önemlisi *A. indica* bitkisinden elde edilen ve zararlı böceklerle mücadelede kullanılan azadirachtin'dir. Günümüze kadar yapılan çalışmalardan da oldukça umut vaat eden sonuçlar elde edilmiştir.

Toksik maddelerin hayvanlarda, sistemik ve hücresel işlev bozukluklarına neden olduğu ve birçok biyokimyasal değişiklikleri uyardığı bilinmektedir [96, 97]. Azadirachtin, bazı böcek türleri için beslenmeyi önleyici etkiye sahiptir. Bazı arthropodlar ve birçok böcek türü için ise büyüme durdurucu özellik göstermektedir [98]. Ayrıca bu çalışmalara ek olarak 5. larval evredeki *S. litura* ile yapılan çalışmalarda maddenin duyarsızlığa da neden olduğu bilinmektedir [99]. Bir çok böcek türünde azadirachtinin beslenmeyi engelleyici ve uzaklaştırıcı etkisi araştırılmış, *S. littoralis*'in sentetik besinine eklenen azadirachtinin besin alımında azalmalar meydana getirdiği ve larvaların normal besine alındıktan sonra bile etkinin devam ettiği gözlemlenmiştir [100]. Ayrıca azadirachtinin beslenme engelleyici etkisi *Thaumetopoea pityocampa* (Schiff) larvalarında ve *Diabrotica speciosa* üzerinde rapor edilmiştir [101, 102].

Böceklerde gelişim sürecinde hormonların salgılanmasının kontrolü, çevresel uyarıların sinir sistemi ve endokrin sistemi üzerindeki etkileri ile gerçekleşmektedir. Böceklerde ecdysis ve başkalaşım, ecdizon hormonu ve juvenil hormon tarafından kontrol edilmektedir [103, 104]. Yapılan çalışmalarda azadirachtinin, deri değiştirmeyi engelleyip, bireylerin gelişim sürecini bozarak anormal bireyler oluşmasına neden olduğu gözlemlenmiş ve bu duruma azadirachtinin juvenil hormonu taklit etkisinin neden olduğu anlaşılmıştır [39]. *Manduca sexta*'da yüksek

dozlarda azadirachtin gereğinden fazla deri değiştirmeye neden olmaktadır [105]. *Tenebrio molitor*'da ise gelişmeyi etkileyerek böceğın deri değiştirmesini engellemektedir [106]. Bu çalışmada halk arasında kovan güvesi olarak bilinen *G. mellonella* zararlısının son evre larvalarında azadirachtinin etkileri araştırılmaya çalışılmıştır. Literatürde, bir biyoinsektisit olarak kullanılan azadirachtinin *G. mellonella*'nın gelişimsel evreleri ve yaşama süreleri üzerine etkileri konusunda birkaç çalışma bulunurken [108], model tür üzerinde üreme ve bağışıklık parametrelerine potansiyel etkileri hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır [107-110].

Çalışmamızda ilk olarak azadirachtinin *G. mellonella* üzerinde öldürücü etkilerini belirlemek amacıyla LD₅₀ ve PD₅₀ değerlerini tespit ettik. Topikal aplikasyon yöntemiyle azadirachtin uygulanan son evre larvalarında LD₅₀ ve PD₅₀ değerleri sırasıyla 16.564 ve 73.088 ppm (bkz. Tablo 3.1-3.2) olarak belirlenmiştir. Farklı böcek türleri üzerinde azadirachtinin öldürücü etkilerinin olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır [107, 111]. Ancak bu çalışma ilk kez *G. mellonella* son evre larvaları üzerinde azadirachtinin topikal olarak uygulanmasıyla LD ve PD değeri vermektedir. Deney sonuçlarımız azadirachtinin *G. mellonella*'da doza bağlı mortaliteye sebep olduğunu gösterdi. Daha önce azadirachtinin *G. mellonella*'ya etkilerinin belirlendiği çalışmalarda, maddenin besin ve enjeksiyon yoluyla böceğe tatbik edilmesiyle doza bağlı ölümlere neden olduğu gösterilmiştir ve elde edilen bulgular bizim çalışmamızla uyum içindedir [107, 112]. Hatta düşük dozlarda bile azadirachtinin son derece toksik etkiye sahip olduğu önceki çalışmalarda ve elde ettiğimiz bulgularda açıkça görölmektedir.

Denemelerde son evre larvalara farklı azadirachtin konsantrasyonlarının (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 3000 ve 10000 ppm) uygulanması, bireylerin koza örme süresinde kontrole göre artmaya neden oldu (bkz. Tablo 3.3). Ancak meydana gelen bu artmalar önemsizdi. Ardından yine farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 50 ve 100 ppm) azadirachtin uygulanan son evre larvaların pup oluşturma süreleri kontrol gruplarına göre önemli oranlarda artış gösterdi (bkz. Tablo 3.4). *Ostriana furnacolis* üzerinde yapılan çalışmada, azadirachtinin toksik etki yaparak büyümeyi durdurduğu, pupa oluşturma süresini geciktirerek birçok anormal larva, pupa ve ergin böceklerin geliştiği görölmüştür [113]. Azadirachtinin farklı böcek türlerinde,

sinir ve endokrin sisteme etki ederek carpus allotumdan salınan juvenil hormonunun sentezini engellediği de yapılan bazı çalışmalarda ortaya konulmuştur [24], Juvenil hormonunun larval dönemde gelişimin devamlılığı, deri değiştirme (ecdysisi), ergin evredeki dişilerin yumurtlaması üzerine etkileri bilinmektedir [114]. Bu durum böceğin larval periyodunun uzamasına yol açmaktadır. *G. mellonella* son evre larvalarına yapılan azadirachtin uygulamasının, böceğin zararlı olduğu evre olan larva evresinde kalma süresini uzattığı görülmektedir.

Azadirachtin farklı konsantrasyonlarda pupal evreden ergin evreye geçiş süresinde artma ve azalmalara neden oldu ancak ortaya çıkan bu değişimler istatistiksel olarak önemsizdi (bkz. Şekil 3.3). Daha önce yapılan bir çalışmada azadirachtinin, metamorfozu engellediği ve larval dönemde aktif olarak rol oynarken, pupa döneminde çok etkili olmadığı tespit edilmiştir [114]. Çalışmamızda puptan ergin evreye geçiş süresinin azadirachtin konsantrasyonlarından anlamlı olarak etkilenmemesini böceğin pupal evrede olmasına bağlayabiliriz.

G. mellonella larvalarına azadirachtin uygulamasını takiben ergin çıkış süresinde kontrol gruplarına göre doza bağlı artmalar tespit edildi ancak bu artış 100 ppm'de istatistiksel olarak anlamlı bulundu (bkz. Şekil 3.4). Bu sonuçlara benzer olarak, azadirachtin uygulamasının ergin çıkış süresine etki ettiği bir çok Lepidoptera türlerinde bildirilmiştir [115-117]. Yaptığımız deneyler ergin çıkış süresinin uzadığını açıkça ortaya koymaktadır. Ancak bulgularımızın aksine Gelbic ve Nelmeç [109] azadirachtin uygulamasının *G. mellonella* bireylerinde ergin çıkış süresini etkilemediğini bildirmişlerdir. Onların bulguları ile bulgularımız arasındaki farklılıkların uygulanan doz ve formulasyondan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Tüm bireylerin erginleşme ve puplaşma yüzdelerine bakıldığında (bkz. Şekil 3.5), azadirachtin madde konsantrasyonuna bağlı olarak puplaşan ve erginleşen birey sayılarında azalmalara neden oldu. Yapılan bir çalışmada *Tetranychus cinnabarinus* 'un nimf dönemi üzerine azadirachtinin 60 ppm'lik dozu uygulanmış ve %100 ölüm oranı ile hiç ergin çıkışı olmadığı görülmüştür. 40.0, 20.0 ve 10.0 ppm'lik dozlarda ise sırasıyla %13.33, %31.66 ve %60 oranda ergin çıkışı olduğu gözlenmiştir [118]. Çalışmamız kapsamında ise azadirachtin uygulaması 100 ppm üzerindeki dozlarda puplaşma ve erginleşmeyi %100 oranında engellemiştir (bkz.

Tablo 3.7). Ancak puplaşma ve erginleşme yüzdelerinde, düşük dozlarda gözlemlenen azalmalar anlamlı bulunmadı.

Azadirachtin'in 1, 5 ve 10 ppm'lik dozları *G. mellonella*'nın ergin yaşam süresinde önemli değişiklikler meydana getirdi. Yaşam süresi sub-letal dozlarda önemli ölçülerde azalma gösterirken (bkz. Tablo 3.8) LD₅₀ dozundan yüksek dozlarda önemli bir etki göstermemektedir. Azadirachtinin ergin yaşam süresini sub-letal dozlarda etkileyip uygulanan daha yüksek dozlarda anlamlı etkilememesi maddenin hormesis etkisinin bir göstergesi olabilir. Hormesis, toksik maddelerin düşük konsantrasyonlarda organizmayı etkilerken yüksek konsantrasyonlarda aynı etkiyi göstermemesi ve bu maddelere karşı geliştirilen adaptif olguları açıklamak için öne sürülen bir kavramdır [119]. Literatürde, çeşitli insektisit ve toksik maddelere maruz kalan farklı böcek türlerinde hormesis etkisinin tespit edildiği çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, azadirachtin ve imidacloprid'in sub-letal dozlarda esterazlar, juvenil hormon düzeyleri, doğurganlık ve diğer parametrelerde hormetik etkileri olduğu belirtilmiştir [120-122]. Çalışmamıza benzer olarak, *O. fasciatus*'a uygulanan düşük dozlardaki azadirachtin ergin yaşam süresini etkilerken yüksek dozlarda aynı etkiyi göstermemiştir [39]. Azadirachtinin ergin yaşam süresini kısalttığı *Anopheles gambiae*, *Zabrotes subfasciatus*, *Amphiareus constrictus*, *Ceratitis capitata* gibi farklı böcek türlerinde de tespit edilmiştir [123-125]. Azadirachtin uygulamasını takiben erginleşmeyi başaran dişiler yaşam sürelerinin kısalmasıyla daha az sayıda yumurta bırakacak ve bu durum zararlının sonraki nesilde popülasyon seviyesinin azalmasına sebep olacaktır.

Çalışmalarımız sonucunda, azadirachtinin uygulanan 1, 5, 10 ve 50 ppm'lik konsantrasyonlarının yumurta sayılarında kontrol grubuna göre önemli oranda azalmaya sebep olduğu gözlemlendi. Toplam yumurta sayısında gözlemlenen azalmalar madde konsantrasyonuna paralel şekilde oluştu ve bozuk yumurta sayılarında madde konsantrasyonuna paralel olarak artma görüldü (bkz. Tablo 3.11). Sub-lethal dozda kullanılan insektisitler böceklerde ölüm oranını, üreme kabiliyetini ve yeni jenerasyonun genetik yapısını değiştirerek, onların yumurta bırakmalarını ve yumurta açılım oranlarını etkilemektedir [126, 127]. Sundaram ve Sloane [128] azadirachtin'in özellikle yüksek konsantrasyonlarda *Tetranychus urticae*'nin yumurta sayılarını ve yumurta açılımını büyük oranda azalttığını bildirmektedir [128,

129]. Azadirachtinin *R. prolixus* ve *Spodoptera exigua* türlerinde vitellogenesis ve yumurta oluşumunu engellediği bilinmektedir [130-132]. *R. prolixus*'da azadirachtin uygulaması sonucunda oluşan yumurta sayısındaki düşme yumurtalık ve hemolenfteki ekdisteroid seviyelerindeki azalmaya bağlanmıştır [132]. Bu veriler doğrultusunda azadirachtin uygulaması sonucu olarak *G. mellonella* erginlerinin sağlıklı yumurtalarının azalması ve bozuk yumurta sayılarının artması, hem maddenin endokrin düzenleyici etkisine hem de üreme dokularına doğrudan etkisine bağlı olabilir. Çalışmamız azadirachtinin topikal uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella*'da yumurta sayısının azaldığını ve bozuk yumurta sayısının arttığını gösteren ilk çalışmadır.

Hemositler böceklerde önemli immün sistem elemanlarıdır [133-135]. *G. mellonella* larva hemolenfide mevcut olan hemosit tipleri Er ve ark. [44]'a göre belirlendi ancak çalışmamızda azadirachtinin farklı hemosit tiplerine etkilerinde granülositler (bkz. Şekil 3.12), plazmatositler (bkz. Şekil 3.14), prohemositler (bkz. Şekil 3.18) ve önositoidler (bkz. Şekil 3.18) ele alındı. Çalışmamızda, kontrol gruplarını oluşturan *G. mellonella* larvalarından farklı hemosit sayıları incelendiğinde dolaşımdaki hemositlerin yarısından fazlasının granülosit olduğu görülmektedir. İkinci en sık karşılaşılan hemosit tipinin plazmatositler olduğu, diğer hemosit tiplerinin ise hemolenfte çok düşük miktarlarda olduğu tespit edildi.

Lepidoptera ordosuna ait bazı türlerle yapılan çalışmalarda hemolenfteki hemosit sayısının yaralanma, bakteriyel, fungal, viral enfeksiyon ve çeşitli stres koşullarında değişebildiği belirlenmiştir [136, 137, 138, 139, 140, 141]. Çok sayıda fizyolojik fonksiyonlarının olması nedeni ile hemositler çevresel faktörlere karşı diğer hücrelere göre daha duyarlıdır. Bu nedenle hemositler toksik maddelerin sitolojik zararlarını araştırırken sıklıkla kullanılmaktadır [142]. Sak 2004 yılında yaptığı bir çalışmada Cypermethrin'in *Pimpla turionellae*'nin hemositlerine olan etkilerini araştırmış ve son evre larvalara 20, 50, 100 ve 150 ppm doz değerlerini uygulamıştır. Cypermethrin uygulamasına bağlı olarak, doz artışıyla beraber, hemositlerde mitotik aktivitede azalma ve apoptotik hemosit sayılarında kontrole göre büyük artış meydana gelmiştir [142].

Gibberellik asit (GA₃)'in *G. mellonella* ve parazitoid *P. turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae)'nin hemosit sayılarına etkilerinin araştırıldığı

çalışmada; *G. mellonella* larvalarında toplam hemosit sayısının düşük GA₃ dozlarında (50 – 500 ppm) önemli oranda artış gösterdiği, yüksek dozlarda ise (1000 – 5000 ppm) değişiklik göstermediği görülmüştür. Bu durum başlangıçtaki artan GA₃ dozları ile savunma hattını oluşturabilmek için mitozun aktive olması ve yeni hemositlerin oluşması sonrasında ise diğer savunma mekanizmalarının da devreye girmesi ile hemosit savunma hattının zayıflamış olabileceği şeklinde açıklanmıştır. Denenen hiçbir dozda GA₃ farklı hemosit sayılarını etkilememiştir [143].

Bu çalışmada azadirachtinin en yaygın ticari formülasyonu olan NeemAzal topikal aplikasyon yöntemiyle *G. mellonella*'ya tatbik edilerek maddenin hücresel bağışıklığa etkileri ilk kez ortaya konulmuştur. Azadirachtin uygulamasında, dolaşımdaki toplam hemosit sayıları kontrol gruplarına göre keskin bir düşüş gösterdi ancak farklı hemosit sayıları üzerindeki etki toplam hemosit sayılarına nazaran daha az oranda gerçekleşti. Prohemosit ve önositoid sayılarında hiçbir fark gözlenmezken plazmatosit ve granulosit sayılarında görülen artmalar sadece 100 ppm'de önemliydi. Çalışmamıza benzer olarak azadirachtin uygulamasına bağlı olarak, *R. prolixus* [80], *S. litura* (Lepidoptera: Noctuidae) [81], *S. littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) [82], ve *Dysdercus koenigii* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) [144] türlerinde de toplam hemosit sayılarının azaldığı bilinmektedir. Azadirachtinin aynı formülasyon ve uygulama yöntemiyle kullanıldığı bir diğer çalışmada, *D. koenigii*'de toplam hemosit sayısı %61 oranında düşüş göstermiştir [144], *Danaus chrysippus*'da ise 24 ve 48 saatlik periyotlar sonunda sırasıyla %56 ve %59 oranında düşüş gösterdiği belirlenmiştir [145]. Azadirachtinin toplam ve farklı hemosit sayılarında ortaya çıkardığı değişimler maddenin endokrin sisteme etkisi sonucu olabileceği gibi hücre ölümü ile sonuçlanan otofajik ve apoptotik yolların tetiklenmesi sonucu da olabilir. Literatürde azadirachtinin böcek hücre kültürlerinde apoptosise neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [146, 147].

Böceklerde toplam ve farklı hemosit sayılarındaki değişimler dolaşımdaki hemositlerin mitoz bölünmesi sonucu gerçekleşmektedir [44, 148]. *G. mellonella*'ya azadirachtin uygulamasına bağlı olarak mitoz bölünme geçiren hemositlerin sayıları önemli oranda azalmıştır. Bu durum çalışmamızdaki toplam hemosit sayılarındaki azalmanın nedeni olabilir. Bulgularımıza paralel olarak azadirachtinin böcek hücre kültürlerinde antimitotik etkileri olduğu gösterilmiştir [146, 149].

Böceklerde dış ortamdan verilen spesifik bir antijene karşı böceğin bağışıklık sisteminde meydana gelen değişimleri ölçmenin en güzel yollarından biri böcek vücut boşluğunda oluşan nodül sayılarını belirlemektir. Hemositlerin yayılma davranışı ise enkapsülasyon, nodül oluşumu ve fagositoz gibi bağışıklık tepkileri ortaya çıkarken gözlemlenen bir hemosit davranışıdır. Çalışmamızda *G. mellonella*'ya azadirachtin uygulaması ve laminarin enjeksiyonunu takiben oluşan nodül sayılarında kullanılan tüm dozlarda kontrol grubuna göre önemli azalmalar gözlemlendi (bkz. Tablo 3.20 ve Şekil 3.23). Kontrol grubunda laminarin enjeksiyonuna bağlı olarak oluşan nodül sayıları ortalama 275 iken, bu sayı en yüksek azadirachtin dozunda ortalama %76 oranında azaldı. Benzer şekilde uygulanan tüm azadirachtin dozlarında yayılma davranışı gösteren hemositlerin sayısında azalmalar tespit edildi ve en yüksek doz olan 3000 ppm'de kontrol grubuna göre ortalama %61 oranında düştü. Daha önce yapılan bir çalışmada azadirachtin uygulamasının *R. prolixus*'ta nodül sayılarını önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir [80]. Ulrich Schlüther ve Gerhard Seiffert'in 1987'de yapmış olduğu çalışmada *Epilachna variventis*'in (Coleoptera) azadirachtin enjeksiyonundan 1 gün sonra meksika fasulye böceği son dönem larvalarında nodül oluşumuna sebep olduğu belirtilmiştir [79]. Bununla beraber literatürde farklı bitkisel ürünlerin, insektisitlerin ve böcek gelişim düzenleyicilerinin hemosit yayılma davranışına ve nodülasyona etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur [79, 150]. Azadirachtin uygulamasına bağlı olarak toplam hemosit sayısında meydana gelen azalma nodülasyon ve yayılma davranışlarında meydana gelen azalmanın nedeni olabilir.

Böceklerde kütikular yaralanma veya vücut boşluğu içerisine yabancı organizmaların girmesi durumunda melanizasyon gerçekleşmesi genel bir olgudur [151]. Çalışmamızda azadirachtin uygulaması, *G. mellonella* larvalarında hemosit melanizasyonunda değişimlere neden oldu ve en yüksek doz olan 3000 ppm de melanizasyon oranı oldukça azaldı ancak ortaya çıkan azalma ve artmalar istatistiksel olarak anlamlı değildi (bkz. Tablo 3.18). Yaralanma veya savunma tepkileri sonucu oluşan melanizasyon reaksiyonları böceklerde fenoloksidaz aktivitesine dayandırılmaktadır [151]. Kesin bir yargıya varabilmek için azadirachtinin fenoloksidaz aktivitesine etkileri ile ilgili ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Elde ettiğimiz sonuçlar ve yapılan diğer benzer çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, zararlılarla mücadelede insektisitlerin yaygın olarak kullanıldığını görmekteyiz. Çeşitli konsantrasyonlarda kullanılan azadirachtinin *G. mellonella* üzerinde gelişimi ve deri değişimini engelleyici, yaşama süresini azaltıcı, yumurta sayısını azaltıcı ve yumurta verimini engelleyici bunun yanında hemosit aracılı bağışıklık sistemini baskılayıcı etkileri olduğu görülmektedir. Bütün bunların yanında azadirachtin çabuk bozunmasından, doğaya ve insana zarar vermemesinden dolayı entegre zararlı programlarında alternatif bir mücadele yöntemi olarak kullanılmaya adaydır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Graethead, D.J. and Waage, J.K., “Opportunities for Biological Control of Agricultural Pests in Developing Countries”, *World Bank Technical Paper*, Number 11, The World Bank, Washington, D.C., U.S.A., (1983).
- [2] Andow, D.A., Ragsdale, D.W. ve Nyvall, R.F., “Ecological Interactions and Biological Control”, *Westview Press*, Colorado, (1997).
- [3] Cox, C., “Insecticide Factsheet. Cypermethrin”, *Journal of Pesticide Reform*, 16 (2), 15-20, (1996).
- [4] Erol, T. ve Kılınçer, N., “Bazı insektisitlerin pupa asalağı *Pimpla turionellae* L. (Hym: Ichneumonidae)’ye etkileri üzerine araştırmalar”, *Türkiye I. Biyolojik Mücadele Kongresi, Adana*, 123-137,(1986).
- [5] Haynes, K.F., “Sublethal Effects of Neurotoxic Insecticides on InsectBehavior” *Annual Review of Entomology*, 33, 149-168, (1988).
- [6] Takada, Y., Kawamura, S. and Tanaka, T., “Effects of various insecticides on the development of the egg parasitoid *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae)”, *J. Econ. Entomol.* , 94 (6), 1340- 1343, (2001).
- [7] Xu, J., Shelton, A.M. and Cheng, X., “Variation in susceptibility of *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) to permethrin”, *J. Econ. Entomol.*, 94 (2), 541-546, (2001).
- [8] Hillocks, R.J., “Integrated management of insect pests, diseases and weeds of cotton in Africa”, *Integrated Pest Management Reviews*, 1, 31- 47, (1995).
- [9] Edge, J.M., Benedict, J.H., Carroll, J.P. and Reading, H.K., “Bollgard Cotton: An assesment of global economic, environmental and social benefits”, *The Journal ofCotton Science*, 5, 121-136, (2001).

- [10] Liu, S.Q., Shi, J.J., Cao, H., Jia, F.B., Liu, X.Q., Shi, G.L., “Survey of pesticidal component in plant”, In: Dianmo, L. (Ed.), *Entomology in China in 21st Century. Proceedings of 2000 Conference of Chinese Entomological Society*, Science and Technique Press, Beijing, China. 1098–1104, (2000).
- [11] Isman, M.B., “Botanical insecticides, Deterrents and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World”, *Annual Review of Entomology*, 51, 45-66, (2006).
- [12] Isman, M. B., “Bioinsecticides, Neem Insecticides, Pesticide Outlook”, *Faculty of Agricultural Sciences, University of British Columbia*, Vancouver, Canada. October., 32-39, (1997).
- [13] Rong, X.D., Xu, H.H., Chiu, S.F., “Progressing on botanical insecticide-neem research”, *J. Pestic. Sci, Chin*, 2 (2) 9–14, (2000).
- [14] Spollen, K. M. and Isman, M. B., “Acute and sublethal effects of a neem insecticide on the commercial biocontrol agents *Phytoseiulus persimilis* and *Amblyseius cucumeris* (Acari: Phytoseiidae) , and *Aphidoletes aphidimyza* (Rondani) (Diptera: Cecidomyiidae)”. *J. Econ. Entomol.*, 89, 1379-1386, (1996).
- [15] Schmutterer, H., “Properties and Potential of Natural Pesticides From The Neem, *Azadirachta Tree Indica*”, *Annu. Rev. Entomol.*, 35:271-297, (1990).
- [16] Kısmalı, Ş.N., and Madanlar, N., “*Azadirachta indica*; böceklere etkileri üzerinde bir inceleme”, *Türk. Entomoloji Dergisi*, 12 (4), 239-249, (1988).
- [17] Davis, P.H., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh: University Press. Vol: 5, 47-48, (1975).
- [18] Butterworth J.H., Morgan E. D., “Investigation of the locust feeding inhibition of the seeds of the neem tree, *Azadirachta indica*”, *Journal of Insect Physiology*, 17 (6), 969–977, (1971).

- [19] Schmutterer, H., "The Neem Tree : Source of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes", VCH, Weinheim, Germany, 696, (1995).
- [20] Jacobson, M., *Focus on Phytochemical Pesticides*, Vol.1. The Neem Tree, Boca Raton, CRC Press, 178, (1989).
- [21] Ascher, K.R.S., "Nonconventional Insecticidal Effects Pesticides Available from Neem Tree, *Azadirachta indica*", *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 22: 433-449, (1993).
- [22] Awad, T.I., Onder, F. ve Kısmalı, Ş., "Azadirachta indica A. Juss (Meliaceae) Ağacından Elde Edilen Doğal Pestisitler Üzerinde Bir İnceleme", *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 22(3), 225-240, (1998).
- [23] Schmutterer, H., "Side-effects of Neem (*Azadirachta indica*) Products on Insect Pathogens and Natural Enemies of Spider Mites and Insects", *Journal of Applied Entomology*, 121, 121-128, (1997).
- [24] Howatt, K., "Azadirachta indica: One tree's Arsenal Against Pests. [online]", www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers/howatt.html , (1994).
- [25] Sayah, F., Idaomar, M., Soranzo, L., and Karlinsky, A., "Endocrine and Neuroendocrine effects of Azadirachtin in adult females of the earwig *Labidura riparia*", *Tissue and Cell* 30 (1): 86-94, (1998).
- [26] Malczeewska, M., Gelman, D.B., Cymborowski, B., "Effect of azadirachtin on development, juvenile hormone and ecdysteroid titres in 37 Chilled *Galleri mellonella* Larvae". *Journal of Insect Physiology*, 34 (7), 725-732, (1988).
- [27] Qadri, S.S.H., Narsaiah, J., "Effect of azadirachtin on the moulting processes of last instar nymphs of *Periplaneta americana* (L.)". *J. Exp. Biol.*, Indian, 16, 1141-1143, (1978).

- [28] Sieber, K.P., Rembold, H., “The effects of azadirachtin on the endocrine control of moulting in *Locusta migratoria*”, *Journal of Insect Physiology* 29, 523–527, (1983).
- [39] Heyde, V.D.J., Saxena, R. C., Schmitterer, H. 1984. “Neem oil and neem extracts as potential insecticides for control of hemiterous rice pests, Natural pesticides from the Neem tree and other tropical plants”, *Proc. 2nd Int. Neem Conf. Rauschholzhausen, Eschborn: GTZ.* 377-90, (1983).
- [30] Chopra, R.L. “Ann. Rep. of the Entomologist to the Govt. of Punjab, Lyallpur, 1925-26”, *Rep. Dept. Agric. Punjab.* 1(pt.2):67-125, (1928).
- [31] Simmonds, M. S. J., Blaney, W. M., “Some neurophysiological effects of azadirachtin on lepidopterous larvae and their feeding response. Natural pesticides from the Neem tree and other tropical plants”. *Proc. 2nd Int. Neem Conf. Rauschholzhausen, 1983. Eschborn: GTZ.* pp. 587. (1984).
- [32] Jabbar, A., Anwar, T., Khalique, F., Tahir, S., Shakeel, M.A., “Plant with insecticidal activities against four major insect pests in Pakistan”, *Tropical Pest Man.*, 38 (4), 431-437, (1992).
- [33] Jaglan, M.S., Khokhar, K.S., Malik, M.S. and Sing, R., “Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) extracts against American Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner)”, *J. Agric. Food Chem.*, 45:3262-3268, (1997).
- [34] Mordue, A.J., Zounos, A., Wickramanda, I.R. and Allan, E. J., “Neem tissue culture and the production of insect antifeedant and growth regulatory compounds”, *Presented at Symposium of the British Crop Protection Council and Sustainable Farming Systems, Edinburgh (U.K.), 11-14 Sept. 1995:* 187-194, (1995a).
- [35] Fagoonee, I., “Behavioral response of *Crocidolomia binotalis* to neem. Natural pesticides from the Neem tree and other tropical plants” *Proc. 2nd Int. Neem Conf. Rauschholzhausen, 1983. Eschborn: GTZ.* pp. 109-20, (1981).

- [36] Saxena, K.N. and Rembold, H., "Orientation and ovipositional response of *Heliothis armigera* to certain neem constituent: 199-210, In Natural pesticides from neem tree and other tropical plants", (Eds. H. Schmutterer & K. R. S. Ascher) *Proc 2nd . Int. Neem Conf. Rauischholzhausen*, Eschborn: GTZ. 587 pp (1984).
- [37] Yadav, T.D., "Antiovipositional and ovicidal toxicity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) oil against three species of *Callosbruchus*", *Neem Newsl.*, 2: 5-6, (1985).
- [38] Chen, C., Yaw-jen, C.D., Ling-lan, C. and Hou, R.F., "Deterrent Effect of Neem Seed Kernel Extract on Oviposition of The Oriental Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in Guava", *J. Econ. Entomol.*, 89(2), 462-466 (1996).
- [39] Dorn, A., Rademacher, J.M. and Sehn, E., "Effects of Azadirachtin on the Moulting Cycle, Endocrine System and Ovaries in Last-Instar Larvae of the Milkweed Bug, *Oncopeltus fasciatus*", *Journal of Insect Physiology*, 32, (3), 231-238 (1986).
- [40] Lowery, D.T. and Isman, M.B. "Toxicity of neem to natural enemies of aphids", *Phytoparasitica* 23(4) 297-306, (1996).
- [41] Mordue, A.J., Davidson, G., Mckinlay, R.G. and Hughes, J., "Observation on azadirachtin for management of cabbage caterpillar infestations in the field", *Presented at Symposium of the British Crop Protection Council and Sustainable Farming Systems*, Edinburg (U.K.), 11-14 Sept. 1995: 371-378, (1995b).
- [42] Saxena R.C. "Antifeedants in tropical pest management". *Insect Sci. Applic.*, 8: 731-736, (1987).
- [43] Prabhakaran, S. K. And Kamble, S.T., "Effects of azadirachtin on different strains of German cockroach (Dictyoptera: Blatellidae)". *Environ. Entomol.*, 25(1), 130-134. (1996).

- [44] Er A., Uçkan F., River D. B. ve Sak O., “Cytotoxic effects of parasitism and application of venom from the endoparasitoid *Pimpla turionellae* on hemocytes of the host *Galleria mellonella*,” *J. Appl. Entomol.*, 136, 225-236, (2011).
- [45] Vilmos, P. and Kurucz, E., “Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system” *Immunol. Lett.*, 62, 59-66 (1998).
- [46] Ashida, M. and Brey, P.T., “Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects”, (ed. Brey P., Hultmark D.) Chapman and Hall, New York, p. 135–172, (1998).
- [47] Gupta, A.P., “Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods”, Wiley, New York, (1988).
- [48] Lai-Fook, J., “The repair of wounds in the integument of insects”, *J. Insect Physiol.*, 12, 195-226, (1966).
- [49] Schmidt, O., Theopold, U. and Strand, M., “Innate immunity and its evasion and suppression by Hymenopteran endoparasitoids”, *BioEssays*, 23, 344-351, (2001).
- [50] Richards, E.H. and Edwards, J.P., “Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera, noctuidae) by the ectoparasitoid wasp *Eulophus pennicornis*, results in the appearance of a 27 kDa parasitism-specific protein in host plasma”, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 29, 557-569, (1999).
- [51] Richards, E.H. and Edwards, J.P., “Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) by the ectoparasitoid wasp, *Eulophus pennicornis*. Effects of parasitization, venom and starvation on host haemocytes”, *J. Insect Physiol.*, 45, 1073-1083, (1999).
- [52] Lavine, M.D. and Strand, M.R., “Insect hemocytes and their role in immunity”, *Insect Biochem. Molec.*, 32, 1295-1309, (2002).
- [53] Ribeiro, C. and Brehelin, M., “Insect haemocytes: What type of cell is that”, *J. Insect Physiol.*, 52, 417-429, (2006).

- [54] Gupta, A.P., *Cellular elements in the hemolymph In: Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, New York: Pergamon Press, p 401-451, (1985).
- [55] Rowley, A.F. and Ratcliffe, N.A., *Insects, In: Invertebrate Blood Cells*, (ed. Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F.), Vol 2, London: Academic Press, 421-488, (1981).
- [56] Turnbull, M.W., Martin, S.B. and Webb, B.A., “Quantitative analysis of hemocyte morphological abnormalities associated with *Campoletis sonorensis* parasitization”, *J. Insect Sci.*, 4, 11-26, (2004).
- [57] Levin, D.M., “An integrin required for the encapsulation immune response in the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae)”, PhD Thesis, *Kansas State University*, College of Agriculture, Department of Entomology, Manhattan, Kansas, (2007).
- [58] Chapman, R.F. “The Insects: Structure and Function”, Cambridge University Press, Cambridge (1998).
- [59] Silva, J.E.B., Boleli, I.I.C and Simões, Z.L.P., “Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae”, *Braz. J. Biol.*, 62(4A), 689-699, (2002).
- [60] Ribeiro, C., Simoes, N. and Brehelin. M., “Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions. in vivo and in vitro studies”, *J Insect Physiol.*, 42, 815-822, (1996).
- [61] Schmit, A.R. and Ratcliffe, N.A., “The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae”, *J Insect Physiol.*, 23, 175–184, (1977).
- [62] Tojo, S., Naganuma, F., Arakawa, K. and Yokoo, S., “Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*”, *J Insect Physiol.*, 46, 1129-1135, (2000).

- [63] Costa, S.C.P., Ribeiro, C., Girard, P.A., Zumbihl, R. and Brehelin, M., “Modes of phagocytosis of Gram- positive and Gram- negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes”, *J Insect Physiol.*, 51, 39-46, (2005).
- [64] Pech, L.L. and Strand, M.R., “Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes”, *J. Cell Science*, 109, 2053- 2060, (1996).
- [65] Uçkan, F. and Sak, O., “Cytotoxic effect of cypermethrin on *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) larval hemocytes”, *Ekoloji*, 19 (75): 20-26, (2010).
- [66] Tepass, U., Liselotte, I., Fessler, L.I., Aziz, A. and Hartenstein, V., “Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*”, *Development*, 120, 1829-1837, (1994).
- [67] Strand, M.R. and Noda, T., “Alterations in the hemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by *Microplitis demolitor*”, *J. Insect Physiol.*, 37, 839–850, (1991).
- [68] Kanost, M.R., Jiang, H., and Yu, X.-Y., “Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*”, *Immunol. Rev.*, 198, 97–105, (2004).
- [69] Ashida, M., Ochiai, M. and Niki, T., “Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of silkworm *Bombyx mori*”, *Tissue&Cell.*, 20, 599- 610, (1988).
- [70] Brehelin, M. and Zachary, D., “Insect haemocytes: a new classification to rule out controversy, In: *Immunity in Invertebrates*”, (ed. Brehelin, M., Springer Verlag), Berlin, 36-48, (1986).
- [71] Gillespie, J.P., Kanost, M.R. ve Trenczek, T., “Biological mediators of insect immunity”, *Annu. Rev. Entomol.*, 42, 611-643, (1997).
- [72] Bayne, C.J., “Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates”, *BioScience*, 40: 723-731, (1990).

- [73] Ratcliffe, N.A. and Gagen, S.J., “Studies on the in vivo cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*”, *Tissue Cell*, 9: 73-85. (1977).
- [74] Chapman, R.F., *The Insects: Structure and Function*, Cambridge: Cambridge University Press, (1998).
- [75] Götz, P. and Boman, H.G., “Insect immunity”, (In. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*), vol. 3, (ed. Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I.), Oxford: Pergamon Press, p 453-485, (1985).
- [76] Richards, E.H. and Edwards, J.P., “Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, disrupts the cytoskeleton of host haemocytes and suppresses encapsulation *in vivo*”, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 49:108–124, (2002).
- [77] Tunaz, H., “Böceklerde Bağışıklık Mekanizması”, *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 7(2): 78-8, (2004).
- [78] Lackie, A.M., “Humoral mechanisms in the immune response of insects to larvae of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda)”, *Parasite Immunology*, 3: 201-208, (1981).
- [79] Zibae, A. And Bandani, A.R., “Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on the digestive enzymatic profiles and the cellular immune reactions of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), against *Beauveria bassiana*”, *Bull. Entomol. Res.* 100, 185–196, (2010).
- [80] Azambuja, P., Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A. and Warthen, J.D., “Jr. Immune-depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, azadirachtin”, *J. Insect Physiol*, 37, 771-777, (1991).
- [81] Sharma, P.R., Sharma, B.P. and Saxena, B.P., “Effects of neemgold on haemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Fabr.) (Lepidoptera: Noctuidae)”, *Current Science*, 84: 690 695, (2003).

- [82] Shaurub, E.H., Abd El-Meguid, A. and Abd El-Aziz, N.M., “Quantitative and ultrastructural changes in the haemocytes of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) treated individually or in combination with *Spodoptera littoralis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (SpliMNPV) and azadirachtin”, *Micron*, 65, 62-68, (2014).
- [83] Dubovskiy, I.M., Grizanova, E.V., Ershova, N.S., Rantala, M.J. and Glupova, V.V., “The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*”, *Chemosphere*, 85, 92-96, (2011).
- [84] Emre, I., Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O. and Cogun, H.Y., “Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and melondialdehyde content in cadmium-treated *Galleria mellonella* larvae”, *Entomological Society of America*, 106(3): 371-377 (2013).
- [85] Allan, L., “Wax Moth and its Control. Department of Agriculture WesternAustralia”<http://www.agric.wa.gov.au/agency/pubns/farmnote/2000/f00697.htm>. (2000).
- [86] Sanford, M.T., “Controlling Wax moth, one of a series of the Entomology and Nematology Department”, *Florida Cooperative Extension*, (2003).
- [87] Öder, E., “Bal arısı hastalıkları”, Erzurum: Atatürk Üniversitesi Basımevi, 74, (1983).
- [88] Haewoon, O., ManYoung, L. and Young, D.C., “Developing periods and damage patterns of combs by the greater wax moth, *Galleria mellonella*”, *Korean Journal of Apiculture*, 10(1), 5-10, (1995).
- [89] Ritter, W., Perschil, F. and Vogel, R., “Comparison of the effect of various methods for the control of wax moths”, *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung*, 26: 1, 11-13, (1992).

- [90] Coudriet, D. L., Prabhaker, N. and Mayerdirk, D. E., "Sweetpotato whietfly (Homoptera: Aleyrodidae) Effects of neem seed extract on oviposition and immature stages. Environ", *Entomol.*, 14, 776-779, (1985).
- [91] Stark, J. D. and Walter, J. F., "Neem oil and neem oil components affect the efficacy of commercial neem insecticides", *J. Agric. Food Chem.*, 43, 507-512, (1995).
- [92] Partridge, M. J. and Borden, J. H. "Evaluation of neem seed extract for control of the spruceaphid, *Elatobium abietinum* (Walker) (Hom: Aphididaae)", *The Canadian Entomologist*, 129, 889-906, (1997).
- [93] Tuncer, C. and AliNiasee, M. T., "Acute and chronic effects of neem on *Myzocallis coryli* (Hom: Aphididae)", *International J. Of Pest Management*, 44(2), 52-58, (1998).
- [94] Randen, E.J. and Roitberg, B.D., "Effect of a neem- based insecticide on oviposition deterrence, survival, behavior and reproduction of adult western cherry fruit fly (Dip: Tephritidae)", *J. Econ. Entomol.*, 91(1), 123-131, (1998).
- [95] Akca, I., Tuncer, C., Güler, A. and Saruhan, I., "Residual toxicity of 8 different insecticides on honey bee (*Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae)". *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(3), 436-440, (2009).
- [96] Orr, G.L. and Downer, R.G.H., "Effect of Lindane (r-hexachlorocyclohexane) on Carbohydrate and Lipid Reserves in the American Cockroach, *Periplaneta americana*". *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 17: 89-95, (1982).
- [97] Bhosale, S.H. and Kallapur, V.L., "Changes in the Metabolic Fuel Reserves of the 5th Instar, *Bombyx mori*, Following Endosulfan Treatment", *Entomon.*, 10: 281, (1985).
- [98] Morgan, E.D., "Azadirachtin, a Scientific Gold Mine", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17 (12): 4096-4105, (2009).

- [99] Bomford, M.K. and Isman, M.B., “Desensitization of Fifth Instar *Spodoptera litura* of Azadirachtin an Neem”, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 81: 307-313, (1996).
- [100] Martinez, S.S. and Van Emden, H.F., “Sublethal Concentrations of Azadirachtin Affect Food Intake, Conversion Efficiency and Feeding Behaviour of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae)”, *Bulletin of Entomological Research*, 89: 65-71, (1999).
- [101] Unal, S. and Akkuzu, E., “Larvaecidal Effects of Azadirachtin on the Pine Processionary Moth”, *African Journal of Biotechnology*, 8 (19): 5128-5131, (2009).
- [102] Ventura, M.U. and Ito, M., “Antifeedant Activity of *Melia azedarach* (L.) Extracts to *Diabrotica speciosa* (Genn.) (Coleoptera: Chrysomelidae) Beetles”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43 (2): 215-219, (1999).
- [103] Riddiford, L.M., “Cellular and Molecular actions of Juvenile Hormone. I. General considerations and premetamorphic actions”, *Advances in Insect Physiology*, 24: 213-218, (1994).
- [104] Hiruma, K., Shinoda, T., Malone, F. and Riddiford, L.M., “Juvenile Hormone Modulates 20-hydroxyecdysone-inducible Ecdysone Receptor and Ultraspiracle Gene Expression in the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*”, *Development-Genes and Evolution*, 209: 18-30, (1999).
- [105] Schluter, U., Bidmon, H.J. and Grewe, S., “Azadirachtin Affects Growth and Endocrine Events in Larvae of the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*”, *Journal of Insect Physiology*, Vol: 31, Issue: 10, 773-777, (1985).
- [106] Pascual, N., Marco, M. P. and Bellés, X., “Azadirachtin induced imaginal moult deficiencies in *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae)”, *Journal of Stored Products Research*, 26 (1): 53-57, (1990).

- [107] Dere, B., Altuntas, H. and Nurullahoğlu, Z.U., “Insecticidal and oxidative effects of azadirachtin on the model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)”, *Arch Insect Biochem*, 89, 138-152, (2015).
- [108] Charbonneau, C., Cote, R. and Charpentier, G., “Effects of azadirachtin and of simpler epoxy alcohols on survival and behaviour of *Galleria mellonella* (Lepidoptera)”, *J. Appl Entomol.* 131:447–452, (2007).
- [109] Gelbič, I. and Němec, V., “Developmental changes caused by metyrapone and azadirachtin in *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep., Noctuidae) and *Galleria mellonella* (L.) (Lep., Pyralidae)”, *J. Appl Entomol*, 125, 417-422, (2001).
- [110] Malczewska, M., Gelman, D.B. and Cymborowski, B., “Effect of azadirachtin on development, juvenile hormone and ecdysteroid titres in chilled *Galleria mellonella* larvae”, *J. Insect Physiol*, 34:725–732, (1988).
- [111] Mordue (Luntz), A.J. and Blackwell, A., “Azadirachtin: an update”, *J. Insect Physiol*, 39, 903-924, (1993).
- [112] Izhar-ul-Haq, M., Saleem, M. and Ahmed, S., “Effect of neem (*Azadirachta indica* A.Juss) seed extracts against greater wax moth (*Galleria mellonella* L.) larvae”, *Pak. Entomol*30:137–140, (2008).
- [113] Huang, Z., Shi, P., Chen, G. and Du, J., “Effects of Azadirachtin on hemolymph protein expression in *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae)”, *Ann. Entomol. Soc. Am.*,100(2), 245-250, (2007).
- [114] Elekonich, M.M., Robinson, G.E., “Organizational and Activational Effects of Hormones on Insect Behavior”, *Journal of Insect Physiology* 46, 1509 – 1515, (2000).
- [115] Jagannadh, V. and Nair, V.S.K., “Azadirachtin-induced effects on larval-pupal transformation of *Spodoptera mauritra*”, *Physiol. Entomol.* 17, 56-61, (1992).
- [116] Adel, M.M., Sehnal, F., “Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*”, *J. Insect Physiol*, 46, 267-274, (2000).

- [117] Tunca, H., Kılincer, N. and Ozkan, C., “Side-effects of some botanical insecticides and extracts on the parasitoid, *Venturia canescens* (Grav.) (Hymenoptera: Ichneumonidae)”, *Turk Entomol Derg*, 36, 205-214, (2012).
- [118] Topakçı, N. and Göçmen, H., “Pamuk kırmızı örümceği *Tetranychus cinnabarinus* (Boisd.) (Acari: Tetranychidae)’a karşı Azadirachtin’in etkinliği üzerine bir araştırma”, *Bitki Koruma Bülteni*, 48(4): 9-1, (2008).
- [119] Kefford, B.J., Zaluzniak, L., Warne, M.S.J. and Nugegoda, D., “Is the integration of hormesis and essentiality into ecotoxicology now opening Pandora’s box”, *Environ Pollut*, 151, 516-523, (2008).
- [120] Mukherjee, S.N., Rawal, S.K., Ghumare, S.S. and Sharma, R.N., “Hormetic concentrations of azadirachtin and isoesterase profiles in *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)”, *Experientia*, 49, 557-560, (1993).
- [121] Yu, Y., Shen, G., Zhu, H. and Lu, Y., “Imidacloprid induced hormesis on the fecundity and juvenile hormone levels of the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer)”, *Pestic Biochem Phys*, 98, 238-242, (2010).
- [122] Vilca Malqui, K.S., Vieira, J.L., Guedes, R.N.C., Gontijo, L.M., “Azadirachtin-induced hormesis mediating shift in fecundity-longevity trade-off in the mexican bean weevil (Chrysomelidae: Bruchinae)”, *J. Econ Entomol.*, 107, 860-866, (2014).
- [123] Okumu, F.O., Knols, B.G.J. and Fillinger, U., “Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*”, *Malar J.*, 6, 63-70, (2007).
- [124] Silva, M.A., Bezerra-Silva, G.C.D. and Vendramim, J.D., Mastrangelo, T., “Sublethal effect of neem extract on mediterranean fruit fly adults”, *Rev Bras Frutic*, 35, 93-101, (2013).
- [125] Gontijo, L.M., Celestino, D., Queiroz, O.S., Guedes, R.N.C., Picanco, M., “Impacts of azadirachtin and chlorantraniliprole on the developmental stages of

- pirate bug predators (Hemiptera: Anthocoridae) of the tomato pinworm *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)". *Fla Entomol*, 98, 59-64, (2015).
- [126] Moriarty, F., "The Sublethal Effects of Synthetic Insecticides on Insects", *Bioi.Rev.*, 44, 321-57, (1969).
- [127] Hoskins, J.K. (1940) Most Probable Number For Evaluation of coli-aerogenes tests by Fermentation Tube Method. Public Health Reports, Reprint no. 1621.
- [128] Sundaram, K. M. and Sloane, L. S., "Effects of pure and formulated azadirachtin, a neem, based biopesticide, on the phytophagous spider mite, *Tetranychus urticae* Koch", *J. Environ. Sci. Health*, B 30(6): 801–814, (1995).
- [129] Dimetry, N.Z., Amer, S.A.A. and Reda, A.S., "Biological activity of two neem seed kernel extracts against the two- spotted spider mite *Tetranychusurticae* Koch", *J. Appl. Ent.*, 116: 308–312, (1993).
- [130] Subrahmanyam, B., "Azadirachtin- a Naturally Occuring Insect Growth Regulator", *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 99, 277- 288, (1990).
- [131] Tanzubil, P.B. and McCaffery, A.R., "Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*", *Crop Prot.*, 9 383–386, (1990).
- [132] Feder, D., Valle, D., Rembold, H., Garcia, E.S., "Azadirachtin-induced sterilization in mature females of *Rhodnius prolixus*", *Z Naturforsch C.*, 43, 908-913, (1988).
- [133] Arnold, J.W., "The hemocytes of Insects", (ed: Rockstein, M.), *The Physiology of Insecta*, New York- London: Academic Press, 5, 201-253, (1974).
- [134] Florkin, M. and Jeuniaux, C., "Hemolymph Composition", (ed: Rockstein, M.), *The Physiology of Insecta*, New York- London: Academic Press, 5, 255-307, (1974).

- [135] Lackie, A.M., "Haemocyte Behaviour". (eds: Evans, P.D., Wigglesworth, V.B.), *Advances in Insect Physiology*, London- New York: Academic Press, 21, 85-178, (1988).
- [136] Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W., Rhodes, C.P., "Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances", *International Review of Cytology*, 97, 186-350, (1985).
- [137] Narayanan, K., "Insect defense: Its impact on microbial control of insect pests", *Current Science*, 86, 800-813, (2004).
- [138] Mowlds, P., Barron, A. and Kavanagh, K. "Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*", *Microbes and Infection*, 10, 628-634, (2008).
- [139] Phukan, M., Hazarika, L.K., Barooah, M., Puzari, K.C. and Kalita, S. "Interaction of *Dicladispa armigera* (Coleoptera: Chrysomelidae) haemocytes with *Beauveria bassiana*", *International Journal of Tropical Insect Science*, 28(2), 88-97, (2008).
- [140] Abd El-Aziz, N., and Awad, H.H., "Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections", *Micron*, 41, 203-209, (2010).
- [141] Kim, G.S. and Kim, Y., "Up-regulation of circulating hemocyte population in response to bacterial challenge is mediated by octopamine and 5-hydroxytryptamine via Rac1 signal in *Spodoptera exigua*", *Journal of Insect Physiology*, 56, 559-566, (2010).
- [142] Sak, O., "Cypermethrinin *Pimpla turionellae* L. (Hym.; Ichneumonidae), toplam protein, lipit ve karbonhidrat miktarı ile hemositlerine etkisi", Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir, 57-63, (2004).
- [143] Altuntas, H., Kiliç, A.Y., Uçkan, F. and Ergin, E., "Effects of gibberellic acid on hemocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)", *Environmental Entomology*, 41(3), 688-696, (2012).

- [144] Tiwari, R.K., Pandey, J.P. and Kumar, D., “Effect of neem based insecticides on meta-morphosis, haemocyte count and reproductive behaviour in red cotton bug, *Dysdercus koenigii* (Heteroptera: Pyrrhocoridae)”, *Entomon*, 31, 267–275, (2006).
- [145] Pandey, J.P., Tiwari, R.K. and Kumar, D., “Reduction in haemocyte mediated 514 immuneresponse in *Danaus chrysippus* following treatment with Neem based insectici-des”, *J. Entomol Sci.*, 5, 200-206, (2008).
- [146] Huang, J.F., Shui, K.J., Li, H.Y., Hu, M.Y. and Zhong, G.H., “Antiproliferative effect of azadirachtin A on *Spodoptera litura* SI-1 cell line through cell cycle arrest and apoptosis induced by up regulation of p53”, *Pestic Biochem Phys.*, 99, 16-24, (2011).
- [147] Shu, B., Wang, W., Hu, Q., Huang, J., Hu, M. and Zhong, G., “A comprehensive study on apoptosis induction by azadirachtin in *Spodoptera frugiperda* cultured cell line Sf9”, *Arch Insect Biochem*, 89, 153-168, (2015).
- [148] Gardiner, E.M.M. and Strand, M.R., “Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*”. *Arch Insect Biochem*, 43, 147-164, (2000).
- [149] Salehzadeh, A., Akhkha, A., Cushley, W., Adams, R.L., Kusel, J.R. and Strang, R.H., “The antimitotic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells”, *Insect Biochem Molec*, 33, 681-689, (2003).
- [150] Zibae, A., Bandani, A.R. and Malagoli, D., “Methoxyfenozide and pyriproxifen alter the cellular immune reactions of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) against *Beauveria bassiana*”, *Pestic Biochem Phys.*, 102, 30-37, (2012).
- [151] Nappi, A.J. and Ottaviani, E., “Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates”, *BioEssays*, 22, 469-480, (2000).

